

# miR-133b 可能通过调控 foxO1 的表达 影响小鼠 B 细胞发育\*

梁婧文 王 鹏 陈 黎 胡益清 孙 亿\*\*

(中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193)

**摘要** microRNAs (miRNAs) 是一类具有转录后调控作用的非编码 RNA, 在发育、细胞增殖、凋亡及肿瘤发生等多种生理和病理过程中发挥重要作用. 为全面了解小鼠 B 细胞中 miRNAs 的表达模式, 利用流式细胞仪(FACS)分选处于不同发育时期的 B 细胞, 采用 TaqMan® 低密度芯片对其进行检测, 筛选到 pre-B 阶段 9 个 miRNAs 表达量显著上调. 将筛选出的 miRNAs 进行靶基因预测, 并对预测靶基因进行功能聚类 and 通路分析, 发现约 4% 的基因参与免疫系统过程, 包括 Bcl2、Kit 等. 选取 foxO1 与 miR-19b、miR-142-3p、miR-106b、miR-182 及 miR-133b 进行初步功能验证, 双荧光素酶报告系统及 Western blot 检测结果均显示, miR-133b 可直接作用于 foxO1 3' UTR 从而降低 foxO1 的表达. 结合人类和小鼠 B 细胞中 foxO1 的表达情况分析, 其表达模式同 miR-133b 表达模式呈负相关, 说明 miR-133b 可能参与了 B 细胞发育过程中 foxO1 的表达调控过程.

**关键词** B 细胞发育, microRNAs, miR-133b, foxO1

**学科分类号** Q78, R392

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2011.00041

microRNAs (miRNAs) 是一类由基因组编码的小分子非编码 RNAs, 成熟后长度为 20~25nt, 它们通过与靶 mRNAs 3' 非翻译区(3' UTR)不完全互补配对结合, 抑制蛋白质翻译, 在转录后水平调控靶基因的表达<sup>[1]</sup>. B 细胞的发育与分化是一个动态而复杂的过程. 哺乳动物中, 淋巴细胞前体在骨髓中不断增殖分化形成未成熟的 B 细胞, 经血液运输到达外周淋巴器官后在外界抗原刺激下逐渐成熟, 参与体液免疫反应, 整个发育过程受到转录因子、细胞因子、外来抗原等诸多因素调控<sup>[2]</sup>.

miRNAs 在 B 细胞发育分化的过程中也起到重要作用<sup>[3-4]</sup>, 其中 miR-150、miR-155 等已被证实可在不同阶段影响 B 细胞发育<sup>[5-6]</sup>. 为了更全面地了解 B 细胞发育各个阶段 miRNAs 的表达模式, 我们采用正常小鼠为模型, 利用 Applied Biosystems 公司的 TaqMan® 低密度芯片检测了不同发育时期 B 细胞的 miRNAs 表达谱, 并初步探讨了其对 B 细胞发育分化的调控作用.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物.** 清洁级 BALB/c 小鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司(中国医学科学院动物研究所), 6~10 周龄, 动物饲养于人工控制条件下, 室温 22℃, 光照周期为 12 h, 自由取食, 饮水, 购买一周内完成取样.

**1.1.2 TaqMan® 低密度芯片.** Human MicroRNA Panel v1.0 及 Multiplex RT Human primer pool set 购自 Applied Biosystems 公司.

**1.1.3 质粒和菌株.** pMD® 19-T 载体购自 TaKaRa 公司; psiCHECK™-2 载体购自 Promega 公司; 大肠杆菌(DH5α)为中国农业大学农业生物技术国家

\* 国家重点基础研究发展计划资助项目(973)(2010CB945300).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-62731142-2012, E-mail: sunyi@cau.edu.cn

