

• 动物及兽医生物技术 •

牛下丘脑 lncRNA SNHG3 的筛选及其调控 CART 表达的功能鉴定

郝琴琴, 闫俊蓉, 任静, 成俊丽, 朱芷葳, 李鹏飞*

山西农业大学 生命科学学院, 山西 太谷 030801

郝琴琴, 闫俊蓉, 任静, 成俊丽, 朱芷葳, 李鹏飞. 牛下丘脑 lncRNA SNHG3 的筛选及其调控 CART 表达的功能鉴定[J]. 生物工程学报, 2024, 40(7): 2162-2177.

HAO Qinqin, YAN Junrong, REN Jing, CHENG Junli, ZHU Zhiwei, LI Pengfei. Screening of the lncRNA SNHG3 regulating CART expression in the bovine hypothalamus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(7): 2162-2177.

摘要: 本研究旨在筛选调控牛下丘脑可卡因-苯丙胺调节转录肽(cocaine and amphetamine regulated transcript peptide, CART)表达的长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)小核仁 RNA 宿主基因 3 (small nucleolar RNA host gene 3, SNHG3), 明确 lncRNA SNHG3 调控牛下丘脑 CART 表达的作用机制。利用 StarBase v2.0、NCBI、DIANA tools 数据库预测分别与极显著抑制 CART 表达的 miR-381、miR-491 存在靶向关系的 lncRNAs, 分析其结合位点; 选取 3 头健康成年西门塔尔母牛, 提取其下丘脑组织总 RNA, 通过半定量 RT-PCR 技术鉴定所筛选的 lncRNAs 内源表达情况; 双荧光素酶报告基因技术检测 miR-381/491 与 lncRNAs 间的靶向结合关系; 构建 lncRNAs、CART 过表达载体及 miR-381/491 mimics, 分别转染至 293T 细胞, 分析 lncRNAs 对 CART 基因表达的调控作用机制; 利用动物活体实验对在细胞水平调控作用效果最强的 lncRNA 进行功能分析。lncRNA TUG1、SNHG3 与 miR-381 存在结合位点, lncRNA H19、SNHG12、DANCR 与 miR-491 存在结合位点, 且 lncRNA TUG1、SNHG3、H19、SNHG12、DANCR 均在牛下丘脑中有表达; 双荧光素酶检测结果显示, miR-381 显著抑制 TUG1-WT 重组荧光质粒的相对荧光活性($P<0.05$), 极显著抑制 SNHG3-WT 重组荧光质粒的相对荧光活性($P<0.01$); miR-491 显著抑制 DANCR-WT 和 H19-WT 的荧光素酶活性表达($P<0.05$), 极显著抑制 SNHG12-WT 荧光素酶活性表达($P<0.01$); 在细胞水平, lncRNA SNHG3 通过特异性结合 miR-381 极显著提高 CART 表达($P<0.001$), lncRNA SNHG12 通过特异性结合 miR-491 极显著提高 CART 表达($P<0.01$), 其中, lncRNA SNHG3 调控 CART 表达效果最强; 动物实验结果表明, lncRNA SNHG3 通过特异性结合 miR-381 显著提高 CART mRNA 和蛋白表达。本研究证实了

资助项目: 国家自然科学基金(31873002); 山西省应用基础研究计划面上项目(20210302123380); 山西农业大学横向科技项目(2022HX010, 2021HX23, 2020HX06); 山西省现代农业牛产业技术体系建设专项资金

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31873002), the Shanxi Province Applied Basic Research Program General Project (20210302123380), the Shanxi Agricultural University Horizontal Science and Technology Project (2022HX010, 2021HX23, 2020HX06), and the Shanxi Province Special Funds for the Construction of Modern Agricultural Cattle Industry Technology System.

*Corresponding author. E-mail: adamlpf@126.com

Received: 2023-09-24; Accepted: 2024-03-13; Published online: 2024-04-17

lncRNA SNHG3 作为 *miR-381* 的竞争性内源 RNA (competing endogenous RNAs, ceRNA), 在转录和转录后水平均显著上调 *CART* 表达, 为进一步研究牛下丘脑 *CART* 的分子网络调控机制奠定了基础。

关键词: 牛; 卵泡发育; 下丘脑可卡因-苯丙胺调节转录肽(CART); 长链非编码 RNA (lncRNAs); *miR-381/491*

Screening of the lncRNA SNHG3 regulating *CART* expression in the bovine hypothalamus

