

牛下丘脑 CART 转录后调控关键 miRNA 的筛选与鉴定

成俊丽¹, 闫俊蓉², 侯淑宁², 朱芷葳², 李鹏飞^{1,2*}

1 山西农业大学 动物科学学院, 山西 太谷 030801

2 山西农业大学 生命科学学院, 山西 太谷 030801

成俊丽, 闫俊蓉, 侯淑宁, 朱芷葳, 李鹏飞. 牛下丘脑 CART 转录后调控关键 miRNA 的筛选与鉴定[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4557-4572.

CHENG Junli, YAN Junrong, HOU Shuning, ZHU Zhiwei, LI Pengfei. Screening and identification of key miRNAs in post-transcriptional regulation of CART in the bovine hypothalamus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4557-4572.

摘要: 本研究旨在探究 microRNA(miRNA)对牛下丘脑可卡因-苯丙胺调节转录肽(cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide, CART)的转录后调控作用, 并筛选调控关键 miRNA。通过生物信息学分析来预测与牛 CART 3'非翻译区(3' untranslated regions, 3'UTR)结合的潜在 miRNA, 发现 CART 3'UTR 存在 7 个 miRNA 结合位点, 即 bta-miR-377、bta-miR-331-3p、bta-miR-491、bta-miR-493、bta-miR-758、bta-miR-877 和 bta-miR-381 结合位点; 使用逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-PCR, RT-PCR)技术检测 CART 基因与靶 miRNA 在牛下丘脑内源性表达情况, 发现它们均在牛下丘脑组织内表达; 通过双荧光素酶报告实验验证 CART 3'UTR 与靶细胞 miRNA 结合位点, 证明了 CART 3'UTR 与 7 个 miRNA 均具有靶向结合关系; 通过细胞实验检测靶 miRNA 对外源性 CART 基因与 CART 蛋白表达的影响并筛选调控关键 miRNA, 结果表明, 7 个 miRNA 均能抑制外源 CART 信使 RNA(messenger RNA, mRNA)的表达, 其中以 bta-miR-491 的抑制作用最强, bta-miR-377、bta-miR-331-3p、bta-miR-491、bta-miR-493 及 bta-miR-381 均能抑制外源性 CART 蛋白表达, 其中以 bta-miR-381 的抑制作用最强; 通过动物实验研究关键 miRNA 对下丘脑 CART 基因、CART 蛋白表达及血清 CART 浓度的影响, 结果表明, miR-491 和 miR-381 可结合 CART 3'UTR 位点, 调节下丘脑 CART 内源性表达并影响其血清浓度。本研究的结果表明, miR-491 和 miR-381 是调节牛下丘脑 CART 表达的主要 miRNA, 可通过调节 CART 内源性表达进而影响血清 CART 浓度。

关键词: 牛; 下丘脑; CART; miR-491/381; 摄食

资助项目: 国家自然科学基金(31873002); 山西省应用基础研究计划(20210302123380, 202303021221094)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31873002) and the Applied Basic Research Program in Shanxi Province (20210302123380, 202303021221094).

*Corresponding author. E-mail: adamlpf@sxau.edu.cn

Received: 2024-04-02; Accepted: 2024-08-08; Published online: 2024-08-09

Screening and identification of key miRNAs in post-transcriptional regulation of CART in the bovine hypothalamus

CHENG Junli¹, YAN Junrong², HOU Shuning², ZHU Zhiwei², LI Pengfei^{1,2*}

1 College of Animal Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

2 College of Life Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

Abstract: This study aimed to explore the roles of microRNAs (miRNAs) in the post-transcriptional regulation of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide in the bovine hypothalamus and to screen key regulatory miRNAs. Targetscan was used to predict the potential miRNAs binding to *CART* 3' untranslated regions (3'UTR). Bioinformatics analysis predicted 7 miRNA binding sites in the bovine *CART* 3'UTR, which were bta-miR-377, bta-miR-331-3p, bta-miR-491, bta-miR-493, bta-miR-758, bta-miR-877, and bta-miR-381, respectively. Reverse transcription-PCR (RT-PCR) was carried out to determine the endogenous expression of *CART* and target miRNAs in the bovine hypothalamus. All the 7 target miRNAs and *CART* were endogenously expressed in the bovine hypothalamus. The dual-luciferase reporter gene assay was employed to detect the targeted binding relationship between *CART* 3'UTR and target miRNAs obtained from bioinformatics analysis. The dual-luciferase reporter gene assay confirmed that the 3'UTR of *CART* had a targeted binding relationship with the 7 target miRNAs. Cell experiments were conducted to examine the effects of target miRNAs on the messenger RNA (mRNA) and protein levels of exogenous *CART* and screen for key regulatory miRNAs. The results of cell experiments showed that the 7 miRNAs downregulated the mRNA level of *CART*, with bta-miR-491 demonstrating the strongest downregulating effect. Bta-miR-377, bta-miR-331-3p, bta-miR-491, bta-miR-493, and bta-miR-381 downregulated the protein level of *CART*, with bta-miR-381 exerting the strongest downregulating effect. Animal experiments were conducted to explore the effects of key regulatory miRNAs on the mRNA and protein levels of *CART* in the hypothalamus and the *CART* concentration in the serum. The results from animal experiments showed that miR-491 and miR-381 regulated the endogenous expression of *CART* in the hypothalamus and the concentration in the serum by binding to the *CART* 3'UTR. These results suggest that miR-491 and miR-381 are the main miRNAs regulating *CART* expression in the bovine hypothalamus, which can affect serum *CART* concentration by modulating endogenous *CART* expression.

Keywords: bovine; hypothalamus; cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART); miR-491/381; feed intake

可卡因-苯丙胺调节转录肽(cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide, CART)是一种在中枢及周围神经系统广泛分布的神经肽,参与调节多种生理功能^[1]。下丘脑回路中,CART 在弓状核、外侧带等多个与摄食相关的区域高表达,是一种内源性饱腹因子^[2-4]。在小鼠和大鼠侧脑室注射 CART 可抑制摄食,用抗体中和内源性 CART 则会产生相反效果,表明 CART 对摄食具有潜在调节作用^[5-7]。高脂肪饮食诱导的早熟与弓状核 CART 表达增加有关,CART 神经元可以通过介导瘦素影响高脂肪饮食诱导的 Kiss1 神经元^[8]。神经肽 Y 是一种常见的食欲肽,可刺激食物摄入,与 CART 免疫活性神经元密切相关,通过调节 CART 释放影响摄食^[9]。

目前,关于 CART 摄食调节的研究主要集中在与食欲调节因子的互作上,CART 转录后调控的分子机制尚不明晰。miRNA 是小型单链 RNA,通过与靶基因信使 RNA (messenger RNA, mRNA)的 3'非翻译区(3' untranslated regions, 3'UTR)不完全互补配对在转录后水平调控基因表达,从而调节部分生理过程^[10-11]。miRNA 在调节摄食和体重方面发挥着重要作用。Price 等^[12]发现,敲除 miR-33 会促进小鼠前脂肪细胞增殖、脂质摄取增强、脂肪分解受损、摄食量增加。Crépin 等^[13]发现,沉默小鼠下丘脑 miR-200a 后,瘦素受体和胰岛素受体底物 2 的表达水平提高,体重增加减少。与正常小鼠相比,miR-185-3p 敲除小鼠的饮水和摄食量明显增加,而 miR-185-3p 过表达的结果相反^[14]。这些研究结果提示 miRNA 可能通过调节 CART 的转录后表达来影响摄食和体重,但具体作用机制尚不清楚。本研究利用生物信息学分析、逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-PCR, RT-PCR)、双荧光素酶、细胞培养、脂质体转染、

过表达、RNA 干扰、实时荧光定量 PCR (real-time quantitative-polymerase chain reaction, RT-qPCR)、Western blotting、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等实验技术手段,探究牛 miRNA 对下丘脑 CART 转录后调控机制,并筛选其关键调控 miRNA。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 分析软件

基因序列查询与比对数据库:NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov); mRNA-miRNA 靶向预测数据库:Targetscan (www.targetscan.org); miRNA 成熟序列检索数据库:miRBase (www.mirbase.org); miRNA 基因序列比对软件:DNAMAN。

1.1.2 细胞系

人胚肾细胞系 293T 第 5 代冻存于山西农业大学生命科学学院实验室。

1.1.3 实验动物

本研究所有动物实验均严格按照山西农业大学实验动物伦理委员会(批准号: SXAU-EAW-2022M.AB.002023200)要求执行。

三头西门塔尔牛来自山西文水肉牛屠宰场。屠宰后,采集下丘脑,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤后放入液氮中保存备用。70 只 6 周龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 ICR 雌性小鼠购自斯贝福北京生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析