收稿日期: 2011-01-23, 接受日期: 2011-03-14

重点实验室保存菌株。

**1.1.4 细胞系.** 293FT 及 293T 细胞为中国农业大学农业生物技术国家重点实验室保存细胞株。

**1.1.5 试剂.** PE-Cy5.5-anti-mouse B220、FITC-anti-mouse IgM、PE-anti-mouse CD43、PE-anti-mouse IgD、流式细胞染色缓冲液及红细胞裂解液均购自 eBioscience 公司; TRIzol Reagents、Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒、PCR Master Mix、miR-133b、miR-106b、miR-19b、miR-182、miR-142-3p 及 Pre-miR Negative Control 购自 Applied Biosystems 公司; 去内毒素质粒小量快速提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司; 限制性内切酶、T4DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司; 细胞培养使用的胎牛血清、DMEM、Opti-MEM I medium 购自 Gibco 公司; 双荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司;  $\beta$ -actin、foxO1 单抗购自 Cell Signaling Technology 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 小鼠 B 细胞分选.** 采用颈椎脱臼法处死小鼠, 取股骨和胫骨骨髓制成单细胞悬液, 200 目细胞筛过滤, 按抗体使用说明书加入 PE-Cy5.5-anti-mouse B220、FITC-anti-mouse IgM、PE-anti-mouse CD43 抗体进行染色, 4°C 孵育 20 min 后, PBS 洗涤 2~3 次, 上机进行分选。分选条件如下: 祖 B 细胞 pro-B (B220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>); 前 B 细胞 pre-B (B220<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>); 未成熟 B 细胞 immature B (B220<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>, IM-B)。取脾脏按照上述方法处理, 按抗体使用说明加入 PE-Cy5.5-anti-mouse B220、FITC-anti-mouse IgM、PE-anti-mouse IgD 抗体进行染色, 分选得到成熟 B 细胞 mature B (B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>, M-B)。

**1.2.2 B 细胞总 RNA 提取及反转录.** 使用 TRIzol 分别提取 4 个时期 B 细胞总 RNA(每个时期 3 个生物学重复, 每个重复取自 5 只小鼠), 紫外分光光度计检测总 RNA 纯度和浓度。利用 Multiplex RT Human primer pool set 作为反转录引物, 按照 Applied Biosystems 公司反转录试剂盒说明反转录为 cDNA, 每个反应使用总 RNA 80 ng。

**1.2.3 TaqMan<sup>®</sup> 低密度芯片及数据分析.** 将上步所得 cDNA 稀释 62.5 倍后取 50  $\mu$ l 同 PCR Master Mix 50  $\mu$ l 均匀混合并上样至芯片, 331 g 离心 2 $\times$ 1 min 后封口。应用 ABI7900PCR 仪, 反应条件为: 50°C 2 min, 95°C 10 min 变性, 95°C 30 s, 57.9°C 1 min

40 个循环。以 miR-92 为内参进行数据分析。

**1.2.4 生物信息学分析与靶基因预测.** 利用网络共享资源 TargetScanMouse (Release 5.1) ([http://www.targetscan.org/mmu\\_50/](http://www.targetscan.org/mmu_50/)) 及 PicTar ([http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/new\\_PicTar\\_mouse.cgi](http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/new_PicTar_mouse.cgi)) 分析差异表达 miRNAs 的作用靶点并取其交集, 使用 agriGO (version: 1.2) 及 KOBAS 2.0 对这些基因进行功能聚类及通路分析。

**1.2.5 psiCHECK<sup>™</sup>-2-foxO1 3' UTR 双荧光素酶报告载体的构建.** 利用正向引物 5' ctcgagTGA-CAGCAGGAAGTGGAGGAGCAGTC 3' 和反向引物 5' gcgccgcACAATAATAGACCAGAAAGCGAACA 3' 从小鼠基因组扩增 foxO1 基因的 3' 非翻译区 (3' UTR) 片段, 克隆到 pMD<sup>®</sup> 19-T 载体上并测序。Xho I 和 Not I 双酶切 foxO1 3' UTR 片段, 插入同样进行双酶切的 psiCHECK<sup>™</sup>-2 质粒载体, 构建获得双荧光素酶报告载体 psiCHECK<sup>™</sup>-2-foxO1 3' UTR。

