

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

张力懿¹, 李鑫^{1,2}, 许晴^{1,2}, 黄心竹¹, 李艳艳^{1,2}, 刘伟^{1,2*}, 王友利^{1,2}, 林亚秋^{1,2*}

1 西南民族大学畜牧兽医学院, 四川 成都 610041

2 西南民族大学 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部四川省重点实验室, 四川 成都 610041

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 Liyi, LI Xin, XU Qing, HUANG Xinzhu, LI Yanyan, LIU Wei, WANG Youli, LIN Yaqiu. 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.

摘要: 本研究旨在明确 miR-23b-3p 对山羊肌内前体脂肪细胞分化的影响, 并确定这种作用是通过靶向基因 *PDE4B* 来实现的。基于实验室前期转录组测序结果, 以筛选得到的山羊肌内脂肪细胞分化前后差异表达的 miR-23b-3p 为切入点, 利用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative-polymerase chain reaction, qPCR) 技术检测 miR-23b-3p 在山羊肌内前体脂肪细胞分化过程中的表达模式, 从形态学水平和分子水平确定 miR-23b-3p 对脂肪分化及脂肪分化标志基因的影响; 利用生物信息学预测以及双荧光素酶报告基因试验确定 miR-23b-3p 的下游靶基因, 明确 miR-23b-3p 与预测靶标基因的靶向关系。结果表明, 过表达 miR-23b-3p 后山羊肌内脂肪细胞脂滴积聚减少, 成脂标志基因 *AP2*、*C/EBP α* 、*FASN*、*LPL* 表达水平极显著下调 ($P < 0.01$), *C/EBP β* 、*DGAT2*、*GLUT4* 和 *PPAR γ* 的表达水平显著下调 ($P < 0.05$)。干扰 miR-23b-3p 表达后, 山羊肌内脂肪细胞中脂滴积聚增多, *ACC*、*ATGL*、*AP2*、*DGAT2*、*GLUT4*、*FASN* 和 *SREBP1* 表达水平极显著上调 ($P < 0.01$), *C/EBP β* 、*LPL* 和 *PPAR γ* 的表达水平显著上调 ($P < 0.05$)。通过生物信息学分析预测, *PDE4B* 可能为 miR-23b-3p 的靶标基因, 且过表达 miR-23b-3p 后极显著降低 *PDE4B* 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$), 干扰 miR-23b-3p 后 *PDE4B* 的 mRNA 水平得到了显著提升 ($P < 0.05$)。双荧光素酶报告基因试验结果表明, miR-23b-3p 与 *PDE4B* 基因存在靶向关系。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。

关键词: 山羊; miR-23b-3p; *PDE4B*; 肌内脂肪细胞分化; 双荧光素酶报告基因试验

资助项目: 国家自然科学基金(32072723, 31902154); 四川省应用基础研究计划重点项目(2022JDTD0030); 西南民族大学研究生创新型科研项目(ZD2022683)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072723, 31902154), the Key Project of Sichuan Province Applied Basic Research Program (2022JDTD0030), and the Southwest Minzu University for Nationalities Graduate Innovative Research Project (ZD2022683).

*Corresponding authors. E-mail: LIN Yaqiu, 22100075@swun.edu.cn; LIU Wei, 22100098@swun.edu.cn

Received: 2023-03-02; Accepted: 2023-04-17; Published online: 2023-04-20

miR-23b-3p regulates the differentiation of goat intramuscular preadipocytes by targeting the *PDE4B* gene

ZHANG Liyi¹, LI Xin^{1,2}, XU Qing^{1,2}, HUANG Xinzhu¹, LI Yanyan^{1,2}, LIU Wei^{1,2*}, WANG Youli^{1,2}, LIN Yaqui^{1,2*}

1 College of Animal & Veterinary Sciences, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

2 Sichuan Province Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau Animal Genetic Resource Reservation and Utilization, Ministry of Education, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

Abstract: This study aimed to explore the effect of miR-23b-3p on the differentiation of goat intramuscular preadipocytes, and to confirm whether miR-23b-3p plays its roles *via* targeting the *PDE4B* gene. Based on the pre-transcriptome sequencing data obtained previously, the miR-23b-3p, which was differentially expressed in goat intramuscular adipocytes before and after differentiation, was used as an entry point. real-time quantitative-polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the expression pattern of miR-23b-3p during the differentiation of goat intramuscular preadipocytes. The effects of miR-23b-3p on adipose differentiation and adipose differentiation marker genes were determined at the morphological and molecular levels. The downstream target genes of miR-23b-3p were determined using bioinformatics prediction as well as dual luciferase reporter assay to clarify the targeting relationship between miR-23b-3p and the predicted target genes. The results indicated that overexpression of miR-23b-3p reduced lipid droplet accumulation in goat intramuscular adipocytes, significantly down-regulated the expression levels of adipogenic marker genes *AP2*, *C/EBP α* , *FASN*, and *LPL* ($P < 0.01$). In addition, the expressions of *C/EBP β* , *DGAT2*, *GLUT4* and *PPAR γ* were significantly downregulated ($P < 0.05$). After interfering with the expression of miR-23b-3p, lipid droplet accumulation was increased in goat intramuscular adipocytes. The expression levels of *ACC*, *ATGL*, *AP2*, *DGAT2*, *GLUT4*, *FASN* and *SREBP1* were extremely significantly up-regulated ($P < 0.01$), and the expression levels of *C/EBP β* , *LPL* and *PPAR γ* were significantly up-regulated ($P < 0.05$). It was predicted that *PDE4B* might be a target gene of miR-23b-3p. The mRNA expression level of *PDE4B* was significantly decreased after overexpression of miR-23b-3p ($P < 0.01$), and the interference with miR-23b-3p significantly increased the mRNA level of *PDE4B* ($P < 0.05$). The dual luciferase reporter assay indicated that miR-23b-3p had a targeting relationship with *PDE4B* gene. MiR-23b-3p regulates the differentiation of goat intramuscular preadipocytes by targeting the *PDE4B* gene.

Keywords: goat; miR-23b-3p; *PDE4B*; intramuscular adipocyte differentiation; dual luciferase reporter assay

MicroRNAs (miRNAs)是物种间保守的内源性表达的非编码小分子RNA,长度一般在22左右。MiRNA有很多作用方式,通常与靶基因

的3'非翻译区(3' untranslated regions, 3'UTR)结合抑制靶基因翻译或使其降解,从而影响靶基因在转录后调控中的作用;与5'非翻译区(5'

untranslated regions, 5'UTR)结合可以促进其翻译^[1-4]。研究表明, miRNAs 是脂肪形成和脂质代谢的重要调控因子。Ouyang 等^[5]发现, miR-125b-5p 能够抑制 3T3-L1 前体脂肪细胞增殖; Ling 等^[6]发现, miR-375 能够促进 3T3-L1 前体脂肪细胞成脂分化; Ma 等^[7]研究表明, miR-25 通过直接靶标过氧化物酶体增殖激活受体 γ 辅激活物 1 (peroxisome proliferation activates receptors γ coactivators1, PGC-1beta)抑制一些脂肪形成基因的表达进而调节山羊乳腺上皮细胞的脂质代谢。

miR-23b-3p 最早于 2009 年由 Rogler 等^[8]通过 microRNA 基因芯片 (microRNA gene microarray)鉴定发现, miR-23b 簇定位于小鼠的 9 号染色体上, 研究表明 miR-23b 簇通过靶向 I 型受体磷酸酯细胞质蛋白(drosophila mothers against decapentaplegic protein, Smads)来调节 TGF- β /BMP 信号通路和肝细胞分化。经糖、脂代谢相关的研究发现, 高葡萄糖可诱导 miR-23b-3p 的表达, miR-23b-3p 通过沉默信息调控因子 1 (silent information regulator 1, *SIRT1*) 依赖性信号通路来诱导糖尿病视网膜病变中高糖的细胞代谢记忆, 并且 miR-23b-3p 可以直接结合 *SIRT1*^[9]; 在 HepG2 细胞中, miR-23b-3p 结合 *SIRT1* 以降低肝细胞存活率和增加细胞内脂质积累^[10]。徐立凤等^[11]指出, miR-23b-3p 具有促进 3T3-L1 细胞分化的作用, 同时分化标志基因 *FABP4* 和 *PPAR γ* 的表达在 mRNA 及蛋白水平上均发生变化, 但未鉴定 miR-23b-3p 的靶标基因。Wang 等^[12]通过微阵列分析发现, miR-23b-3p 在肉牛肌内脂肪中高表达, 但尚未阐明其具体作用及机制。本实验室前期利用 RNA-Seq 发现 miR-23b-3p 在山羊肌内脂肪细胞分化前后也存在表达差异, 推测其对山羊肌内脂肪细胞分化具有重要调控作用。