用 Targetscan 数据库确定 miRNA 与 CART 3'UTR 是否具有结合位点,并评估其信噪比;用 miRBase 查询得到牛、人 miRNA 成熟序列;用 DNAMAN 软件对其序列进行比对。

1.2.2 靶基因内源性表达分析

用 TRIzol 试剂(赛默飞世尔科技)提取牛下丘脑总 RNA, 质检合格后用含 gDNA Eraser 的 PrimeScriptTM RT 试剂盒(TaKaRa Biomedical Technology)进行 mRNA 反转录;用 miRNA First Strand cDNA Synthesis [生工生物工程(上海)股份有限公司]进行 miRNA 反转录(茎环法), 具体引物序列见表 1。以 cDNA 为模板, 使用 2×*E_s* Taq MasterMix (康为世纪生物科技股份有限公司)进行目的基因 PCR, 具体引物序列见表 2。引物序列交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。采用 1%或 2.5%琼脂糖凝胶电泳检测 *CART* 和靶 miRNA PCR 产物, 分离目标条带并进行测序, 测序结果与 NCBI 数据库中的基因序列进行比对。

1.2.3 双荧光素报告实验

取 7 个含有潜在 miRNA 靶点/突变靶点的牛 *CART* 3'UTR 荧光素酶报告质粒交由上海吉玛制药技术有限公司构建。将 293T 细胞接种到 96 孔板, 在添加 10% FBS (ScienceCell)的 RPMI 1640 basic (赛默飞世尔科技)培养基中培养。每组设置 3 个重复。待细胞达到 70%汇合度时, 使用 D-Portal 转染试剂(天津三箭生物技术有限公司)将 0.5 μg 荧光素酶报告质粒和 1 μg miRNAmimics 共转染 293T 细胞, 36 h 后, 使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)检测萤火虫和海肾的荧光素酶活性。每个转染孔的萤火虫荧光素酶活性归一化为海肾荧光素酶活性。

1.2.4 细胞共转染

bta-miR-377、bta-miR-331-3p、bta-miR-491、bta-miR-493、bta-miR-758、bta-miR-877、bta-miR-381、NC mimics 片段及牛 *CART* 基因过表达载体均由上海吉玛制药技术有限公司合成。设置 7 个实验组(miR-377、miR-331-3p、miR-491、miR-493、miR-758、miR-877 和

表 1 miRNA 反转录引物序列

Table 1 miRNA primer sequences of reverse transcription

Primer name	Primer sequence (5'→3')
miR-377	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACACAAAA
miR-331-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACTTCTAG
miR-491	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACCCCTCAT
miR-493	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACCCCTGGC
miR-758	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACGGTTAG
miR-877	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACCCCTGC
miR-381	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACACAGAG

表 2 目的基因 PCR 引物序列

Table 2 Target gene primer sequences of PCR

Primer name	Primer sequence (5'→3')
<i>CART</i> -F	ACGCGTCCGGTTTCAGCACCAT
<i>CART</i> -R	CTTGACAGATGACATCACAACC
miR-377-F	CGCGATCACACAAAGGCAAC
miR-331-3p-F	CGGCCCTGGGCTATC
miR-491-F	CGAGTGGGGAACCCTTCC
miR-493-F	GCGCGTGAAGGTCTACTGTGT
miR-758-F	GCGTTTGTGACCTGGTCCA
miR-877-F	CGCGGTAGAGGAGATGGC
miR-381-F	CGCGTATACAAGGGCAAGCT

miR-381)和 1 个阳性对照组(NC), 这 8 个组均与 *CART* 共转染; 另设 8 个阴性对照组, 均与 pEX-3 共转染(miR-377、miR-331-3p、miR-491、miR-493、miR-758、miR-877、miR-381 和 NC); 还设转染试剂对照组(TransIntroTM EL)和空白细胞组(未转染)各 1 个。每组 3 次重复。将 293T 细胞接种于 6 孔板, 细胞培养基组成同上, 待细胞达到 70%汇合度时, 用 TransIntroTM EL 转染试剂(北京全式金生物技术股份有限公司)双转染 4 μg *CART* 基因过表达载体和 250 pmol 靶

miRNA mimics 至 293T 细胞, 5 h 后更换为完全培养液, 继续培养 24–48 h。

1.2.5 miRNA 和 CART mRNA 的相对表达量检测

293T 细胞双转染 24 h 后, 用 RT-qPCR 技术检测靶 miRNA 和 CART mRNA 的表达水平。TRIzol 试剂分离细胞总 RNA; Mir-X miRNA First-strand Synthesis Kit (TaKaRa Biomedical Technology) 进行 miRNA 的反转录; PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa Biomedical Technology) 进行 mRNA 反转录; TB Green® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa Biomedical Technology) 检测靶 miRNA 和 CART mRNA 的相对表达量, 引物序列见表 3; 实验具体操作按说明书要求进行。以 U6 与 β -actin 为内参基因, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值计算基因相对表达情况, 用 GraphPad Prism 软件对数据进行单因素方差分析。

1.2.6 Western blotting 分析蛋白表达水平

293T 细胞双转染 48 h 后, 使用 PBS 洗涤细胞 3 次; 每孔加入 200 μ L 蛋白裂解缓冲液(北京索莱宝科技有限公司), 裂解后的样品 14 000 r/min 离心 5 min, 取上清; 使用 Easy II Protein Quantitative Kit (北京全式金生物技术股份有限公司) 检测蛋白浓度, 根据检测结果统一各组蛋白浓度。每孔加入 52.5 μ g 蛋白样品后进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 当样品带跑至距胶板下沿 0.5 cm 时结束电泳; 分离对应条带后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 调节电流值 250 mA, 转膜 60 min; 将膜取下置于 5% 脱脂奶粉封闭液中封闭 1 h, 随后加入相应一抗稀释液: β -actin 单克隆抗体 (1:2 000; 康为世纪生物科技股份有限公司) 和 CART 多克隆抗体 (1:500; 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 次日使用三羟甲基氨基甲烷缓冲液洗膜后, 加入相应二抗

表 3 目的基因 RT-qPCR 引物序列

Table 3 Target gene primer sequences of RT-qPCR

Primer name	Primer sequence (5'→3')
β -actin-F	GGGACCTGACTGACTACCTC
β -actin-R	TCATACTCCTGCTTGCTGAT
CART-F	CCTGCTGCTGCTGCTACCTTTG
CART-R	CCACGGCGGAGTAGATGTCCAG
U6-F	GGAACGATACAGAGAAGATTAGC
U6-R	TGGAACGCTTCACGAATTTGCG
miR-377-F	TCGCATCACACAAAGGCAACTTTTGT
miR-331-3p-F	GCCCCTGGGCCTATCCTAG
miR-491-F	ATAGTGGGAACCCTTCCATGAGG
miR-493-F	TGAAGGTCTACTGTGTGCCAGG
miR-758-F	CCTTTGTGACCTGGTCCACTAACC
miR-877-F	ATATGTAGAGGAGATGGCGCAGGG
miR-381-F	CCGTATACAAGGGCAAGCTCTCTGT

稀释液: 山羊抗兔 IgG (1:5 000; 康为世纪生物科技股份有限公司) 和山羊抗小鼠 IgG (1:5 000; 康为世纪生物科技股份有限公司), 室温摇动 1 h; 洗膜后, 滴加化学发光液(康为世纪生物科技股份有限公司) 显影; 利用 ImageJ 软件对显影条带进行灰度定量分析, 以 β -actin 为内参, 计算 CART 与 β -actin 的灰度比值。

1.2.7 小鼠饲养及侧脑室注射

所有小鼠适应性喂养 1 周后随机分为 7 组 (agomiR-491 组、antagomiR-491 组、agomiR-381 组、antagomiR-381 组、NC 组、生理盐水组、空白组), 每组 10 只, 小鼠可自由进行水和食物的摄取。mmu-agomiRNA mimics, mmu-antagomiRNA mimics 与 NC 片段交由上海吉玛制药技术有限公司合成。将 miRNA mimics 与活体转染试剂 Entranster™-in vivo (北京英格恩生物科技股份有限公司) 恢复至室温, 用纯水将核酸稀释为 1.5 μ g/ μ L, 按照 1:2 的比例将 Entranster™-in vivo 加入到稀释后的核酸溶液, 振荡混匀后室温静置 15 min, 使用微量注射器(上海高鸽工贸有限公司) 进行侧脑室注射, 根据文献中的方法进行侧脑室注射^[15]。注射 72 h 后, 分离小鼠下丘脑组织, 液