**1.2.6 293FT 细胞转染与荧光素酶检测.** 使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养 293FT 细胞。转染前 12 h, 胰酶消化细胞并计数, 将细胞铺在 24 孔板中, 使其在转染时密度为 80%~90%。使用 Lipofectamine 2000 将荧光素酶报告载体同 miRNAs 共转染至细胞中, 每孔细胞 miRNA 或 miRNA 模拟体终浓度为 30 nmol/L, psiCHECK<sup>™</sup>-2-foxO1 3' UTR 或 psiCHECK<sup>™</sup>-2 200 ng, Opti-MEM I medium 培养 4 h 后换为正常培养基。转染 24 h 后, 按照 Promega 公司双荧光素酶检测试剂盒说明检测不同处理组的荧光强度。每个处理设置 3 个重复, 每个转染实验重复 3 次。

**1.2.7 293T 细胞转染与 Western blot 检测.** 293T 细胞培养在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中。按照上述方法将 miRNA 或 miRNA 模拟体转染至细胞中, 终浓度为 60 nmol/L。转染 48 h 后, 分别收集对照组及 miRNAs 作用组细胞, 用细胞裂解液提取总蛋白, 分别进行 SDS-PAGE, 随后转硝酸纤维素膜 (NC 膜), 以 foxO1 抗体为一抗, 辣根过氧化物酶标记的 IgG 为二抗, ECL 发光系统显示蛋白质表达。以  $\beta$ -actin 作为内参进行分析。

## 2 结 果

### 2.1 不同发育时期 B 细胞分选

根据 Hardy 等的研究结果<sup>[7-8]</sup>, 采用 PE-Cy5.5-B220、FITC-IgM、PE-CD43 抗体对小鼠骨髓细胞进行染

色, 使用 PE-Cy5.5-B220、FITC-IgM、PE-IgD 对小鼠脾脏细胞进行染色, FACS 分选成功获得祖 B 细胞(pro-B, B220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>), 前 B 细胞(pre-B,

B220<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>), 未成熟 B 细胞(IM-B, B220<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>)及成熟 B 细胞(M-B, B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) (图 1).

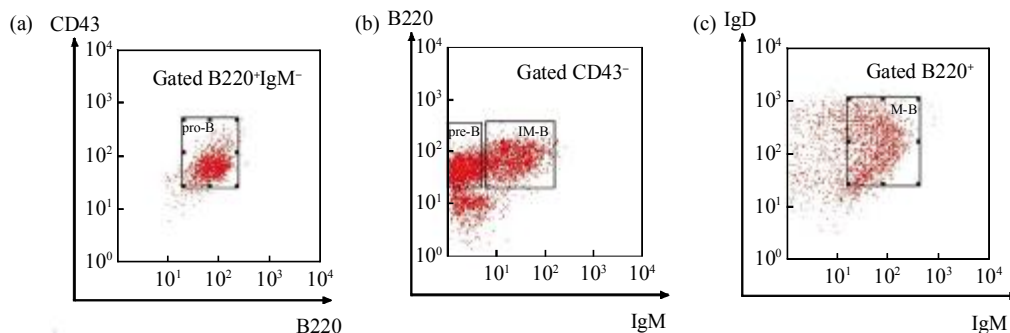


Fig. 1 Cell sorting by FACS

(a) pro-B(B220<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>). (b) pre-B(B220<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>)(left), IM-B(B220<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>)(right). (c) M-B(B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>).

2.2 miRNAs 表达检测

使用 TaqMan<sup>®</sup> 低密度芯片检测 miRNAs 在 B 细胞发育 4 个时期的表达水平, 采用 miR-92 作为内参进行数据分析(图 2). 比较 B 细胞 4 个发育时期的 miRNAs 表达, 其中 pre-B 阶段的 miRNAs 表达模式同其他 3 个阶段差异最大, 表达量高于 pro-B 的 2 倍的 miRNAs 共筛选出 9 个, 包括 miR-19b、miR-24、miR-93、miR-142-3p、miR-26a、miR-106b、miR-16、miR-99a 及 miR-15b, IM-B 阶段多数 miRNAs 表达量显著下调, 但 miR-182 表达量明显

高于其他 3 个发育阶段, 在同 IM-B 阶段表达模式类似的 pro-B 阶段, miR-30a-5p 表达量高于其他 3 个发育阶段的 2 倍. pro-B 阶段未检测到表达但在其他发育阶段检测到表达的 miRNAs 共 12 个(表 1).