因此本研究利用 RT-PCR、实时荧光定量 PCR (real-time quantitative-polymerase chain reaction, RT-qPCR)、细胞培养、脂质体转染、过表达、RNA 干扰和双荧光素酶报告基因试验等分子生物学方法, 明确 miR-23b-3p 表达特性, 并阐明其对山羊肌内脂肪细胞分化的调控作用及可能的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物和样品采集

本研究以 7-10 日龄简州大耳羊(公羊, $n=3$)为试验对象, 由四川天地羊生物工程有限责任公司提供。通过胶原酶消化法^[13]获得原代山羊肌内前体脂肪细胞, 放入液氮中保存备用。动物伦理审查由西南民族大学实验动物伦理委员会批准(批准号: No. 2020086)。

1.1.2 主要试剂

TRIzol、RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 和 Bodipy 购自 Thermo Fisher Scientific; TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II、PrimerSTAR[®] Max DNA Polymerase、*Nhe* I 和 *Xba* I 购自 TaKaRa 公司; DNA 纯化回收试剂盒、质粒提取试剂盒和 DH5 α 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司; II型胶原酶和油酸购自 Sigma 公司; DMEM/F12、磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS)和胰蛋白酶购自 Hyclone 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Gemini 公司; Opti-MEM 和双抗购自 Gibco; Lipofectamine[®] RNAiMAX Reagent 购自 Invitrogen; Dual-Luciferase Reporter Assay System 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; pmirGLO 双荧光素酶载体购自 Promega 公司; 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 山羊肌内前体脂肪细胞的培养

37 °C水浴解冻实验室冻存的原代山羊肌内前体脂肪细胞,用含 10% FBS 和 0.1%双特异性抗体(bispecific antibody)的完全培养基培养。细胞生长至融合度约 80%–90%传代,传代使用胰酶消化细胞。待山羊 F3 代细胞融合度达 80%时,完全培养基更换为油酸诱导剂(50 μmol/L),分别在诱导后 0、12、24、36、48、60 h 时收集细胞样品。

1.2.2 细胞转染

高通量测序获得的山羊 miR-23b-3p 序列,根据所获得序列分别设计 miR-23b-3p 的模拟物(mimics)和抑制剂(inhibitor),并由 GenePharma 公司合成,分别命名为 mimics NC、inhibitor NC、mimics miR-23b-3p 和 inhibitor miR-23b-3p (表 1)。将 F3 代山羊肌内前体脂肪细胞均匀接种于 12 孔板,待细胞生长至 80%时进行转染。转染 6 h 后更换为 50 μmol/L 油酸诱导液,诱导分化 48 h 后收集细胞样品。每个处理设置 3 个重复。

1.2.3 油红 O (oil red O)和氟硼二吡咯染色(Bodipy)

用于染色的细胞接种于 24 孔板,处理方式同“1.2.2”。油红 O 和 Bodipy 染色方法同文献[14]所示。

1.2.4 qPCR 检测

采用 TRIzol 法裂解细胞样品提取总 RNA,按照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书将 RNA 样品反转录为 cDNA,用于检测

基因变化的样品(cDNA)反转录时加入 oligo (dT),而用于检测 miRNA 模拟或抑制效率的样品(cDNA-1)反转录时加入相应的茎环引物,引物序列为: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGGTAATCC-3'。反转录样品 5 倍稀释后于-20 °C储存。UXT^[15]和 U6 分别作为基因和 miRNAs 的内参以校正其表达水平,利用 qPCR 技术检测 miRNAs 模拟及抑制效率和相关基因表达变化。qPCR 总体体系(20 μL)为: TB Green[®] Premix Ex Taq[™] II 10 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 1 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 7 μL。qPCR 反应程序: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, T_m 15 s, 72 °C 2 min, 共 38 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。每个样品设置 3 个生物学重复。用于 qPCR 反应的特异性引物信息见表 2。

1.2.5 miR-23b-3p 靶基因预测和山羊 PDE4B 3'UTR 克隆

利用 miRDataBase、miRWalk、TargetScan 8.0 等线上软件进行 miR-23b-3p 下游靶基因预测,使用 Venny 2.1 绘制韦恩图。结合实验室前期研究结果,发现基因 PDE4B 可能为 miR-23b-3p 的靶标基因,根据山羊 PDE4B 基因序列(NCBI 中登录号为 XM_005678304.3),利用 Primer Premier 5.0 设计山羊 PDE4B 3'UTR 克隆的上下游引物(表 2)。利用诱导分化 0 h 的山羊肌内脂肪细胞总 RNA 反转录得到 cDNA 模板进行 PCR 扩增。通过 1%琼脂糖凝胶电泳筛选出目的条带,胶回收后将纯化产物连接至 pClone007 载体

表 1 miRNA mimics 和 inhibitor 序列

Table 1 The sequences of mimics and inhibitor for miRNA

miRNA	Classification	Sequence (5'→3')
NC	Mimics	UUCUCCGAACGUGUCACGUTTACGUGACACGUUCGGAGAATT
	Inhibitor	CAGUACUUUUGUGUAGUACAA
miR-23b-3p	Mimics	AUCACAUUGCCAGGGAAUACCUAUAUCCUGGCAAUGUGAUUU
	Inhibitor	GGUAAUCCUGGCAAUGUGAU

表 2 本研究使用的引物

Table 2 Primers used in this study

Gene/miRNA	Sequence (5'→3')	<i>T_m</i> (°C)	GenBank accession No.
<i>ACC</i>	GGAGACAAACAGGGACCATT ATCAGGGACTGCCGAAAC	60	XM_018064169.1
<i>ATGL</i>	GGTGCCAATATCATCGAGGT CACACCCGTGGCAGTCAG	64	NM_001285739.1
<i>AP2</i>	TGAAGTCACTCCAGATGACAGG TGACACATTCCAGCACCAGC	58	NM_001285623.1
<i>C/EBPα</i>	CCGTGGACAAGAACAGCAAC AGGCGGTCATTGTCACTGGT	58	XM_018062278.1
<i>C/EBPβ</i>	CAAGAAGACGGTGGACAAGC AACAAGTCCGCAGGGTG	66	XM_018058020.1
<i>DGAT2</i>	CAATAGGTCCAAGGTAGAGAAGC ACCAGCCAGGTGAAGTAGAGC	64	NM_001314305.1
<i>GLUT4</i>	TGCTCATTCTGGACGGTTCT CATGGATTCCAAGCCTAGCAC	60	NM_001314227.1
<i>FASN</i>	TGTGCAACTGTGCCCTAG GTCCTCTGAGCAGCGTGT	57	NM_001285629.1
<i>HSL</i>	AGGGTCATTGCCGACTTCC GTCTCGTTGCGTTTGTAGTGC	60	XM_018062484.1
<i>LPL</i>	TCCTGGAGTGACGGAATCTGT GACAGCCAGTCCACCACGAT	60	NM_001285607.1
<i>PPARγ</i>	AAGCGTCAGGGTTCCACTATG GAACCTGATGGCGTTATGAGAC	60	NM_001285658.1
<i>SREBP1</i>	AAGTGGTGGGCCTCTCTGA GCAGGGGTTTCTCGACT	58	NM_001285755.1
<i>KLF8</i>	GACTACAGCAAGAACCAGCAGC CTCCTGTATGGATTCTGCGGT	62	KX247671
<i>UXT</i>	GCAAGTGGATTGGGCTGTAAC ATGGAGTCCTTGGTGAGGTTGT	60	XP_005700899.1
<i>U6</i>	TGGAACGCTTACGAATTTGCG GGAACGATACAGAGAAGATTAGC	60	NR_138085.1
miR-23b-3p	CATTCTATCACATTGCCAGGGA GTGCAGGGTCCGAGGT	58	
3'UTR-F	TGCTGAAGAGATGTCCCCCT	62	
3'UTR-R	AAACCCATTGGTCATGCACA		
<i>PDE4B</i> WT-F	CTAGCTAGCTAGTGCTGAAGAGATGTCCCCCT	62	
<i>PDE4B</i> WT-R	GCTCTAGAGCAAACCCATTGGTCATGCACA		
MT1-F	AACTTACACTATTTTACAATGAAATGTGAACTGACATAG	62	
MT1-R	GTAAAATAGTGTAAGTTTTTATTGTTTTCTTTAGTAATTAATCGG		
MT2-F	CAATGATTACACTACTGACATAGTAAATTATGCAAATGTGAA	62	
MT2-R	CAGTAGTGTAATCATTGTAAAATTCACATTGTTTTTATTG		
MT3-F	CAATGATTACACTACTGACATAGTAAATTATGCATTACACTA	62	
MT3-R	CAGTAGTGTAATCATTGTAAAATAGTGTAAGTTTTTATTG		