氮速冻后在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存(动物实验方案由山西农业大学实验动物伦理委员会批准,批准号: SXAU-EAW-2022M.AB.002023200)。

1.2.8 小鼠下丘脑表达检测

将保存的小鼠下丘脑组织取出,在液氮中充分研磨。每 $50\text{--}100\text{ mg}$ 研磨完全的下丘脑组织加入 1 mL TRIzol 试剂,充分振荡混匀,室温放置 5 min 使其充分裂解。使用 RT-qPCR 技术检测小鼠下丘脑靶 miRNA 和 *CART* mRNA 表达水平,方法同上。将小鼠下丘脑组织剪切成细小的碎片,每 50 mg 组织加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ 裂解液,匀浆至充分裂解;将裂解后的样品 $14\ 000\text{ r/min}$ 离心 5 min ,取上清;Western blotting 检测小鼠下丘脑 *CART* 蛋白表达水平,方法同上。使用 ELISA 技术检测小鼠血清中 *CART* 水平;注射 72 h 后,摘眼球取血法收集小鼠血液,室温倾斜放置 2 h ;待血清自然析出后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\ 000\text{ r/min}$ 离心 10 min ,取上清液。根据小鼠 *CART* ELISA 试剂盒说明书(上海纪宁生物科技有限公司)测定血清中 *CART* 蛋白浓度,使用酶标仪测量 450 nm 处各孔 *OD* 值。

1.2.9 统计学分析

本研究中数值以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组比较采用单因素方差分析,两组比较采用 *t* 检验。 $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 牛 *CART* 基因过表达载体碱基数

EcoR I 和 *Bam*H I 双酶切回收的质粒使用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析,结果如图 1 所示,泳道 1 显示了双酶切得到的 *CART* mRNA+UTR (806 bp)和 pEX-3 骨架($4\ 000\text{ bp}$)。将 806 bp 处条带分离测序,结果与 NCBI 中牛 *CART* mRNA+UTR 序列(NM_001007820.3)进行比对,序列一致,证明重组过表达载体构建成功,可进行后续实验。

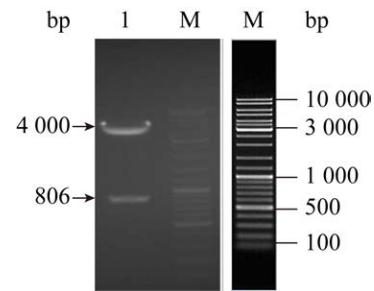


图 1 pEX-3-*CART* mRNA+UTR 过表达载体酶切产物电泳图

Figure 1 Electrophoretic image of the product of pEX-3-*CART* mRNA+UTR overexpression vector. M: DNA marker.

2.2 牛下丘脑 *CART*-miRNAs 靶向关系预测

TargetsCan 软件分析得到哺乳动物中 7 种 miRNA (miR-377、miR-331-3p、miR-491、miR-877、miR-758、miR-381 和 miR-493)可能靶向 *CART* 3'UTR (图 2);其中,miR-377 和 miR-331-3p 与 *CART* 3'UTR 结合的总 context++ 得分最高,miR-493 最低。

2.3 靶基因在牛下丘脑的表达

利用 RT-PCR 技术检测牛下丘脑靶基因的内源性表达,结果显示 7 个靶 miRNA 和 *CART* 基因均在牛下丘脑中表达(图 3),目标条带的测序结果与预期一致。

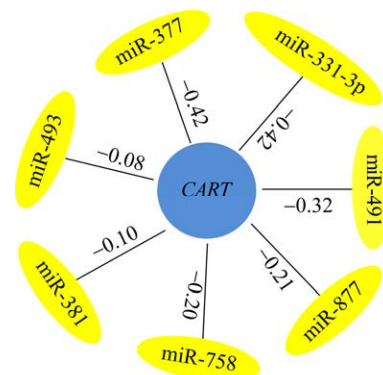


图 2 通过 TargetsCan 筛选的与 *CART* 互作 miRNA 及其总 context++ 得分

Figure 2 miRNA interacting with *CART* screened by TargetsCan and their total context++ score.

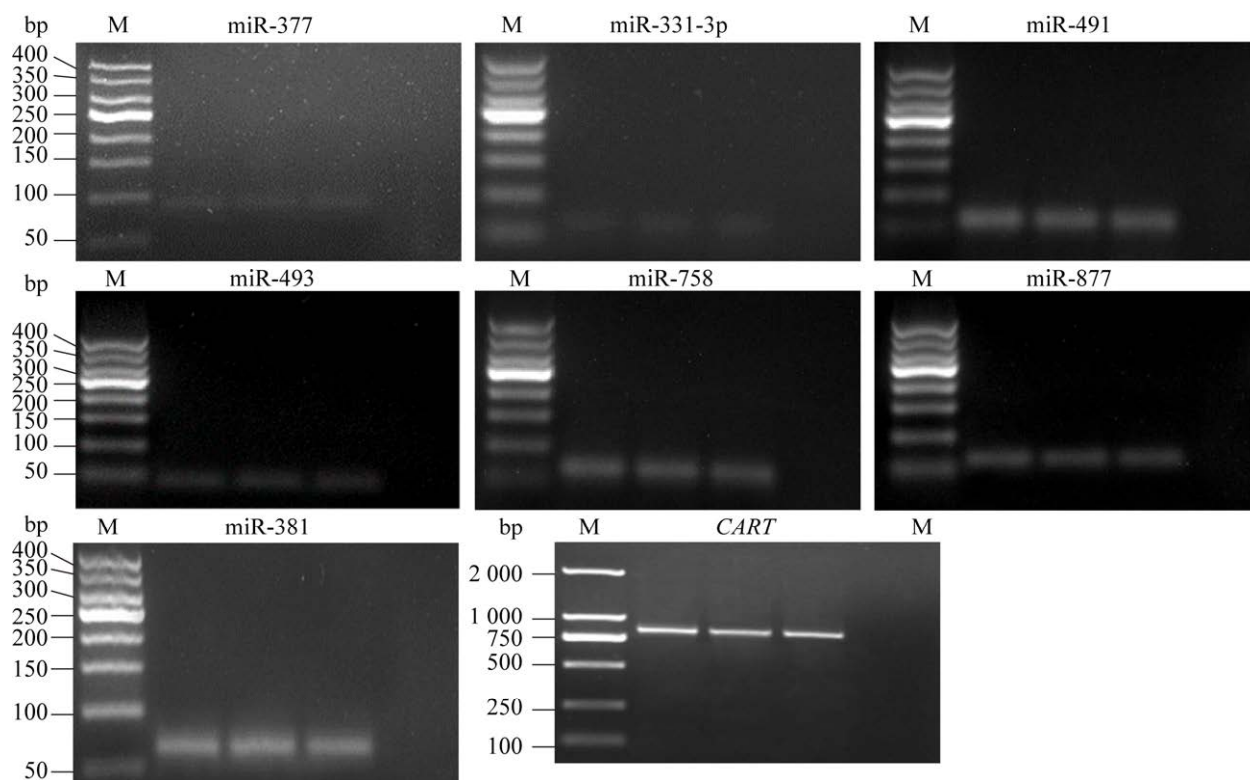


图3 *CART* 和靶 miRNA 在牛下丘脑的表达产物电泳图

Figure 3 Electrophoretic image of *CART* and target miRNA expression products in bovine hypothalamus ($n=3$). M: Marker.