Table 1 miRNAs specifically expressing in certain development stages

miRNAs	pro-B	pre-B	IM-B	M-B
let-7c	-	-	-	+
miR-34b	-	+	-	+
miR-155	-	-	-	+
miR-367	-	-	-	+
miR-518b	-	-	+	-
miR-518e	-	-	-	+
miR-520g	-	-	+	+
miR-133b	-	+	-	+
miR-28	-	-	-	+
miR-342	-	-	-	+
miR-486	-	+	+	+
miR-216	-	+	-	-

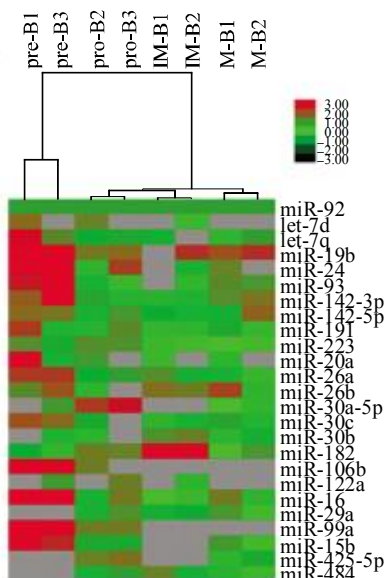
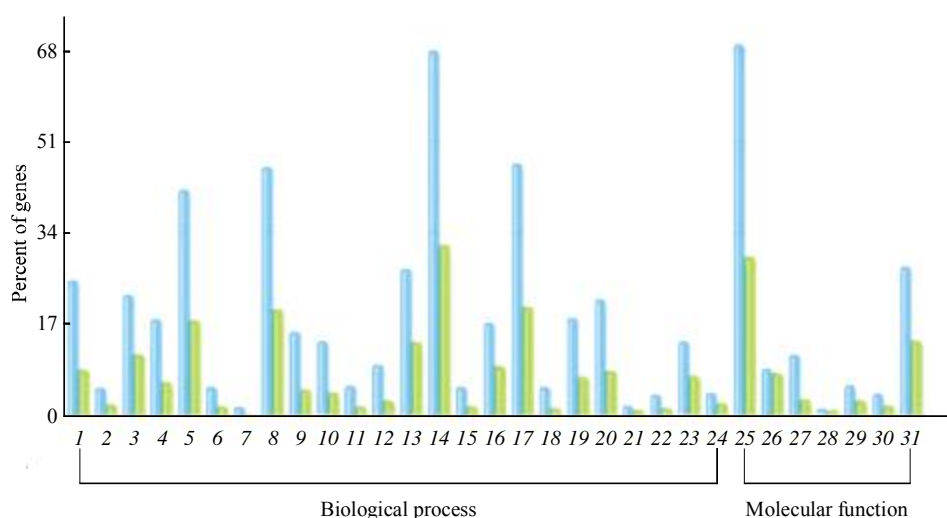


Fig. 2 Analysis of array data

Hierarchical clustering heat map of miRNA expression profile was produced using fold change in miRNA expression normalized to pro-B. Correlation coefficient was used as a similarity measure and a complete linkage method was used as a clustering method.

2.3 生物信息学分析与靶基因预测

2.3.1 GO 聚类分析. 将 pre-B 阶段表达量显著上调的 9 个 miRNAs 作为分析对象, 利用 PicTar 及 TargetScanMouse(Release 5.1)分析其可能的作用靶点, 其中 PicTar 预测到靶基因 1 975 个, TargetScan 预测到靶基因 2 191 个, 取其交集共 1 102 个靶基因<sup>[9]</sup>, 使用 agriGO(version: 1.2)对这些基因进行功能聚类<sup>[10-12]</sup>, 有注解的基因为 1 046 个, 其中约有 4%基因参与免疫系统过程, 25%基因参与发育过程(图 3).