(25 °C连接 5 min), 转化至感受态细胞 DH5 α , 37 °C过夜培养, 氨苄霉素抗性(ampicillin, Amp)抗性筛选后进行菌液 PCR 鉴定, 最后送至成都擎科生物有限公司测序。选择测序正确的菌液提取质粒, -20 °C保存, 质粒命名为 pClone007-*PDE4B* 3'UTR。

1.2.6 *PDE4B* 3'UTR 及其突变型双荧光素酶报告载体构建

根据获得的 *PDE4B* 3'UTR 序列和 pmirGLO 载体, 选择 *Nhe* I 和 *Xba* I 作为酶切位点设计 *PDE4B*-WT 引物(表 2)。以 pClone007-*PDE4B* 3'UTR 质粒为模板, *PDE4B*-WT 中 F 和 R 引物进行 RT-PCR 扩增。RT-PCR 总体系(20 μ L)为: 高保真 PCR 酶(Primer star max) 12.5 μ L, 10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。RT-PCR 反应程序: 98 °C 10 s, T_m 30 s, 72 °C 20 s, 35 个循环; 4 °C保存。将目的片段胶回收并用紫外分光光度计检测胶回收产物浓度, 随后进行双酶切。双酶切反应体系: 1 μ g 胶回收产物(或 1 μ g pmirGLO 质粒), 1 μ L Q.cut *Nhe* I, 1 μ L Q.cut *Xba* I, 2 μ L 10 \times Q.cut Buffer, 补充 ddH₂O 至 20 μ L。37 °C酶切 1 h 后进行纯化。使用 T4 DNA 连接酶将纯化后目的片段和 pmirGLO 进行连接(16 °C连接 16 h)后转化于感受态细胞 DH5 α , 转化及重组产物鉴定同 1.2.5。构建成功的载体质粒命名为 pmirGLO-*PDE4B* WT。

针对 miR-23b-3p 在 *PDE4B* 3'UTR 的结合位点, 设计 3 对突变型扩增引物 MT1-3 (表 2)。以上述野生型载体为模板, 克隆获得 *PDE4B* 突变型序列, 酶切、连接和转化方法同上。构建成功的载体质粒命名为 pClone007-*PDE4B*-MT。将 *PDE4B* 3'UTR 突变型序列连接至 pmirGLO 载体, 克隆、酶切、连接和转化方法同 pmirGLO-*PDE4B* WT 构建。构建成功的载体质粒命名为 pmirGLO-

PDE4B MT。

1.2.7 细胞培养和共转染

用于双荧光素酶报告基因检测系统试验的 F3 代山羊肌内前体脂肪细胞接种于 48 孔板, 待细胞贴壁后, 利用 TurboFect Transfection Reagent 将构建好的 pmirGLO-*PDE4B* WT 和 pmirGLO-*PDE4B* MT 转染入细胞, 转染后 18 h 更换培养基, 再转染 mimics NC 和 miR-23b-3p mimics, 转染后 16 h 更换油酸诱导液, 继续培养 48 h。每个处理组设置 3 个生物学重复。

1.2.8 双荧光素酶检测系统

取诱导分化 48 h 的细胞利用 Dual Luciferase Reporter Assay Kit 检测报告基因的双荧光素酶活性, 弃培养板中诱导液, 用 PBS 缓慢洗涤 2 次, 48 孔每孔加入 50 μ L 1 \times Cell Lysis Buffer, 室温下缓慢晃动培养板 5 min, 使细胞充分裂解, 收集细胞裂解产物至 1.5 mL 离心管中, 12 000 \times g 常温离心 2 min, 取 10 μ L 上清液加入黑色酶标板中, 每孔再加入 50 μ L 荧光素酶底物(luciferase substrate), 迅速振荡混匀后立即用酶标仪检测萤火虫荧光素酶(firefly luciferase)报告基因活性。在上述反应液中加入 50 μ L Renilla Substrate 工作液(将 Stop & Reaction Buffer 和 Renilla Substrate 以 50:1 的比例混匀得到 Renilla Substrate 工作液, 现用现配), 迅速振荡混匀后立即用酶标仪检测海肾荧光素酶(Renilla luciferase)报告基因活性。

1.2.9 统计学分析

利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法处理 qPCR 数据, 均值 \pm 标准差用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件并选择单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)方法分析数据差异显著性, $P < 0.05$ 表示有显著差异, $P < 0.01$ 表示差异极显著。同时利用 GraphPad Prism 8.0 绘制山羊 miR-23b-3p 的时序表达谱。

2 结果与分析

2.1 miR-23b-3p 对山羊肌内前体脂肪细胞分化的影响

2.1.1 miR-23b-3p 在山羊肌内前体脂肪细胞分化过程中的时序表达

为探究 miR-23b-3p 对山羊肌内前体脂肪细胞的调控作用,利用 qPCR 技术检测 miR-23b-3p 在山羊肌内脂肪细胞分化不同阶段的表达变化。结果显示, miR-23b-3p 在诱导分化 0-60 h 肌内脂肪细胞中均存在表达,在 0-48 h 整体表达水平呈上升趋势,而在 48-60 h 其表达水平逐渐降低,且在分化 48 h 时的表达水平最高,极显著高于 0 h 的表达量($P<0.01$) (图 1)。

2.1.2 过表达 miR-23b-3p 对山羊肌内前体脂肪细胞分化的影响

利用 qPCR 技术检测山羊肌内前体脂肪细胞转染 miR-23b-3p mimics 的效率,结果显示,

相较于对照组,miR-23b-3p mimics 组中 miR-23b-3p 的表达量升高 3 054 倍($P<0.01$) (图 2A)。通过油红

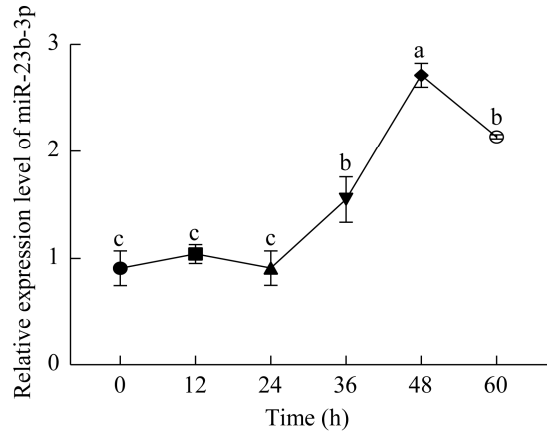


图 1 miR-23b-3p 在山羊肌内脂肪细胞分化不同阶段的表达变化

Figure 1 The expression change of miR-23b-3p in different differentiation stage of goats intramuscular adipocytes. Different lowercase letters indicate extremely significant difference ($P<0.01$).