2.4 靶 miRNA 与 *CART* 结合关系验证

将 *CART* 3'UTR 中与 7 个 miRNA 互补的片段构建到荧光素酶报告质粒(pmiRGLO)中,置于荧光素酶报告基因的下游;此外还构建了 7 个含有 *CART* 3'UTR 突变位点的质粒作为对照。*CART* 与 7 个靶 miRNA 的潜在结合位点以及 *CART* 3'UTR 的突变位点如图 4 所示。将含有野生型或突变型 *CART* 3'UTR 的质粒与 miRNA mimics 共转染 293T 细胞;转染野生型 *CART* 3'UTR 的细胞中,7 个 miRNA mimics 均显著抑制荧光素酶活性($P<0.05$),而转染突变型 *CART* 3'UTR 的细胞则没有抑制($P>0.05$,图 5),表明 *CART* 3'UTR 的 7 个结合位点都能够被相互作用的 miRNA 靶向;其中 miR-377 抑制作用最强($P<0.001$,图 5A),miR-493 抑制作用最弱

($P<0.05$,图 5D)。

2.5 靶 miRNA 对 *CART* 体外表达的影响

2.5.1 靶 miRNA 对外源性 *CART* 基因表达的影响

RT-qPCR 检测结果表明,7 个靶 miRNA 均过表达成功(图 6A-6G),且在 miRNA+*CART* 组中,靶 miRNA 与 *CART* mRNA 发生互作,降低了靶 miRNA 的相对表达量($P<0.000 1$)。RT-qPCR 检测 18 个分组中 *CART* mRNA 的相对表达量,结果如图 6H 所示:*CART* mRNA 在 7 个实验组及 NC+*CART* 组中均过表达,在 8 个阴性对照组、转染试剂对照组及空白组未检出,表明 pEX-3-*CART* mRNA+UTR 重组质粒成功转染 293T 细胞且完整表达出 *CART* mRNA+UTR 序列;7 个靶 miRNA 均可抑制 *CART* mRNA 的表达($P<0.000 1$),其中, bta-miR-491 抑制效果最

强, bta-miR-331-3p、bta-miR-877 抑制效果次之, bta-miR-377 和 bta-miR-758 抑制效果较弱, bta-miR-493 和 bta-miR-381 抑制效果最弱。

2.5.2 靶 miRNA 对外源性 CART 蛋白表达的影响

CART 过表达载体和靶 miRNA mimics 共转染 48 h 后, 采用 Western blotting 检测过表达靶 miRNA 对 293T 细胞 CART 蛋白表达的影响。与 NC 相比, 7 个靶 miRNA 中, miR-758 和 miR-877 对 CART 蛋白表达无影响($P>0.05$), miR-377、miR-331-3p、miR-491、miR-493 和 miR-381 显著降低 CART 蛋白表达($P<0.05$), 其中 miR-381 抑制作用最强($P<0.001$, 图 7)。

2.6 干扰和过表达 miR-491/381 对小鼠内源性 CART 表达的影响

选择体外实验中对 CART mRNA 抑制作用最强的 miR-491 和对 CART 蛋白抑制作用最强的 miR-381, 进一步评估它们对内源性 CART

表达的影响。通过侧脑室注射 agomiR-491/381 mimics 或 antagomiR-491/381 mimics 对小鼠下丘脑 miR-491/381 进行过表达或敲除(图 8A、8B)。侧脑室注射对小鼠摄食量(图 9A)和体重(图 9B)无显著影响($P>0.05$)。注射 72 h 后检测小鼠下丘脑中 CART 表达, 与对照组相比, agomiR-491/381 处理极显著降低了 CART mRNA ($P<0.0001$, 图 8C)和 CART 蛋白($P<0.05$, 图 10A、10B)的表达; antagomiR-491/381 处理极显著增加小鼠下丘脑中 CART mRNA ($P<0.0001$, 图 8C)和 CART 蛋白($P<0.01$, 图 10A、10B)的表达。使用 ELISA 技术进一步探究 miR-491/381 是否会影响小鼠血清中 CART 浓度, 与对照组相比, agomiR-491/381 处理后血清 CART 浓度极显著降低($P<0.01$); 相反, antagomiR-491/381 处理后血清 CART 浓度则上调($P<0.01$, 图 10C)。

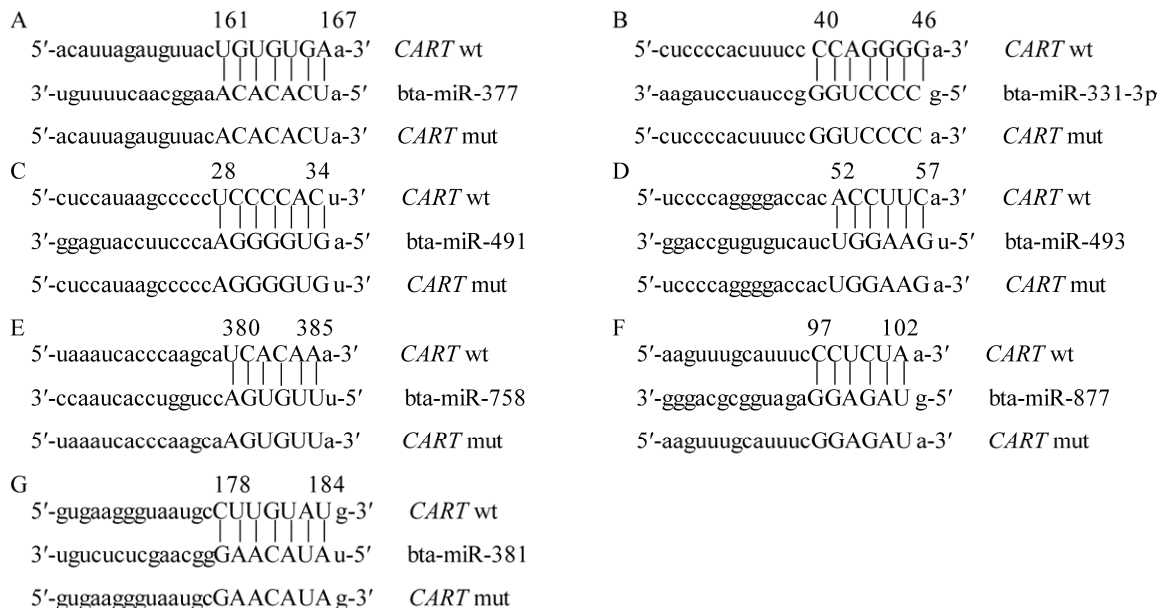


图 4 CART 结合序列、突变序列与相关 miRNA

Figure 4 Schema of the wild-type and mutated CART 3'UTR indicating the interaction sites between miRNA and the 3'UTR of CART. CART wt: Wild-type sequences of CART 3'UTR binding site. CART mut: Mutant sequences of CART 3'UTR binding site.