**Fig. 3 Annotation of predicted target genes with agriGO(version: 1.2)**

1: Developmental process; 2: Cellular component biogenesis; 3: Signaling; 4: Cellular component organization; 5: Regulation of biological process; 6: Reproduction; 7: Rhythmic process; 8: Biological regulation; 9: Positive regulation of biological process; 10: Negative regulation of biological process; 11: Biological adhesion; 12: Death; 13: Multicellular organismal process; 14: Cellular process; 15: Reproductive process; 16: Signaling process; 17: Metabolic process; 18: Growth; 19: Establishment of localization; 20: Localization; 21: Multi-organism process; 22: Locomotion; 23: Response to stimulus; 24: Immune system process; 25: Binding; 26: Molecular transducer activity; 27: Transcription regulator activity; 28: Structural molecule activity; 29: Transporter activity; 30: Enzyme regulator activity; 31: Catalytic activity. ■: Input list; ■: Background/reference.

**2.3.2 Pathway 分析.** 为进一步筛选可能受 miRNAs 调控并对 B 细胞发育造成影响的基因, 利用 KOBAS 2.0 对预测到的 1 102 个靶基因进行通路分

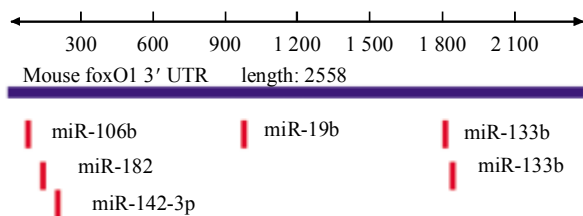
析<sup>[13-15]</sup>, 其中在 KEGG PATHWAY 数据库中有注解的共 344 个基因, 涉及到 62 条通路( $P < 0.05$ ), 选取  $P < 0.005$  的通路进行后续分析(表 2).

**Table 2 Statistically enriched related pathways for the predicted target genes by KOBAS 2.0**

Term	Sample number	Background number	P value
Wnt signaling pathway	26/344	162/6678	$1.72 \times 10^{-7}$
Neurotrophin signaling pathway	23/344	145/6678	$1.12 \times 10^{-6}$
Focal adhesion	28/344	208/6678	$2.33 \times 10^{-6}$
Axon guidance	21/344	139/6678	$7.31 \times 10^{-6}$
MAPK signaling pathway	32/344	283/6678	$1.89 \times 10^{-5}$
Renal cell carcinoma	14/344	77/6678	$3.09 \times 10^{-5}$
Pathways in cancer	36/344	345/6678	$3.32 \times 10^{-5}$
TGF-beta signaling pathway	15/344	92/6678	$6.13 \times 10^{-5}$
Oocyte meiosis	18/344	129/6678	$9.68 \times 10^{-5}$
mTOR signaling pathway	11/344	56/6678	0.000 106 2
Ubiquitin mediated proteolysis	20/344	156/6678	0.000 133 7
Acute myeloid leukemia	11/344	61/6678	0.000 236 7
Prostate cancer	14/344	94/6678	0.000 289
Endocytosis	25/344	239/6678	0.000 530 2
Fc gamma R-mediated phagocytosis	14/344	104/6678	0.000 826 6
Small cell lung cancer	13/344	94/6678	0.000 974 8
Hepatitis C	17/344	143/6678	0.001 016
T cell receptor signaling pathway	16/344	132/6678	0.001 152 1
Insulin signaling pathway	17/344	146/6678	0.001 283
Gap junction	12/344	95/6678	0.003 303 2
Colorectal cancer	10/344	75/6678	0.004 806 3

\* $P < 0.005$ .