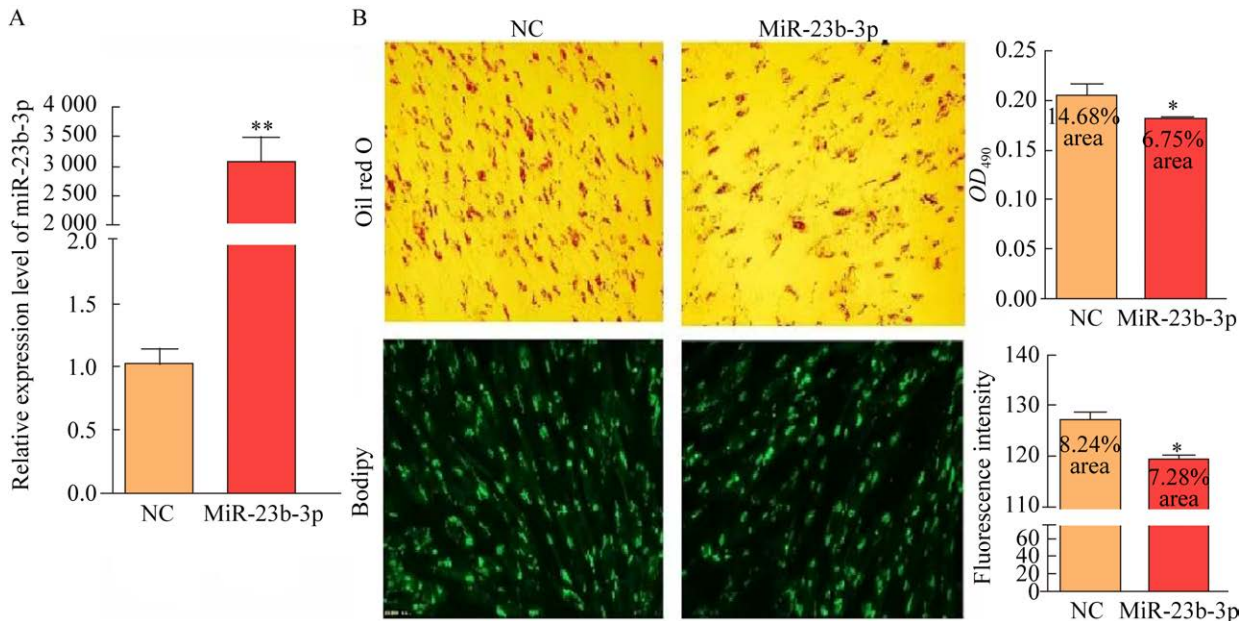


图 2 模拟 miR-23b-3p 表达抑制山羊肌内脂肪细胞分化

Figure 2 Mimicking the expression of miR-23b-3p inhibits the differentiation of intramuscular adipocytes in goats. A: The mimicking efficiency of miR-23b-3p. B: Oil red O and bodipy staining analysis ($\times 400$). **: The difference was extremely significant, compared with the control group ($P<0.01$); *: The difference was significant, compared with the control group ($P<0.05$). The same below.

O 和 Bodipy 染色发现, 过表达 miR-23b-3p 后山羊肌内脂肪细胞脂滴积聚减少; 油红 O 染色量化结果显示, miR-23b-3p 组 OD_{490} 值显著低于 NC 组 ($P<0.05$); Bodipy 量化结果显示, miR-23b-3p 组的荧光强度显著高于 NC 组 ($P<0.05$) (图 2B)。

2.1.3 干扰 miR-23b-3p 对山羊肌内脂肪细胞分化的影响

将 miR-23b-3p inhibitor 转染入山羊肌内前体脂肪细胞, qPCR 检测发现, miR-23b-3p 的表达被抑制, 抑制效率达 86% ($P<0.01$) (图 3A)。油红 O 和 Bodipy 染色结果均表明, 抑制 miR-23b-3p 表达促进肌内脂肪细胞内脂滴积聚 (图 3B); 量化结果表明, OD_{490} 值和荧光强度分别升高 1.15 倍和 1.08 倍, 均显著高于 NC 组 ($P<0.05$) (图 3B)。

2.1.4 干扰和过表达 miR-23b-3p 对山羊肌内脂肪细胞分化标志基因表达的影响

qPCR 检测结果显示, 与 NC 组相比, 过表

达 miR-23b-3p 后, *AP2*、*C/EBP α* 、*FASN* 和 *LPL* 的相对表达水平极显著降低 ($P<0.01$), *C/EBP β* 、*DGAT2*、*GLUT4* 和 *PPAR γ* 的相对表达水平显著降低 ($P<0.05$), *ACC* 的相对表达水平有下调的趋势 ($P=0.074$), 然而 *ATGL* 和 *SREBP1* 的表达显著上调 ($P<0.05$) (图 4A); 抑制 miR-23b-3p 表达后, *ACC*、*ATGL*、*AP2*、*DGAT2*、*GLUT4*、*FASN* 和 *SREBP1* 的表达水平极显著上调 ($P<0.01$), *C/EBP β* 、*LPL* 和 *PPAR γ* 显著上调 ($P<0.05$), 然而 *C/EBP α* 和 *HSL* 的相对表达水平未发生显著性变化 (图 4B)。

2.2 miR-23b-3p 的靶基因预测及表达水平检测

使用 TargetScan、microSeq 和 miRDB 等在线程序预测 miR-23b-3p 的靶标基因, 并通过 Veeny 2.1 绘制韦恩图。结果显示, 共有 107 个潜在靶基因, 其中包括 *PDE4B*、*KLF3*、*SEMA6D*、*MAP3K5*、*FAM126B*、*CXCL12* 和 *RBL2* 等 (图 5A)。对预测的靶基因进一步分析发现, 有 22 个靶基

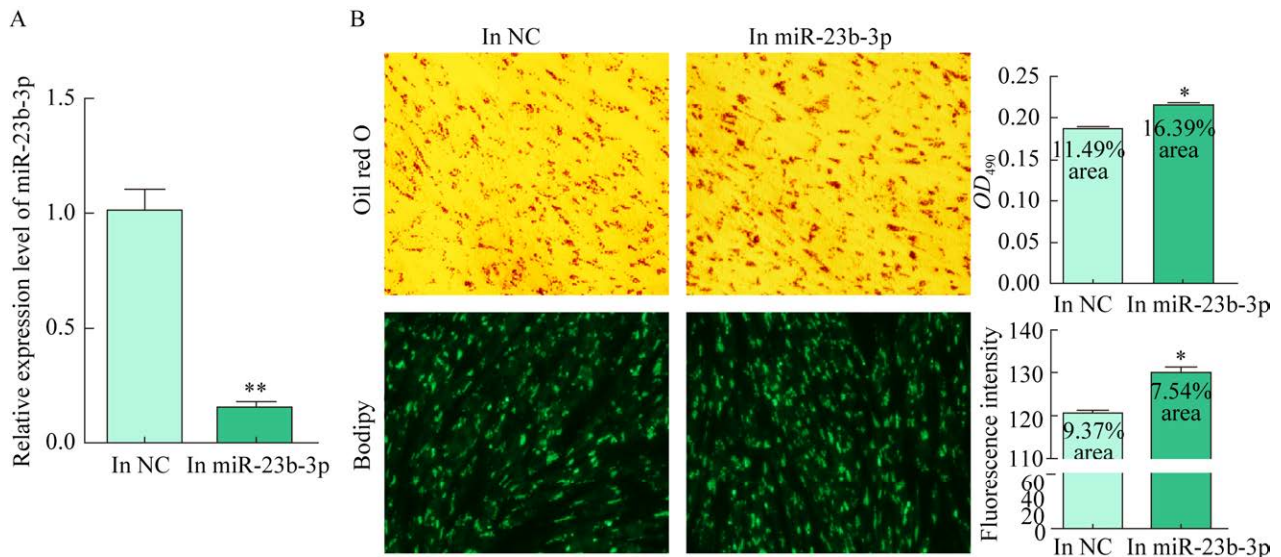


图 3 抑制 miR-23b-3p 表达促进山羊肌内脂肪细胞分化

Figure 3 Inhibition the expression of miR-23b-3p promotes the differentiation of intramuscular adipocytes in goats. A: The inhibiting efficiency of miR-23b-3p. B: Oil red O staining and bodipy staining analysis ($\times 400$).