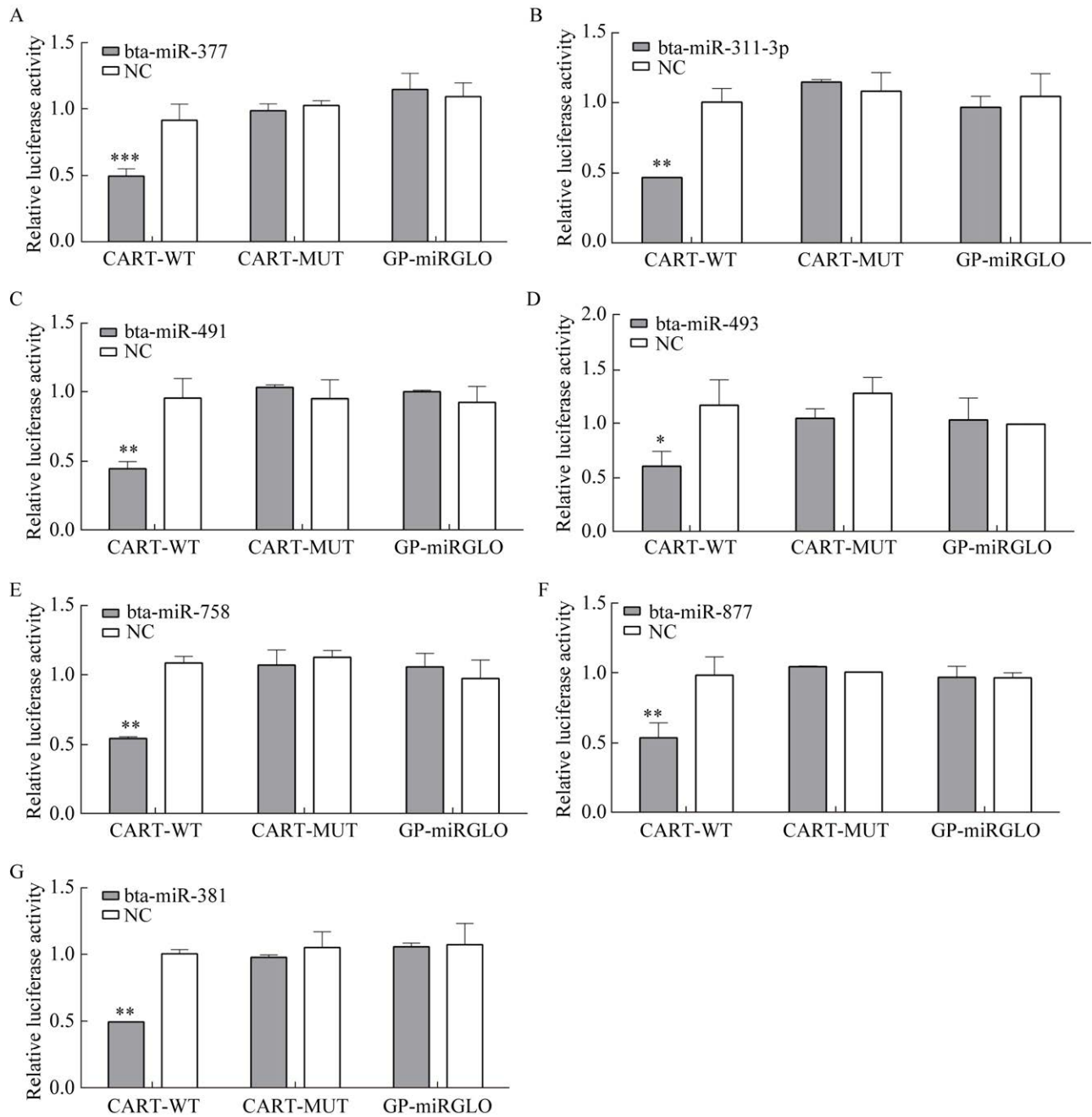


图5 双荧光素报告实验检测牛 *CART* 与靶 miRNA 的靶标关系

Figure 5 Targeted regulation of *CART* by related miRNA detected by dual luciferase reporter assay system. A–G: Dual luciferase assay in 293T cells co-transfected with the miRNA mimic and reporter vectors containing either the wild-type or mutated 3'UTR of *CART*. The renilla luciferase activity was normalized to the firefly luciferase activity. *CART*-WT: Wild-type sequences of *CART* 3'UTR binding site constructed on pmiRGLO plasmid. *CART*-MUT: Mutant sequences of *CART* 3'UTR binding site constructed on pmiRGLO plasmid. GP-miRGLO: Empty vector. NC: Negative control of miRNA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with NC.

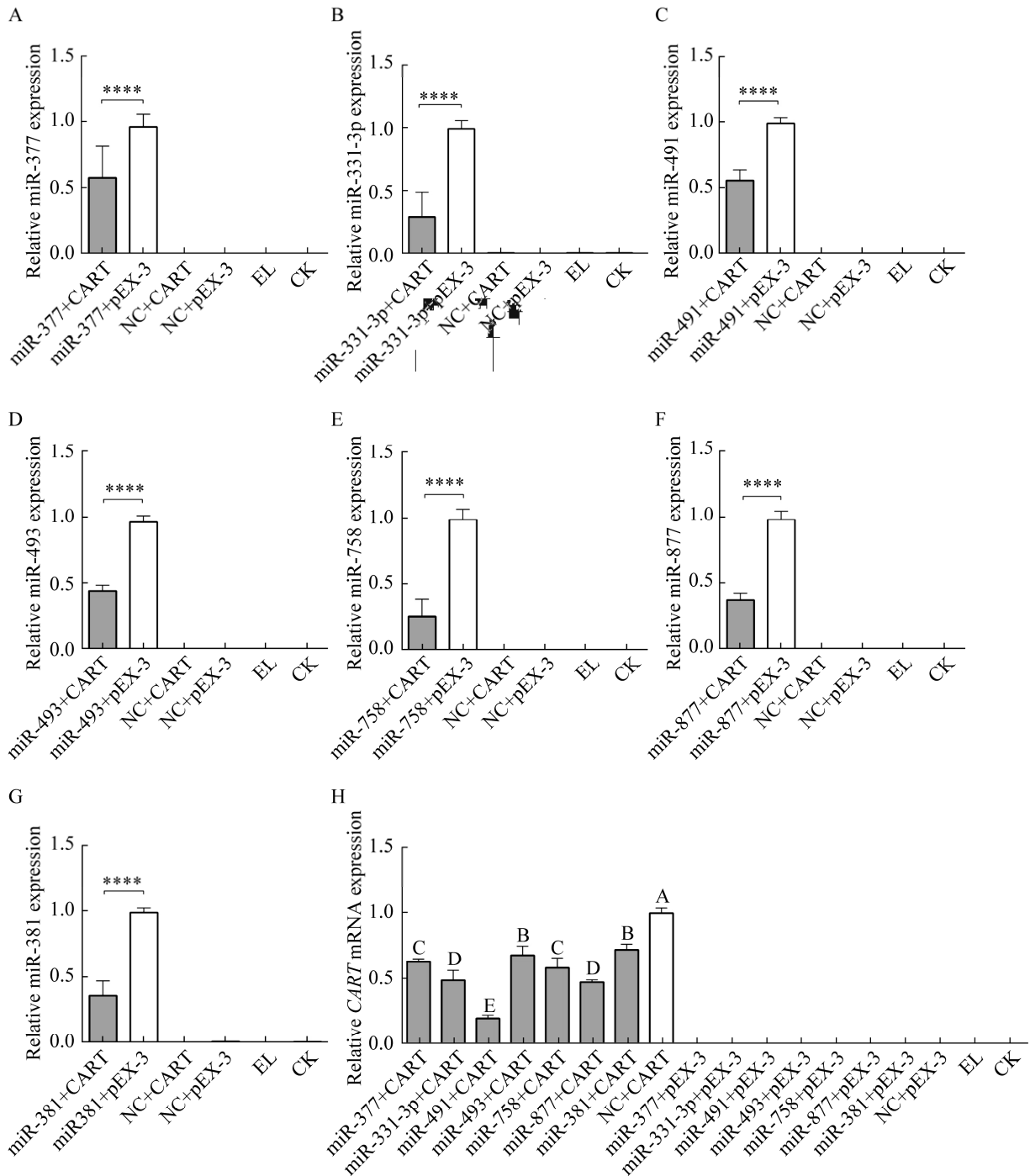


图 6 七种靶 miRNA 显著抑制 *CART* mRNA 的表达

Figure 6 Seven miRNA significantly inhibited the expression of *CART* mRNA. A–G: miRNA expression in 293T cells after miRNA/NC treatment by RT-qPCR ($n=3$). **** $P<0.0001$ compared with miRNA+pEX-3 groups. H: RT-qPCR analysis of *CART* mRNA expression in 293T cells after miRNA/NC treatment ($n=3$). Different letters indicate significant difference between different groups ($P<0.0001$), and the same superscript letters indicate insignificant difference ($P>0.05$). EL: TransIntroTM EL transfection reagent group; CK: Control check group.