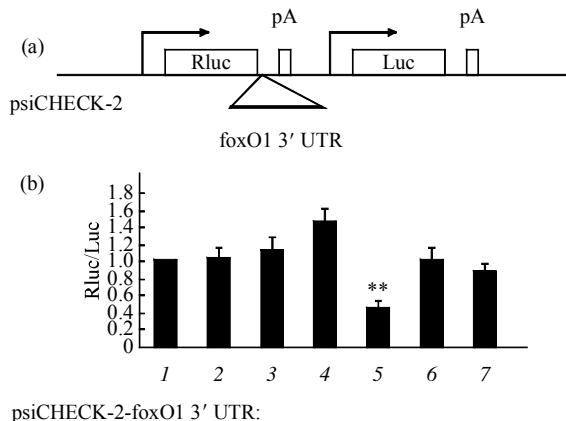
**2.3.3 靶基因预测.** 结合靶基因功能聚类及通路分析的情况, 我们发现癌症相关通路、前列腺癌通路及胰岛素信号通路中有一个共同的基因 forkhead box O1(foxO1)参与(表 2), 且该基因已被证实可通过调控 V(D)J 重组所需的重组激活基因 Rag1 及 Rag2 的表达来影响 B 细胞发育, 同时, 差异表达的 miR-19b、miR-142-3p、miR-106b、miR-182 及 miR-133b 在 foxO1 3' UTR 均预测到作用靶点(图 4), 因此选择 foxO1 及以上 miRNAs 进行初步功能验证.



**Fig. 4 Predicted miRNAs and their target sites on foxO1 3' UTR**

**2.4 miR-133b 可直接调控 foxO1 的表达**

**2.4.1 双荧光素酶报告系统检测.** 将双荧光素酶报告载体 psiCHECK™-2-foxO1 3' UTR(图 5a)同 miR-19b、miR-106b、miR-133b、miR-142-3p、miR-182 或对照 miRNA(Pre-miR negative control)共转染至 293FT 细胞中, 培养 24 h 后, 分析荧光素酶表达变化. 将只转染报告载体的细胞作为对照组, 相比之下, 共转染 miR-133b 的细胞其荧光素

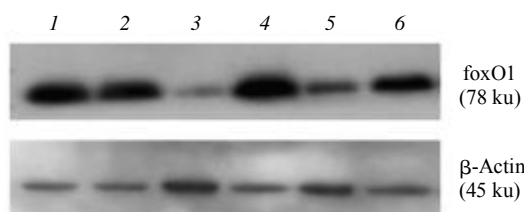


**Fig. 5 miR-133b downregulate the expression of a reporter gene containing the foxO1 3' UTR**

293T cells were co-transfected with psiCHECK-2-foxO1 3' UTR and miRNAs. 1: Vector; 2: NC; 3: miR-19b; 4: miR-106b; 5: miR-133b; 6: miR-142-3p; 7: miR-182. \*\* $P < 0.01$ .

酶表达水平下降约 60%, 统计学分析差异极显著, 而其他 miRNAs 对荧光素酶表达无显著影响(图 5b). 以上结果说明, miR-133b 可能靶向作用于 foxO1 3' UTR 从而调控 foxO1 的表达.

**2.4.2 foxO1 蛋白质水平检测.** 将 miR-19b、miR-133b、miR-142-3p、miR-182 或对照 miRNA (Pre-miR negative control)转染至 293T 细胞中, 培养 48 h 后, Western blot 检测 foxO1 蛋白水平表达变化(图 6). 由图 6 可看出, 转染 miR-133b 及 miR-182 的细胞中 foxO1 蛋白水平较正常细胞(293T)和转染对照 miRNA(NC)的细胞显著下降, 进一步证明 miR-133b 可直接靶向作用于 foxO1 3' UTR 进而调控 foxO1 的表达, 而 miR-182 可调控 foxO1 表达量也同 Stittrich 等<sup>[6]</sup>的研究结果相符.



**Fig. 6 Western blot analysis of expression of foxO1 in 293T cells transfected with miRNAs**

1: 293T (no treatment); 2: NC (Pre-miR negative control); 3: miR-133b; 4: miR-142-3p; 5: miR-182; 6: miR-19b.