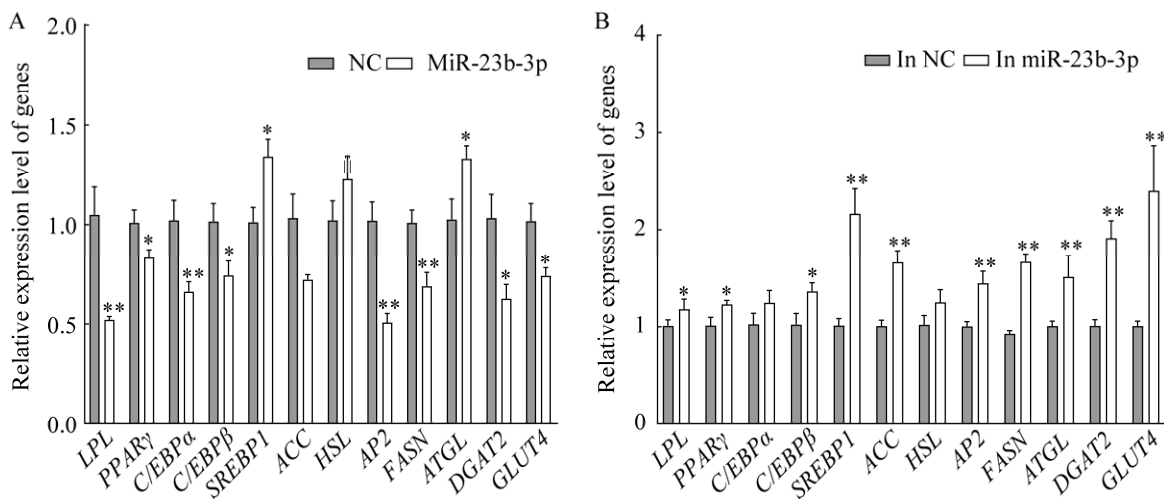


图 4 脂肪细胞分化标志基因及脂代谢基因表达水平

Figure 4 Expression levels of adipocyte differentiation marker genes and lipid metabolism genes. A: The effect of miR-23b-3p mimicking on adipocytes differentiation marker genes and lipid metabolism genes. B: The effect of miR-23b-3p inhibiting on adipocytes differentiation marker genes and lipid metabolism genes. **: Extremely significant difference ($P < 0.01$); *: Significant difference ($P < 0.05$).

因富集在脂肪细胞分化和脂质代谢相关通路(图 5B)。在宏观上结合 miR-23b-3p 的调控网络进行单独分析,并根据 DAVID 软件上对靶基因的生物学术特征注解,筛选出 4 个靶基因,分别是 *CXCL12*、*PDE4B*、*RBL2*、*MAP3K5*。通过 qPCR 检测候选靶基因在过表达和干扰 miR-23b-3p 后的表达情况发现,过表达 miR-23b-3p 可以极显著降低 *PDE4B* 的 mRNA 表达水平($P < 0.01$) (图 5C),而干扰 miR-23b-3p 后,*PDE4B* 的 mRNA 水平得到了显著提升($P < 0.05$),且在候选靶基因中仅 *PDE4B* 与 miR-23b-3p 表达趋势相反(图 5D),因此选择 *PDE4B* 为 miR-23b-3p 候选靶基因。

2.3 山羊 miR-23b-3p 和 *PDE4B* 靶标关系鉴定

利用 RT-PCR 方法扩增获得山羊 *PDE4B* 基因 3'UTR 序列长度为 591 bp,包含 3 个

miR-23b-3p 的结合位点,与预测序列结果一致(图 6A)。在此基础上构建 *PDE4B* 3'UTR 的双荧光素酶报告载体(pmirGLO-*PDE4B* WT 和 pmirGLO-*PDE4B* MT),并分别在 miR-23b-3p 的预测结合位点处进行突变,构建 *PDE4B* 3'UTR 突变型(mutant type, MT)载体(pmirGLO-*PDE4B* MT) (图 6B)。利用 TargetScan 软件预测 miR-23b-3p 的结合位点,预测结果显示在 *PDE4B* 3'UTR 区域存在 3 个与 *PDE4B* 基因相互作用的 miRNA 结合位点(图 6C)。双荧光素酶报告检测系统结果显示,在山羊肌肉脂肪细胞中转染野生型(wild type, WT) pmirGLO-*PDE4B* WT 质粒后模拟 miR-23b-3p 表达, *PDE4B* 3'UTR 的活性显著降低($P < 0.05$);而模拟 miR-23b-3p 表达对突变型 *PDE4B* 3'UTR 的活性无显著性影响(图 6D)。