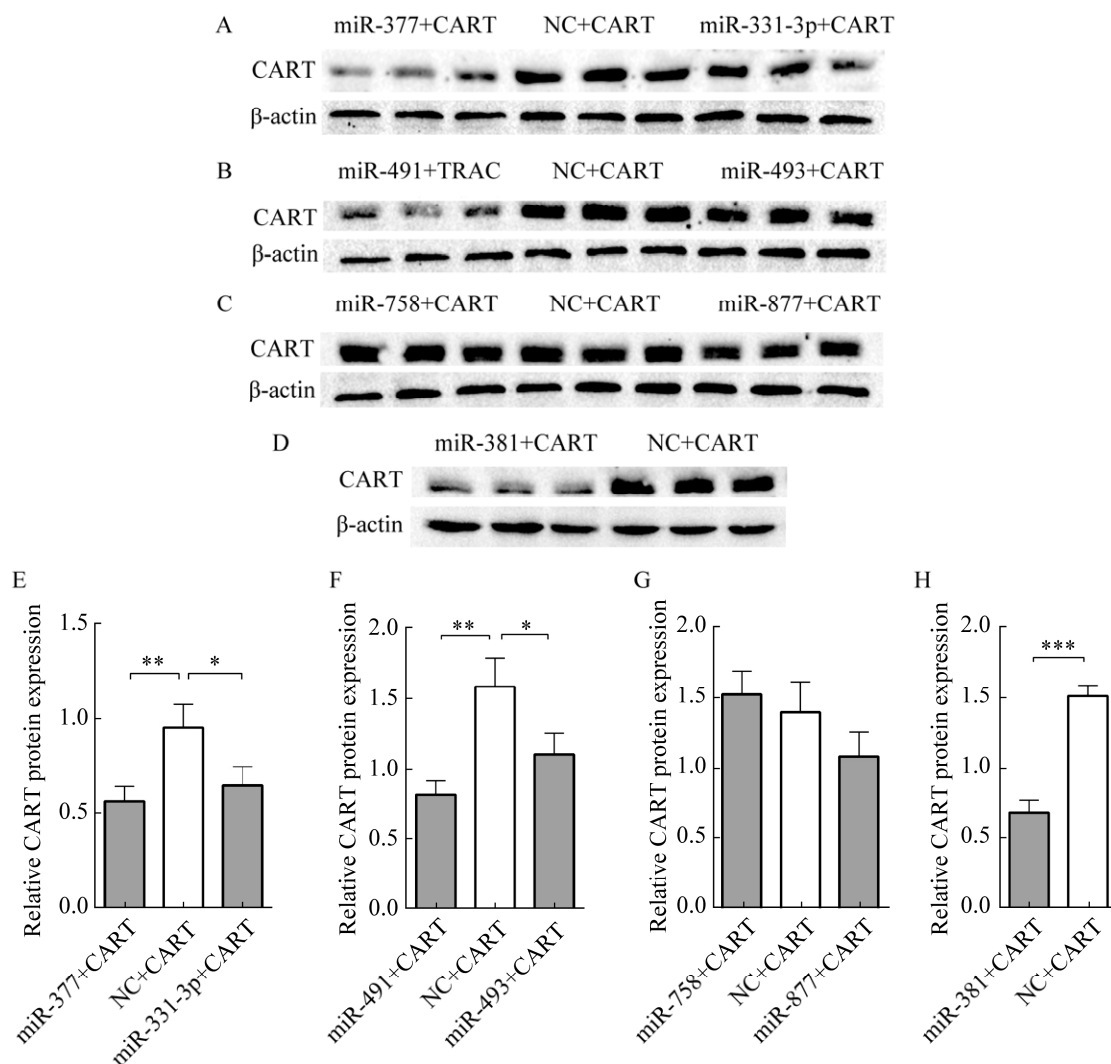


图7 五种 miRNA 显著抑制 CART 蛋白表达

Figure 7 Five miRNA significantly inhibited the expression of CART protein. A: Western blotting results showed that the miR-377 and miR-331-3p, but not NC, inhibited the expression of CART protein in 293T cells ($n=3$). B: Compared with NC, miR-491 and miR-493 treatments significantly reduced the CART protein expression ($n=3$). C: miR-758 and miR-877 had no significant effect on the expression of CART protein in 293T cells ($n=3$). D: miR-381 declined the CART protein expression in the 293T cells ($n=3$). E–H: Semi-quantitative densitometric analysis by Image J. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with NC+CART group.

3 讨论

CART 广泛分布于神经系统, 参与免疫功能、应激、体液平衡、内分泌调控等多种生理功能的调节^[16-19]。研究发现, CART 是一种厌食肽, 在减少食物摄入的代谢刺激下表达上调,

在禁食和肥胖时下调^[20-21]。miRNA 是一种小型单链 RNA, 通过与靶基因 mRNA 3'UTR 不完全互补配对在转录后水平调节靶基因表达^[10]。本研究通过生物信息学分析初步筛选出哺乳动物中可能与 CART 3'UTR 互作的 7 个 miRNA, 且 7 个靶 miRNA 均在牛下丘脑表达。miRNA 与

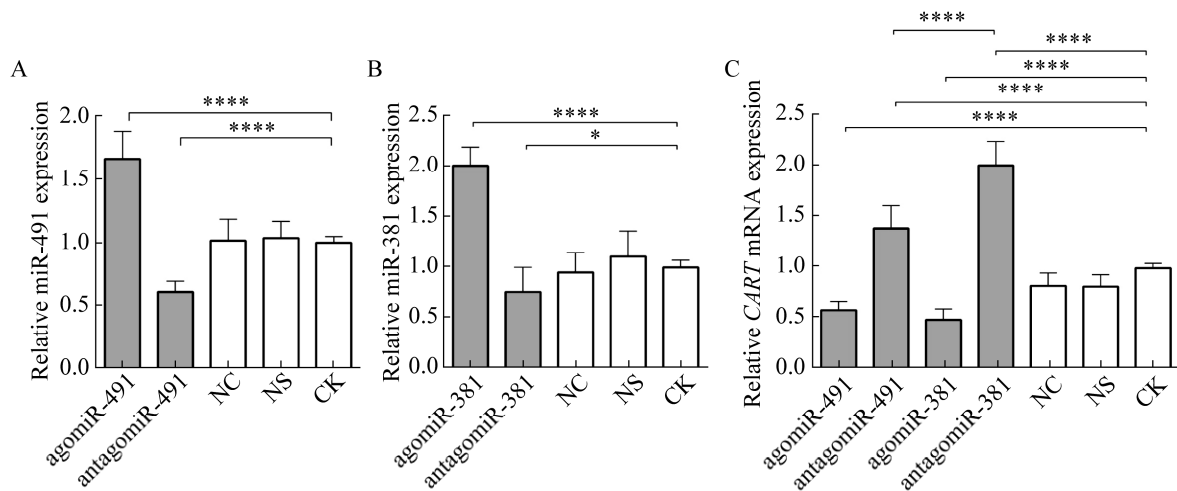


图 8 miR-491 和 miR-381 对小鼠下丘脑 *CART* mRNA 表达量的影响

Figure 8 Effects of miR-491 and miR-381 on the expression of *CART* mRNA in the mouse hypothalamus. A–B: RT-qPCR analysis of miR-491 or miR-381 expression in mice hypothalamus after 72 h of receiving ICV injection ($n=9$). C: RT-qPCR analysis of mRNA levels of *CART* in mice hypothalamus after 72 h of receiving ICV injection of agomiR-491, antagomiR-491, agomiR-381, antagomiR-381, NC, NS, and the untreated control ($n=9$). NC: Negative control of miRNA; NS: Normal saline; CK: Control check. * $P<0.05$, **** $P<0.0001$ compared with CK.

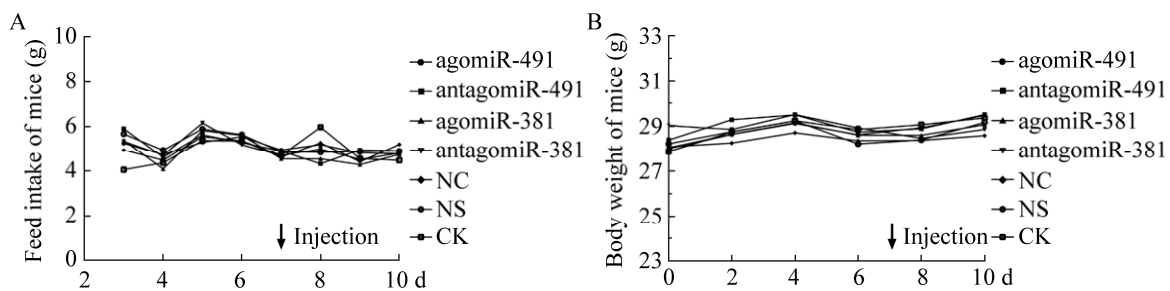


图 9 侧脑室注射对小鼠采食量和体重的影响

Figure 9 Effects of intracerebroventricular injection on feed intake and body weight of mice. A: After 72 h of pre feeding, the feed intake of mice was measured every 24 h. No significant difference of food intake was found between the injection groups and the untreated control after ICV injection on day 7. B: After 0 h of pre feeding, the body weight of mice was measured every 48 h. No significant difference in body weight was found between the injection groups and the untreated control after ICV injection on day 7. NC: Negative control of miRNA; NS: Normal saline; CK: Control check.

靶基因 3'UTR 结合位点的靶向关系是调控靶基因表达的基础^[22]。双荧光素酶报告基因检测系统由萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶组成,通过检测荧光量来判断酶的活性,进而反映基因间的关系,是一项公认的验证核酸靶向关系的技术。张力懿等^[23]通过双荧光素酶报告基因实验验证 miR-23b-3p 与磷酸二酯酶 4B

(phosphodiesterase 4B, *PDE4B*)具有靶向关系,后续进一步证明 miR-23b-3p 通过靶向 *PDE4B* 调控山羊肌内前体脂肪细胞的分化。本研究中双荧光素酶报告基因实验结果表明 7 个靶 miRNA 对 *CART* 3'UTR 预测位点均有靶向关系,为靶 miRNA 调节下丘脑 *CART* 的表达提供了可能性。