**3 讨 论**

miRNAs 是一类具有转录后调控作用的非编码 RNA, 它们广泛分布于动植物体内, 并且在进化上高度保守, 具有时空表达特异性和细胞、组织表达特异性等特征. 已有研究表明, miRNA 在发育、细胞增殖、凋亡、脂类代谢、激素分泌及肿瘤发生等多种生理和病理过程中发挥重要作用<sup>[1]</sup>. miRNAs 参与 B 细胞发育过程调控也成为近年来的研究热点<sup>[3-4]</sup>.

为全面了解 B 细胞各个发育阶段 miRNAs 的表达模式, 我们采用 TaqMan® 低密度芯片对其进行检测, 发现 pre-B 阶段的 miRNAs 表达模式同其他 3 个发育阶段相差较大, 筛选到 9 个 miRNAs 表达量显著上调. 对 pre-B 阶段高表达的 miRNAs 进行靶基因预测及 GO 聚类后发现, 约有 4%靶基因参与免疫系统过程, 其中包括 Bcl2、Kit、Bcl3、SP1 及 SP3 等基因. 据 Hystad 等<sup>[7]</sup>的研究结果显

示, 在 early-B 细胞中 Bcl2 基因高表达, 在 pro-B 阶段之后则几乎不表达, 而 Kit 基因通常表达在造血干细胞及祖细胞中, 随细胞发育分化表达量逐渐降低<sup>[18]</sup>, 它们的表达模式同我们检测到的 miRNAs 表达模式呈负相关, 是否这些基因的表达直接受到 miRNAs 的调控, 还需要进一步的实验证明。

结合通路分析与 miRNAs 靶位点的预测情况, 我们选择 foxO1 及 pre-B 阶段差异表达的 miR-19b、miR-142-3p、miR-106b、miR-182、miR-133b 进行初步功能验证。双荧光素酶报告系统检测与过表达 miRNAs 后细胞中 foxO1 蛋白水平检测结果均显示, miR-133b 可直接作用于 foxO1 3' UTR 从而降低 foxO1 的表达。Hystad 等<sup>[17]</sup>及 Rumpfelt 等<sup>[19]</sup>的芯片结果表明, 在人类和小鼠的早期 pro-B 细胞中 foxO1 表达量急剧上调, 在 pre-B 阶段有所下降, 其表达模式同 miR-133b 表达模式呈负相关, 提示 miR-133b 可能参与了 foxO1 在 B 细胞中的表达调控过程。已有研究结果显示, foxO1 可直接同 Rag 基因座位结合, 激活其转录<sup>[20-21]</sup>, 若 B 细胞发育早期缺乏 foxO1, 导致无法正常表达 IL-7, 使 B 细胞停滞在 pro-B 阶段无法继续发育, 而 pro-B 末期缺少 foxO1, 则导致 Rag1、Rag2 表达量降低, V(D)J 重组无法正常进行, B 细胞发育停留在 pre-B 阶段<sup>[22]</sup>。miR-133b 是否通过调控 foxO1 表达引起 Rag1、Rag2 基因表达差异, 进而影响 B 细胞发育还需要进一步的研究。