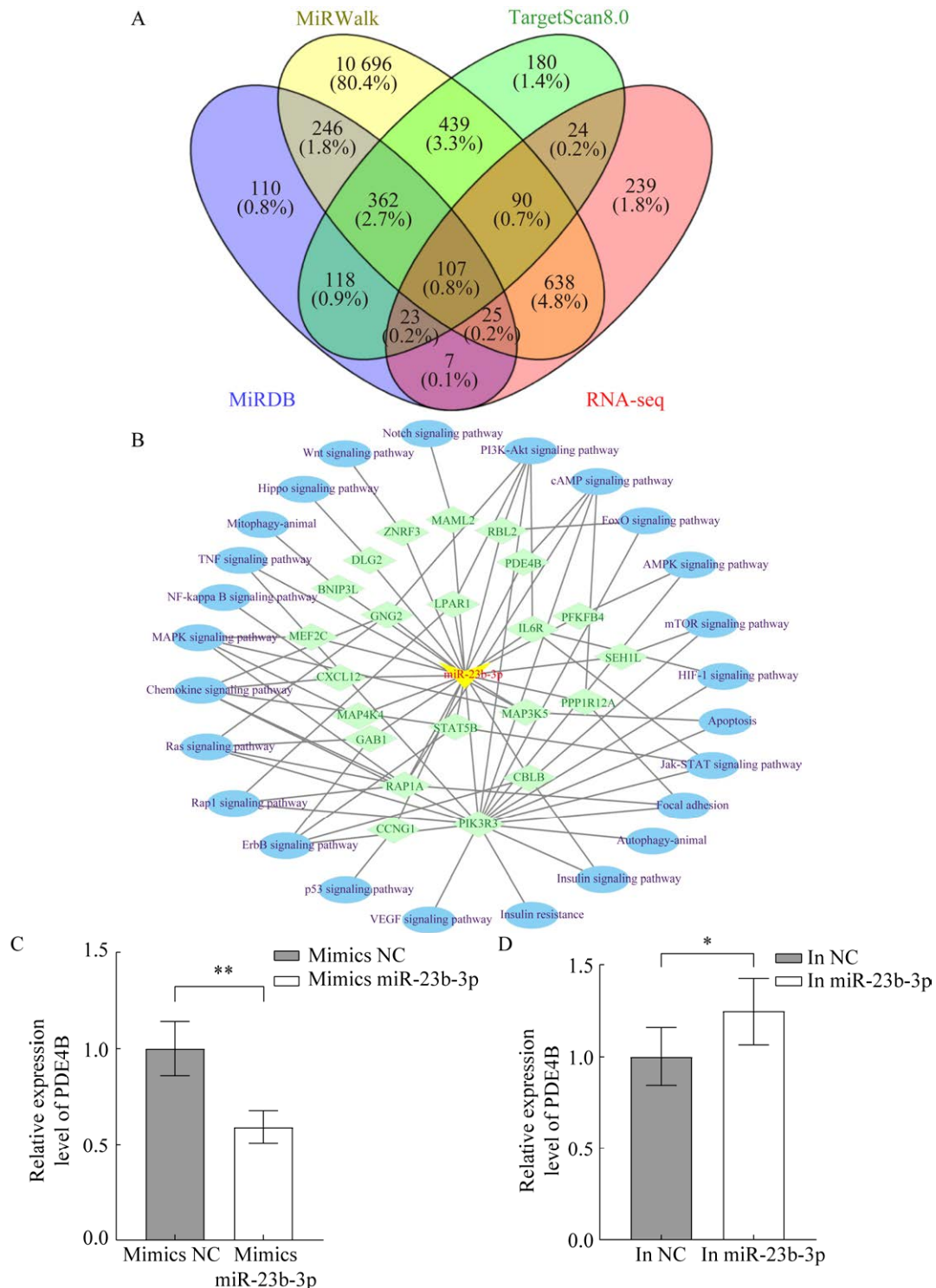


图 5 miR-23b-3p 靶基因预测及表达水平检测

Figure 5 Prediction and detection of the expression level of the miR-23b-3p target gene. A: Venn diagram for the predicted target gene of miR-23b-3p. B: Regulatory network of predicted target genes of miR-23b-3p enriched to the pathways related to adipocyte differentiation and lipid metabolism. C: *PDE4B* expression level after simulating the expression of miR-23b-3p. D: *PDE4B* expression level after interfering with the expression of miR-23b-3p. **: Extremely significant difference ($P < 0.01$); *: Significant difference ($P < 0.05$).

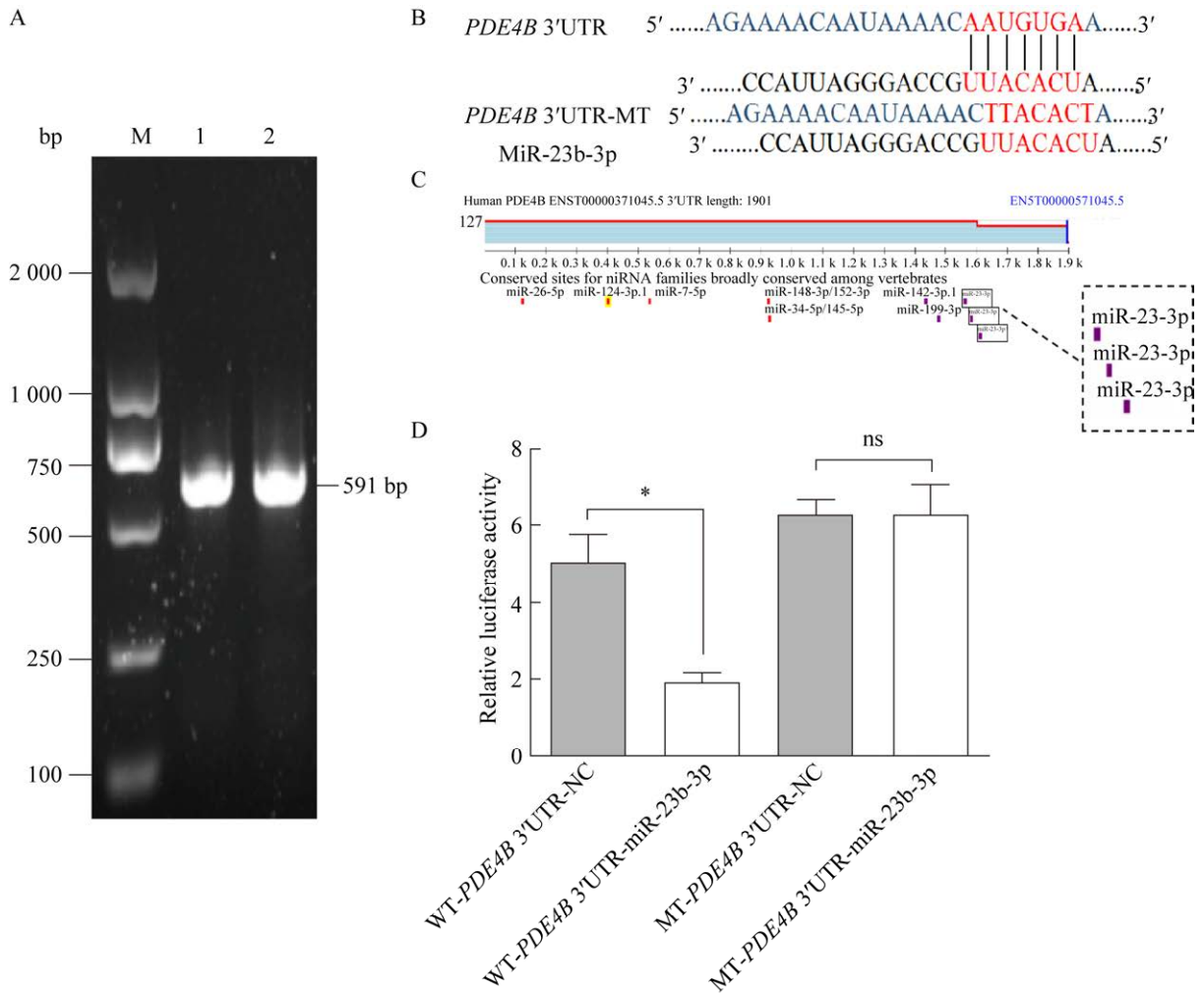


图 6 山羊 miR-23b-3p 与 *PDE4B* 靶标关系鉴定

Figure 6 Identification of the relationship between miR-23b-3p and *PDE4B* targets in goats. A: Amplification of the *PDE4B* 3'UTR in goat. M: DL2000 marker; Lane 1 and 2: *PDE4B* 3'UTR. B: The wild-type and mutant *PDE4B* 3'UTRs. C: Bioinformatics prediction of binding sites of miR-23b-3p and *PDE4B*. D: The result of dual-luciferase report assay. * indicated significant difference ($P < 0.05$); ns indicated no significant difference.

3 讨论

简州大耳羊是我国第二个自主培育的肉用山羊品种,具有肉质鲜美、适应性强和高繁殖率等诸多优良性能^[16]。风味物质主要沉积在脂肪组织中^[17],羊肉口感易受风味物质的影响,因此解析山羊脂肪沉积的机制有利于育种工作者从分子水平调控脂质积累从而改善肉质。动物脂肪生成受脂肪细胞分化、脂质代谢等生物学过程的影响,miRNAs 在该过程中发挥着重要的转录

后调控作用^[18]。

miR-23b-3p 是本实验室前期筛选出的山羊肌肉脂肪细胞分化前后的差异因子,目前对其功能研究主要集中在卵巢癌、胃癌、肝癌和肌肉骨骼疾病等中,对于 miR-23b-3p 在脂肪细胞分化中的功能研究较少,调控机制也不清楚。因此,本研究在确定山羊 miR-23b-3p 肌肉脂肪细胞分化的时序表达谱基础上,进一步利用化学合成的 miR-23b-3p mimics/inhibitor 探究其对山羊肌肉脂肪细胞分化的调控作用。结果表明,miR-23b-3p