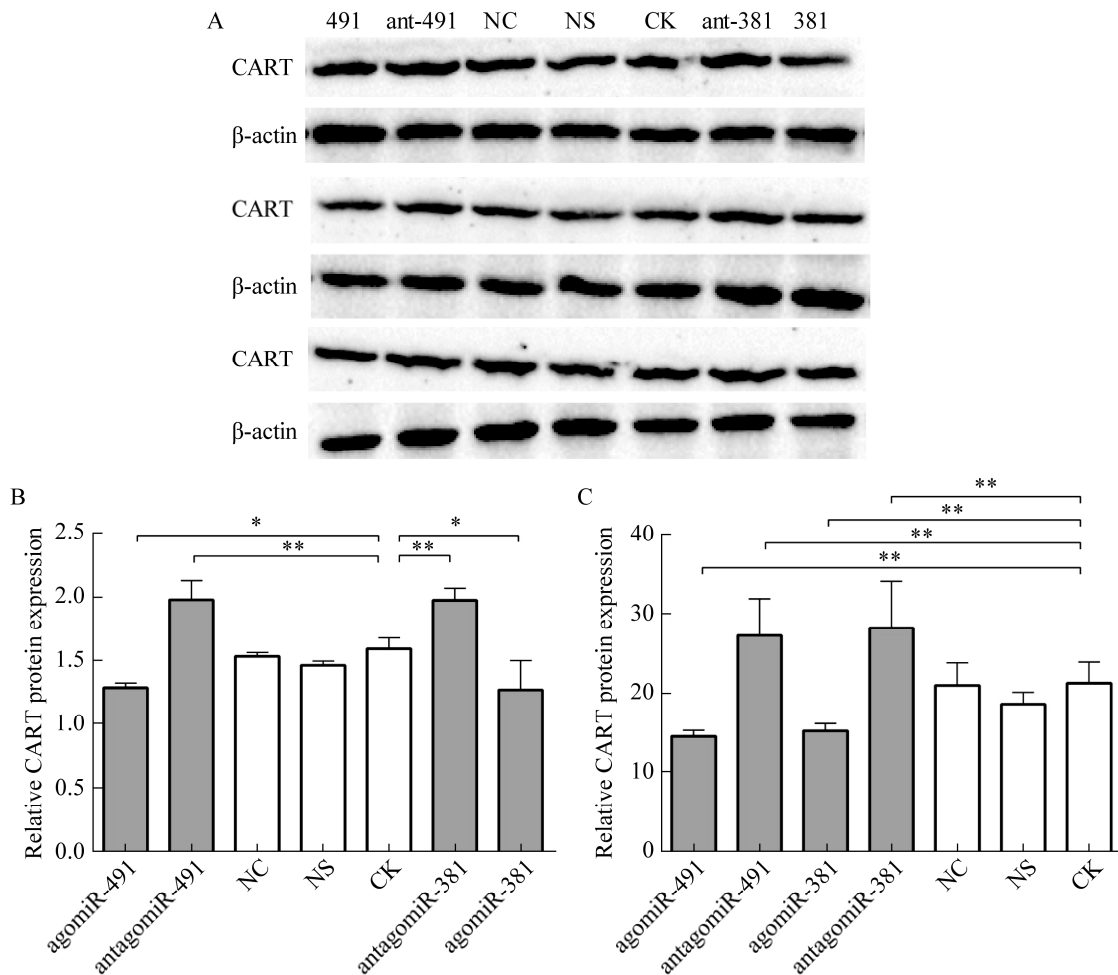


图 10 miR-491 和 miR-381 对小鼠下丘脑 CART 蛋白表达量的影响

Figure 10 Effects of miR-491 and miR-381 on the expression of CART protein in the mouse hypothalamus. A: Levels of CART protein in mice hypothalamus were determined by Western blotting analysis ($n=3$). 491: agomiR-491; ant-491: antagomiR-491; 381: agomiR-381; ant-381: antagomiR-381. B: Semi-quantitative densitometric analysis by Image J. C: Levels of CART protein in mice serum were determined by ELISA ($n=7$). NC: Negative control of miRNA; NS: Normal saline; CK: Control check. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with CK.

为筛选调控牛下丘脑 CART 表达的关键 miRNA, 本研究进一步将靶 miRNA 与 CART 基因过表达载体双转染 293T 细胞, 293T 细胞极少表达细胞外配体所需的内生受体, 且比较容易转染, 是常用的研究外源基因表达的细胞株。比较 7 个靶 miRNA 对下丘脑 CART 的抑制作用发现 miR-758 和 miR-877 仅能抑制外源 CART mRNA 的表达; miR-377、miR-331-3p、miR-491、miR-493 和 miR-381 可抑制外源 CART

mRNA 和 CART 蛋白的表达, 其中 miR-491 对 CART mRNA 抑制作用最强; miR-381 对 CART 蛋白抑制作用最强。CART 通过促肾上腺皮质激素释放因子 (corticotropin-releasing factor, CRF) 依赖性中枢机制调节下丘脑-垂体-肾上腺 (hypothalamus-pituitary-adrenal, HPA) 轴的活性, 原位杂交显示肾上腺切除大鼠下丘脑室旁核和弓状核中 CART mRNA 水平降低^[24-26]。miR-375 作为介导 CRF 信号通路的负调控因

子, 通过靶向丝裂原活化蛋白激酶 8 来影响阿黑皮素原的表达, 随后下调细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK1/2)磷酸化和神经生长因子诱导的克隆 B 转录活性^[27-28]。Gao 等^[29]发现, 在阿黑皮素原神经元中特异性敲低 miR-7 或 miR-17-92 会加重小鼠饮食诱导的肥胖。Ji 等^[30]研究表明, miR-10b 可通过调节延边黄牛垂体细胞生长抑素受体 2 (somatostatin receptor 2, *SSTR2*)基因的表达来调节生长激素(growth hormone, GH)水平。以上研究表明 miRNA 在中枢神经系统发挥重要调节作用, 这是本研究进行预测的基础。

目前对 miR-491 和 miR-381 的功能研究主要集中于乳腺癌、头颈鳞状细胞癌等疾病, 对其调节摄食和体重的功能报道较少^[31-32]。因此本研究选择体外实验中对 CART 表达抑制效果最强的 miR-491/381 进行动物体内验证。牛体内 miR-491/381 的成熟序列与小鼠完全相同, 两者与牛体内 *CART* mRNA 3'UTR 的结合位点也与小鼠相同。*CART* 在牛和小鼠下丘脑区域生理功能类似, 且 miRNA 过表达、沉默的小鼠模型成本低, 操作过程简便, 因此选择小鼠代替牛进行体内验证。小鼠体内实验数据表明, 过表达 miR-491/381 降低了小鼠下丘脑内源性 *CART* 表达, 干扰 miR-491/381 后取得相反结果, 且 miR-491/381 还会进一步影响小鼠血清中 *CART* 浓度。*CART* 在动物体内广泛分布, 血液中 *CART* 水平也与中枢神经系统中 *CART* 表达相关。垂体 *CART* 的日变化与血液中的变化相似, 血浆 *CART* 的变化反映了垂体前叶 *CART* 表达的变化^[33-34]。本研究的结果提示 miR-491/381 可能通过调节下丘脑 *CART* 的表达来影响血液 *CART* 水平, 与前人研究基本一致。

本研究发现调节牛下丘脑 *CART* 表达的主要 miRNA 为 miR-491 和 miR-381, 二者会进一

步影响血液 *CART* 水平。然而, 在注射 miRNA 72 h 内, 小鼠摄食量和体重未见明显变化, 这可能与注射 miRNA 剂量小、测量时间短、样本数量少有关。未来的研究方向是进一步探究 miR-491 和 miR-381 靶向下丘脑 *CART* 后对牛摄食量和增重的调节作用。

4 结论

本研究发现了牛下丘脑 7 个靶 miRNA 均可靶向 *CART*, 且 miR-491 和 miR-381 是调节 *CART* 表达的关键 miRNA; 小鼠活体实验进一步证明 miR-491 和 miR-381 可调节下丘脑 *CART* 内源性表达, 并影响血清 *CART* 浓度, 这为研究二者对牛下丘脑摄食和增重的调节作用奠定了实验基础。

REFERENCES

- [1] DOUGLASS J, MCKENZIE AA, COUCEYRO P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine[J]. *The Journal of Neuroscience*, 1995, 15(3 Pt 2): 2471-2481.
- [2] 沈向华, 范奎奎, 潘登, 李婷, 李强, 杜晨光. 可卡因-苯丙胺调节转录肽(CART)在绵羊下丘脑中的分布[J]. *中国兽医学报*, 2018, 38(8): 1580-1584. SHEN XH, FAN KK, PAN D, LI T, LI Q, DU CG. Distribution of cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) expression in the hypothalamus of sheep[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2018, 38(8): 1580-1584 (in Chinese).
- [3] BODAS DS, MADUSKAR A, KANIGANTI T, WAKHLOO D, BALASUBRAMANIAN A, SUBHEDAR N, GHOSE A. Convergent energy state-dependent antagonistic signaling by cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and neuropeptide Y (NPY) modulates the plasticity of forebrain neurons to regulate feeding in zebrafish[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2023, 43(7): 1089-1110.
- [4] LEE SJ, KRIEGER JP, VERGARA M, QUINN D, McDOUGLE M, de ARAUJO A, DARLING R, ZOLLINGER B, ANDERSON S, PAN A, SIMONNET EJ, PIGNALOSA A, ARNOLD M, SINGH A, LANGHANS W, RAYBOULD HE, de LARTIGUE G.