**致谢** 衷心感谢北京大学生命科学院杜立颖老师对流式细胞分选提供的大力支持, 谨致谢意。

### 参 考 文 献

- [1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281-297
- [2] Osmond D G. B cell development in the bone marrow. *Semin Immunol*, 1990, **2**(3): 173-180
- [3] Monticelli S, Ansel K M, Xiao C, *et al.* MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol*, 2005, **6**(8): R71
- [4] Chen C Z, Li L, Lodish H F, *et al.* MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004, **303** (5654): 83-86
- [5] Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, *et al.* Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*, 2007, **316**(5824): 608-611
- [6] Xiao C C, Calado D P, Galler G, *et al.* MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell*, 2007, **131**(10): 146-159
- [7] Hardy R R, Carmack C E, Shinton S A, *et al.* Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med*, 1991, **173**(5): 1213-1225
- [8] Lu L, Simithson G, Kincade P W, *et al.* Two models of routine B lymphopoiesis: a correlation. *Eur J Immunol*, 1998, **28**(6): 1755-1761
- [9] Lewis B P, Shih I H, Jones-Rhoades M W, *et al.* Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 2003, **115**(7): 787-798
- [10] Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc*, 2009, **4**(1): 44-57
- [11] Dennis G Jr, Sherman B T, Hosack D A, *et al.* DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol*, 2003, **4**(5): P3
- [12] Du Z, Zhou X, Ling Y, *et al.* agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Res*, 2010, **38** (7): W64-W70
- [13] Hardy R R, Hayakawa K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol*, 2001, **19**(1): 595-621
- [14] Mao X, Cai T, Olyarchuk J G, *et al.* Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary. *Bioinformatics*, 2005, **21**(19): 3787-3793
- [15] Wu J, Mao X, Cai T, *et al.* KOBAS server: a web-based platform for automated annotation and pathway identification. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(Web Server issue): W720-724
- [16] Stittrich A, Haftmann C, Sgouroudis E, *et al.* The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes. *Nat Immunol*, 2010, **11**(11): 1057-1062
- [17] Hystad M E, Myklebust J H, Trond H B, *et al.* Characterization of early stages of human B cell development by gene expression profiling. *J Immunol*, 2007, **179**(6): 3662-3671
- [18] Maeda K, Nishiyama C, Ogawa H, *et al.* GATA2 and Sp1 positively regulate the c-kit promoter in mast cells. *J Immunol*, 2010, **185**(7): 4252-4260
- [19] Rumpfelt L L, Zhou Y, Rowley B M, *et al.* Lineage specification and plasticity in CD19- early B cell precursors. *J Exp Med*, 2006, **203**(3): 675-687
- [20] Amin R H, Schlissel M S. FoxO1 directly regulates the transcription of recombination-activating genes during B cell development. *Nat Immunol*, 2008, **9**(6): 613-622
- [21] Herzog S, Hug E, Meixlsperger S, *et al.* SLP-65 regulates immunoglobulin light chain gene recombination through the PI(3) K-PKB-Foxo pathway. *Nat Immunol*, 2008, **9**(6): 623-631
- [22] Dengler H S, Baracho G V, Omori S A, *et al.* Distinct functions for the transcription factor FoxO1 at various stages of B cell differentiation. *Nat Immunol*, 2008, **9**(12): 1388-1398

## miR-133b May Regulate Mouse B Cell Development by Targeting The Transcription Factor foxO1\*

LIANG Jing-Wen, WANG Peng, CHEN Li, HU Yi-Qing, SUN Yi\*\*

(State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNAs that regulate gene expression at post-transcriptional level. They play important roles in multiple physiological and pathological processes, including development, cell proliferation, apoptosis, metabolism and tumorigenesis, etc. Mouse B cell at different development stages were isolated by FACS and analyzed the miRNAs profile using TaqMan® Low Density Array. The data showed that 9 miRNAs were significantly up-regulated in the pre-B cells. Functional clustering and pathway analysis of 1102 predicted target genes of these miRNAs showed that about 4% of the genes involved in immune system processes, including Bcl2, Kit, etc. A dual luciferase reporter system and Western blot were used to validate the interaction between foxO1 and miR-19b, miR-142-3p, miR-106b, miR-182, miR-133b. The results show that miR-133b can directly regulate the expression of foxO1. According to the foxO1 expression profile of human and mouse, the expression pattern is negatively correlated with that of miR-133b, indicating that miR-133b may be involved in the regulation of foxO1 in B cell development.

**Key words** B cell development, microRNAs, miR-133b, foxO1

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2011.00041

---

\*This work was supported by a grant from National Basic Research Program of China (2010CB945300).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-10-62731142-2012, E-mail: sunyi@cau.edu.cn

Received: January 23, 2011 Accepted: March 14, 2011