抑制细胞内脂滴积聚, 并可能通过抑制 *AP2*、*C/EBP β* 、*DGAT2*、*GLUT4*、*FASN*、*LPL* 和 *PPAR γ* 的表达来发挥作用。通常 *PPAR γ* 和 *C/EBP β* 的表达变化会引起级联转录调控的形成, 从而启动前脂肪细胞向脂肪细胞的分化, 这将显著影响前脂肪细胞的脂肪生成^[19]。本试验中 *PPAR γ* 和 *C/EBP β* 的表达水平显著下调可能是 miR-23b-3p 抑制肌内脂肪细胞分化的主要原因。脂肪酸合成酶(fatt synthase, *FASN*)是脂肪酸从头合成的关键限速酶, 将丙二酰辅酶 A 转化为棕榈酸^[20]。脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, *LPL*)是甘油三酯水解的限速酶, 主要在肝脏实质细胞中合成, 在脂质代谢和转运中发挥重要作用^[21]。脂肪酸结合蛋白(*APETALA2*, *AP2*)是脂肪酸的分子伴侣, 将胞内脂质与生物靶标和信号通路结合, 是 *PPAR γ* 的主要靶基因^[22]。葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporter 4, *GLUT4*)是肌肉和脂肪组织中最重要葡萄糖转运蛋白, *PPAR γ* 介导的 *GLUT4* 上调对于 BMP 引起的胰岛素敏感至关重要, 可增加 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖摄取^[23]。二酰甘油酰基转移酶 2 (diacylglycerol acyltransferase 2, *DGAT2*)是一种不可或缺的膜蛋白, 它以二酰甘油和脂肪酰基 CoA 为底物, 催化三酰甘油的合成^[24]。因此, *AP2*、*DGAT2*、*GLUT4*、*FASN* 和 *LPL* 的下调可能是模拟 miR-23b-3p 后脂滴积聚减少的原因。关于小鼠 3T3-L1 细胞中的研究发现, 模拟 miR-23b-3p 表达促进脂肪细胞分化和细胞内甘油三酯的积累, 显著上调 *PPAR γ* 和 *AP2* 的表达^[11], 这与本研究结果相反。这种差异在 *KLF4*^[25]和 *KLF13*^[26]等基因功能上也存在, 推测可能是由物种差异或脂肪细胞特异性造成的。

MiRNAs 作为一类在转录后水平调节靶基因表达的非编码小 RNA 分子, 在动物体内主要是靶向靶标基因的 3'UTR 发挥作用。为揭示 miR-23b-3p 调控山羊肌内脂肪细胞分化的可能

作用机制, 首先通过在线软件对 miR-23b-3p 的潜在靶基因进行预测, 发现 *PDE4B* 的表达与 miR-23b-3p 表达趋势相反, 推测其可作为 miR-23b-3p 的潜在靶基因。*PDE4B* 是 IV 型环磷酸二酯酶(cyclic phosphodiesterase enzymes, cAMP)特异性环核苷酸磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)家族的成员。编码的蛋白质调节环核苷酸的细胞浓度, 从而在信号转导中发挥作用。已有研究人员构建了分别敲除 *PDE4A*、*PDE4B* 和 *PDE4D* 基因的小鼠, 其中 *PDE4A* 和 *PDE4D* 的缺失导致 cAMP 水平升高, 但不影响脂肪分解。脂肪细胞 *PDE4B* 表达由胰岛素和儿茶酚胺共同调控, 且较低的 *PDE4B* 水平与 β -肾上腺素信号传导增加有关, 暗示了 *PDE4B* 在脂肪分解中的潜在作用^[27]。此外, 酒精诱发的肝脂肪变性是由脂质代谢失调引起, 酒精增加肝脏中 *PDE4B* 表达并使肝脏 cAMP 水平和下游 cAMP/PKA/CREB 信号降低, 抑制 *PDE4B* 表达可防止酒精介导的脂肪在肝脏中堆积及肝脂肪变性^[28]。Xu 等^[29]发现当肝脏中 *PDE4B* 表达下调, 通过激活蛋白激酶 A 并促进 PGC-1 α 的表达, 最终缓解肝脂积累和肝损伤。上述研究显示 *PDE4B* 在脂质代谢中具有重要作用, 也为本文的预测提供了间接证据。进一步对 *PDE4B* 与 miR-23b-3p 的匹配度进行分析, 得到位点类型为“8 mer”, 其中单体单元(monomeric unit, mer)表示种子区域的匹配程度。而 miRNA 与候选靶基因匹配度由低到高为“7 mer-1A<7 mer-8 mer<8 mer”, “8 mer”表明 miR-23b-3p 与候选靶基因 *PDE4B* 匹配特异性好^[30]。同时基于预测得到的 *PDE4B* 3'UTR 与 miR-23b-3p 有 3 个潜在结合位点, 推测 miR-23b-3p 可能与 *PDE4B* 3'UTR 有直接的相互作用。因此本文进一步利用双荧光素酶报告基因系统进行二者结合关系的鉴定, 发现 miR-23b-3p 可作用于 *PDE4B* 基因的

野生型靶位点, 显著降低荧光活性, 但对于突变型的靶位点却不起作用, 荧光活性与对照组相比变化不显著, 证实了 miR-23b-3p 与靶 *PDE4B* 基因的结合关系。最终提出 miR-23b-3p 通过靶向 *PDE4B* 调控山羊肌内脂肪细胞分化。

4 结论

本研究明确了山羊 miR-23b-3p 在肌内脂肪细胞分化过程中的表达模式, 在诱导分化 48 h 表达量最高; 过表达 miR-23b-3p 后发现脂滴积聚被抑制, *AP2*、*C/EBP β* 、*DGAT2*、*FASN*、*LPL*、*PPAR γ* 等标志基因的相对表达水平发生变化; 抑制 miR-23b-3p 后促进细胞内脂滴积聚, 且改变 *AP2*、*C/EBP β* 、*DGAT2*、*FASN*、*LPL*、*PPAR γ* 等标志基因的相对表达水平; 明确了 miR-23b-3p 具有抑制山羊肌内脂肪细胞分化的作用, 并且这种抑制作用可能是通过靶向 *PDE4B* 实现的, 研究结果为最终阐明 miR-23b-3p 在山羊肌内脂肪细胞分化中的调控作用机理提供了重要理论数据。

REFERENCES

- [1] ZHOU P, XU WY, PENG XL, LUO ZH, XING QH, CHEN XL, HOU CQ, LIANG WH, ZHOU JW, WU XY, ZHOU SY, JIANG SS. Large-scale screens of miRNA-mRNA interactions unveiled that the 3'UTR of a gene is targeted by multiple miRNAs[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68204.
- [2] CHI SW, ZANG JB, MELE A, DARNELL RB. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps[J]. *Nature*, 2009, 460(7254): 479-486.
- [3] HAFNER M, LANDTHALER M, BURGER L, KHORSHID M, HAUSSER J, BERNINGER P, ROTHBALLER A, ASCANO M Jr, JUNGKAMP AC, MUNSCHAUER M, ULRICH A, WARDLE GS, DEWELL S, ZAVOLAN M, TUSCHL T. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP[J]. *Cell*, 2010, 141(1): 129-141.
- [4] 张莹姣, 乔利英, 景灵婕, 潘洋洋, 马元, 郭云利, 魏琼, 刘文忠. MiR-194-5p 靶向调控 BCKDHA 基因的表达[J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(8): 1416-1423. ZHANG YJ, QIAO LY, JING JJ, PAN YY, MA Y, GUO YL, WEI Q, LIU WZ. MiR-194-5p targets *BCKDHA* gene to regulate its expression[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2017, 48(8): 1416-1423 (in Chinese).
- [5] OUYANG D, YE YQ, GUO DG, YU XF, CHEN J, QI JJ, TAN XT, ZHANG Y, MA YJ, LI YG. MicroRNA-125b-5p inhibits proliferation and promotes adipogenic differentiation in 3T3-L1 preadipocytes[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2015, 47(5): 355-361.
- [6] LING HY, WEN GB, FENG SD, TUO QH, OU HS, YAO CH, ZHU BY, GAO ZP, ZHANG L, LIAO DF. MicroRNA-375 promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through modulation of extracellular signal-regulated kinase signalling[J]. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2011, 38(4): 239-246.
- [7] MA LA, QIU HL, CHEN Z, LI L, ZENG Y, LUO J, GOU DM. MiR-25 modulates triacylglycerol and lipid accumulation in goat mammary epithelial cells by repressing PGC-1beta[J]. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2018, 9: 48.
- [8] ROGLER CE, LEVOCI L, ADER T, MASSIMI A, TCHAIKOVSKAYA T, NOREL R, ROGLER LE. MicroRNA-23b cluster microRNAs regulate transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein signaling and liver stem cell differentiation by targeting Smads[J]. *Hepatology*, 2009, 50(2): 575-584.
- [9] ZHAO SZ, LI T, LI J, LU QY, HAN CJ, WANG N, QIU QH, CAO H, XU X, CHEN HB, ZHENG Z. miR-23b-3p induces the cellular metabolic memory of high glucose in diabetic retinopathy through a SIRT1-dependent signalling pathway[J]. *Diabetologia*, 2016, 59(3): 644-654.
- [10] BORJI M, NOURBAKHS M, SHAFIEE SM, OWJI AA, ABDOLVAHABI Z, HESARI Z, ILBEIGI D, SEIRI P, YOUSEFI Z. Down-regulation of SIRT1 expression by mir-23b contributes to lipid accumulation in HepG2 cells[J]. *Biochemical Genetics*, 2019, 57(4): 507-521.
- [11] 徐立凤, 禹小芳, 张丽华, 欧阳丹, 马勇江, 张媛, 李玉谷. miR-23b-3p 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖和成脂分化的影响[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(10): 2014-2019. XU LF, YU XF, ZHANG LH, OUYANG D, MA YJ, ZHANG Y, LI YG. Role of miR-23b-3p in 3T3-L1 preadipocyte proliferation and differentiation[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(10): 2014-2019 (in Chinese).
- [12] WANG HY, ZHENG Y, WANG GL, LI HX. Identification of microRNA and bioinformatics target gene analysis in beef cattle intramuscular fat and