- Blunted vagal cocaine- and amphetamine-regulated transcript promotes hyperphagia and weight gain[J]. *Cell Reports*, 2020, 30(6): 2028-2039.e4.
- [5] MALETÍNSKÁ L, MAIXNEROVÁ J, MATYSKOVÁ R, HAUGVICOVÁ R, PIRNÍK Z, KISS A, ZELEZNÁ B. Synergistic effect of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin on food intake regulation in lean mice[J]. *BMC Neuroscience*, 2008, 9: 101.
- [6] LARSEN PJ, VRANG N, PETERSEN PC, KRISTENSEN P. Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42-89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (*fa/fa*) rats[J]. *Obesity Research*, 2000, 8(8): 590-596.
- [7] SKIBICKA KP, ALHADEFF AL, GRILL HJ. Hindbrain cocaine- and amphetamine-regulated transcript induces hypothermia mediated by GLP-1 receptors[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2009, 29(21): 6973-6981.
- [8] VENANCIO JC, MARGATHO LO, RORATO R, ROSALES RRC, DEBARBA LK, COLETTI R, ANTUNES-RODRIGUES J, ELIAS CF, ELIAS LLK. Short-term high-fat diet increases leptin activation of CART neurons and advances puberty in female mice[J]. *Endocrinology*, 2017, 158(11): 3929-3942.
- [9] SINGH O, KUMAR S, SINGH U, KUMAR V, LECHAN RM, SINGRU PS. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) in the brain of zebra finch, *Taeniopygia guttata*: organization, interaction with neuropeptide Y, and response to changes in energy status[J]. *The Journal of Comparative Neurology*, 2016, 524(15): 3014-3041.
- [10] ALKAN AH, AKGÜL B. Endogenous miRNA sponges[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2022, 2257: 91-104.
- [11] DIEDERICH S, HABER DA. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression[J]. *Cell*, 2007, 131(6): 1097-1108.
- [12] PRICE NL, SINGH AK, ROTLLAN N, GOEDEKE L, WING A, CANFRÁN-DUQUE A, DIAZ-RUIZ A, ARALDI E, BALDÁN Á, CAMPOREZ JP, SUÁREZ Y, RODEHEFFER MS, SHULMAN GI, de CABO R, FERNÁNDEZ-HERNANDO C. Genetic ablation of miR-33 increases food intake, enhances adipose tissue expansion, and promotes obesity and insulin resistance[J]. *Cell Reports*, 2018, 22(8): 2133-2145.
- [13] CRÉPIN D, BENOMAR Y, RIFFAULT L, AMINE H, GERTLER A, TAOUIS M. The over-expression of miR-200a in the hypothalamus of *ob/ob* mice is linked to leptin and insulin signaling impairment[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 384(1-2): 1-11.
- [14] XUE XX, LEI HQ, ZHAO L, WANG XY, WANG Z, XIE LY, JIA JH. MiR-185-3p downregulates advanced glycosylation end product receptor expression and improves renal function in diabetic nephropathy mice[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2020, 24(9): 5018-5027.
- [15] HUANG L, MA QY, LI Y, LI B, ZHANG LB. Inhibition of microRNA-210 suppresses pro-inflammatory response and reduces acute brain injury of ischemic stroke in mice[J]. *Experimental Neurology*, 2018, 300: 41-50.
- [16] SINGH A, de ARAUJO AM, KRIEGER JP, VERGARA M, IP CK, de LARTIGUE G. Demystifying functional role of cocaine- and amphetamine-related transcript (CART) peptide in control of energy homeostasis: a twenty-five year expedition[J]. *Peptides*, 2021, 140: 170534.
- [17] AHMADIAN-MOGHADAM H, SADAT-SHIRAZI MS, ZARRINDAST MR. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART): a multifaceted neuropeptide[J]. *Peptides*, 2018, 110: 56-77.
- [18] LAU J, HERZOG H. CART in the regulation of appetite and energy homeostasis[J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2014, 8: 313.
- [19] SANCHEZ-NAVARRO MJ, BORNER T, REINER BC, CRIST RC, SAMSON WK, YOSTEN GLC, STEIN L, HAYES MR. GPR-160 receptor signaling in the dorsal vagal complex of male rats modulates meal microstructure and CART-mediated hypophagia[J]. *Nutrients*, 2023, 15(10): 2268.
- [20] YOSTEN GLC, HADDOCK CJ, HARADA CM, ALMEIDA-PEREIRA G, KOLAR GR, STEIN LM, HAYES MR, SALVEMINI D, SAMSON WK. Past, present and future of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide[J]. *Physiology & Behavior*, 2021, 235: 113380.
- [21] TACHIBANA T, TAKAGI T, TOMONAGA S, OHGUSHI A, ANDO R, DENBOW DM, FURUSE M. Central administration of cocaine- and amphetamine-regulated transcript inhibits food intake in chicks[J]. *Neuroscience Letters*, 2003, 337(3): 131-134.
- [22] WAHID F, SHEHZAD A, KHAN T, KIM YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, 1803(11): 1231-1243.
- [23] 张力懿, 李鑫, 许晴, 黄心竹, 李艳艳, 刘伟, 王友利, 林亚秋. MiR-23b-3p 通过靶向 *PDE4B* 基因调控

- 山羊肌内前体脂肪细胞的分化[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4887-4900.
- ZHANG LY, LI X, XU Q, HUANG XZ, LI YY, LIU W, WANG YL, LIN YQ. MiR-23b-3p regulates the differentiation of goat intramuscular preadipocytes by targeting the *PDE4B* gene[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4887-4900 (in Chinese).
- [24] BALKAN B, KESER A, GOZEN O, KOYLU EO, DAGCI T, KUHAR MJ, POGUN S. Forced swim stress elicits region-specific changes in CART expression in the stress axis and stress regulatory brain areas[J]. Brain Research, 2012, 1432: 56-65.
- [25] SMITH SM, VAUGHAN JM, DONALDSON CJ, RIVIER J, LI CE, CHEN A, VALE WW. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis through a corticotropin-releasing factor receptor-dependent mechanism[J]. Endocrinology, 2004, 145(11): 5202-5209.
- [26] VRANG N, LARSEN PJ, TANG-CHRISTENSEN M, LARSEN LK, KRISTENSEN P. Hypothalamic cocaine-amphetamine regulated transcript (CART) is regulated by glucocorticoids[J]. Brain Research, 2003, 965(1-2): 45-50.
- [27] WANG ZJ, GAI YD, ZHOU JL, LIU JL, CUI S. MiR-375 mediates the CRF signaling pathway to regulate catecholamine biosynthesis by targeting Sp1 in porcine adrenal gland[J]. Stress, 2019, 22(3): 332-346.
- [28] ZHANG N, LIN JK, CHEN J, LIU XF, LIU JL, LUO HS, LI YQ, CUI S. MicroRNA 375 mediates the signaling pathway of corticotropin-releasing factor (CRF) regulating pro-opiomelanocortin (POMC) expression by targeting mitogen-activated protein kinase 8[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(15): 10361-10373.
- [29] GAO YX, LI JH, ZHANG Z, ZHANG RH, POLLOCK A, SUN T. MicroRNA miR-7 and miR-17-92 in the arcuate nucleus of mouse hypothalamus regulate sex-specific diet-induced obesity[J]. Molecular Neurobiology, 2019, 56(11): 7508-7521.
- [30] JI JX, JIN TH, LOU AG, ZHANG R, CHEN YY, XIANG SY, CUI CY, YU LZ, GUAN LZ. The effect of miR-10b on growth hormone in pituitary cells of Yanbian yellow cattle by somatostatin receptor 2[J]. Animal Science Journal, 2020, 91(1): e13420.
- [31] TAN GZ, LI M, TAN X, SHI ML, MOU K. MiR-491 suppresses migration and invasion *via* directly targeting TPX2 in breast cancer[J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2019, 23(22): 9996-10004.
- [32] MA HF, LV GX, ZHANG DH. MiR-381 mediates the development of head and neck squamous cell carcinoma *via* targeting STC2[J]. OncoTargets and Therapy, 2020, 13: 4485-4493.
- [33] STANLEY SA, MURPHY KG, BEWICK GA, KONG WM, OPACKA-JUFFRY J, GARDINER JV, GHATEI M, SMALL CJ, BLOOM SR. Regulation of rat pituitary cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) by CRH and glucocorticoids[J]. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, 2004, 287(3): E583-E590.
- [34] VICENTIC A, DOMINGUEZ G, HUNTER RG, PHILPOT K, WILSON M, KUHAR MJ. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide levels in blood exhibit a diurnal rhythm: regulation by glucocorticoids[J]. Endocrinology, 2004, 145(9): 4119-4124.

(本文责编 郝丽芳)