- subcutaneous fat[J]. *Molecular BioSystems*, 2013, 9(8): 2154-2162.
- [13] XU Q, LIN S, WANG Y, ZHU JJ, LIN YQ. Fibroblast growth factor 10 (FGF10) promotes the adipogenesis of intramuscular preadipocytes in goat[J]. *Molecular Biology Reports*, 2018, 45(6): 1881-1888.
- [14] 冉黎, 吕锦诗, 张浩, 王永, 朱江江, 李艳艳, 孟庆勇, 林亚秋. 过表达山羊 *APOC3* 基因促进肌肉脂肪细胞分化[J]. *华北农学报*, 2022, 37(3): 223-230.
RAN L, LÜ JS, ZHANG H, WANG Y, ZHU JJ, LI YY, MENG QY, LIN YQ. Effect of overexpression of goat *APOC3* gene on differentiation of intramuscular adipocytes[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2022, 37(3): 223-230 (in Chinese).
- [15] 许晴, 林森, 朱江江, 王永, 林亚秋. 山羊肌肉前体脂肪细胞诱导分化过程中内参基因的表达稳定性分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(5): 907-918.
XU Q, LIN S, ZHU JJ, WANG Y, LIN YQ. The expression stability analysis of reference genes in the process of goat intramuscular preadipocytes differentiation in goat[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2018, 49(5): 907-918 (in Chinese).
- [16] 张林, 俄木曲者, 熊朝瑞, 范景胜. 简州大耳羊种公羊的选育及利用技术[J]. *四川畜牧兽医*, 2019, 46(7): 32-33.
ZHANG L, EMU QZ, XIONG CR, FAN JS. Breeding and utilization technology of Jianzhou big-eared sheep breeding ram[J]. *Sichuan Animal & Veterinary Sciences*, 2019, 46(7): 32-33 (in Chinese).
- [17] 孔园园, 张雪莹, 李发弟, 乐祥鹏. 羊肉主要风味前体物质与羊肉风味的关系及影响因素的研究进展[J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(8): 1612-1621.
KONG YY, ZHANG XY, LI FD, LE XP. Research progress on the relationship between mutton flavor precursor substance and mutton flavor and influencing factors[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2021, 29(8): 1612-1621 (in Chinese).
- [18] ZHANG C, WANG Q, ZHOU XW, ZHANG L, YAO Y, GU J, CHEN HR, QIAN J, LUO C, BAI QK, HU GH. MicroRNA-138 modulates glioma cell growth, apoptosis and invasion through the suppression of the AKT/mTOR signalling pathway by targeting CREB1[J]. *Oncology Reports*, 2020, 44(6): 2559-2568.
- [19] XIY, SHEN WJ, MA LL, ZHAO M, ZHENG JC, BU SZ, HINO S, NAKAO M. HMGA2 promotes adipogenesis by activating C/EBP β -mediated expression of PPAR γ [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 472(4): 617-623.
- [20] SONG ZY, XIAO LI AM, YANG FJ. Regulation and metabolic significance of *de novo* lipogenesis in adipose tissues[J]. *Nutrients*, 2018, 10(10): 1383.
- [21] ALIVIA S, KERSTEN S, QI L. Lipoprotein lipase and its regulators: an unfolding story[J]. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2021, 32(1): 48-61.
- [22] GARIN-SHKOLNIK T, RUDICH A, HOTAMISLIGIL GS, RUBINSTEIN M. FABP4 attenuates PPAR γ and adipogenesis and is inversely correlated with PPAR γ in adipose tissues[J]. *Diabetes*, 2014, 63(3): 900-911.
- [23] SCHREIBER I, DÖRPHOLZ G, OTT CE, KRAGESTEEN B, SCHANZE N, LEE CT, KÖHRLE J, MUNDLOS S, RUSCHKE K, KNAUS P. BMPs as new insulin sensitizers: enhanced glucose uptake in mature 3T3-L1 adipocytes *via* PPAR γ and GLUT4 upregulation[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 17192.
- [24] 赵咏梅. 前脂肪细胞因子-1 研究进展[J]. *生物学教学*, 2014, 39(8): 6-8.
ZHAO YM. Research progress of preadipocyte factor-1[J]. *Biology Teaching*, 2014, 39(8): 6-8 (in Chinese).
- [25] 杜宇, 赵越, 林亚秋, 朱江江, 王永, 马洁琼, 谢光杰. MiR-106b-5p 靶向 KLF4 调控山羊肌肉前体脂肪细胞分化[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(6): 1219-1228.
DU Y, ZHAO Y, LIN YQ, ZHU JJ, WANG Y, MA JQ, XIE GJ. MiR-106b-5p regulates the differentiation of goat intramuscular preadipocytes by targeting KLF4[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(6): 1219-1228 (in Chinese).
- [26] 朱江江, 林亚秋, 王永, 李倩, 林森, 熊朝瑞, 俄木曲者. 山羊 KLF13 基因的克隆及表达分析[J]. *农业生物技术学报*, 2017, 25(1): 102-109.
ZHU JJ, LIN YQ, WANG Y, LI Q, LIN S, XIONG CR, EMU QZ. Cloning and expression analysis of goat (*Capra hircus*) *KLF13* gene[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(1): 102-109 (in Chinese).
- [27] JANG MH, MUKHERJEE S, CHOI MJ, KANG NH, PHAM HG, YUN JW. Theobromine alleviates diet-induced obesity in mice *via* phosphodiesterase-4 inhibition[J]. *European Journal of Nutrition*, 2020, 59(8): 3503-3516.
- [28] AVILA DV, BARKER DF, ZHANG JW, MCCLAIN CJ, BARVE S, GOBEJISHVILI L. Dysregulation of hepatic cAMP levels *via* altered *Pde4b* expression plays a critical role in alcohol-induced steatosis[J]. *Journal of Pathology*, 2016, 240(1): 96-107.
- [29] XU SZ, WANG YJ, LI ZY, HUA Q, JIANG M, FAN XM. LncRNA GAS5 knockdown mitigates hepatic lipid accumulation *via* regulating miR-26a-5p/PDE4B to activate cAMP/CREB pathway[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2022, 13: 889858.
- [30] GRIMSON A, FARH KKH, JOHNSTON WK, GARRETT-ENGELE P, LIM LP, BARTEL DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing[J]. *Molecular Cell*, 2007, 27(1): 91-105.

(本文责编 郝丽芳)