HAO Qinqin, YAN Junrong, REN Jing, CHENG Junli, ZHU Zhiwei, LI Pengfei*

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

Abstract: This study aimed to screen for the long non-coding RNA (lncRNA) small nucleolar RNA host gene 3 (SNHG3) capable of regulating the expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcriptional peptide (CART) in the bovine hypothalamus and elucidate the underlying mechanism. StarBase v2.0, NCBI, and DIANA tools were used to predict the lncRNAs targeting *miR-381* and *miR-491*, which were responsible for inhibiting *CART* expression. The binding sites were analyzed, and the endogenous expression of the selected lncRNAs was determined by semi-quantitative RT-PCR of the hypothalamus tissue from three healthy adult Simmental cows. The dual-luciferase reporter gene assay was employed to detect the targeted binding relationship between *miR-381/491* and lncRNAs. The over-expression vectors of lncRNAs, *CART*, and *miR-381/491* mimics were constructed and transfected into 293T cells to reveal the mechanism of lncRNAs in regulating the *CART* expression. Animal experiments were conducted to analyze the regulatory function of the strongest lncRNA at the cellular level. The results showed that lncRNAs TUG1, SNHG3, H19, SNHG12, and DANCR were expressed in the bovine hypothalamus. The lncRNAs TUG1 and SNHG3 had binding sites for *miR-381*, and H19, SNHG12, and DANCR had binding sites for *miR-491*. The dual-luciferase reporter gene assay showed that *miR-381* inhibited the relative luciferase activities of TUG1-WT ($P<0.05$) and SNHG3-WT ($P<0.01$), and *miR-491* inhibited the luciferase activities of DANCR-WT ($P<0.05$), H19-WT ($P<0.05$), and SNHG12-WT ($P<0.01$). SNHG3 and SNHG12 up-regulated the *CART* expression by specifically binding to *miR-381* ($P<0.001$) and *miR-491* ($P<0.01$), respectively, and SNHG3 had the strongest effect of regulating *CART* expression. The results from animal experiments showed that SNHG3 significantly up-regulated the mRNA and protein levels of *CART* by specifically binding to *miR-381*. This study confirmed that the lncRNA SNHG3, acting as a competing endogenous RNA of *miR-381*, significantly up-regulated *CART* expression at the transcriptional and post-transcriptional levels, laying a foundation for deciphering the mechanism of the molecular network regulation of *CART* in the bovine hypothalamus.

Keywords: bovine; follicular development; cocaine and amphetamine regulated transcript peptide (CART); long non-coding RNA (lncRNAs); *miR-381/491*

牛属于单胎动物,通常一个发情期内出现2-3个卵泡波,最终仅有一个优势卵泡(dominant follicle, DF)发育成熟并释放卵子。因此,排卵卵泡的数量和质量直接影响优良种畜扩繁及胚胎工程技术的应用。研究表明,可卡因-苯丙胺调节转录肽(cocaine-and amphetamine-regulated transcript, CART)是下丘脑分泌的一种内源性神经肽,可通过下丘脑-垂体-卵巢(hypothalamic-pituitary-ovary, HPO)轴直接作用于牛卵泡颗粒细胞(granulosa cells, GCs),抑制促卵泡素(follicle stimulating hormone, FSH)介导的雌激素(estrogen, E₂)分泌,对牛卵泡发育起显著负调控作用,是抑制卵泡优势化的重要因子^[1];体外培养鸡垂体细胞发现,添加促性腺激素释放激素(gonadotropin-releasing hormone, GnRH),可促进 CART mRNA 的表达^[2]。

目前,对 CART 的研究主要集中于 CART 肽的定位、加工、功能及受体鉴定^[3-5],而对 CART 表达的分子调控机制鲜有报道。竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA)网络调控机制是不同类型 RNA (如 mRNA、lncRNA、环状 RNA 等)通过与 miRNA 结合来相互调控表达的一种方式^[6]。任静等^[7]研究发现, *bta-miR-377* 和 *CART* 在牛下丘脑组织中均有表达,且 *bta-miR-377* 通过与 *CART* 3'UTR 特异性结合抑制 PC12 细胞中 *CART* 表达。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)是一类长度大于 200 nt 的 RNA,能够参与卵泡发育、卵母细胞成熟、GCs 增殖与凋亡等生殖过程^[8-11],其功能研究主要集中于 lncRNA 作为 miRNA 的 ceRNA 对下游靶基因转录后水平的表达发挥的调控作用^[12-15],因此, lncRNA/miRNA/*CART* 间可能存在相互作用。本课题组前期对调控 *CART* 表达的 miRNA 网络展开了研究,并将 *miR-381/491* 作为调控 *CART* 表达的关键 miRNAs^[16],而 lncRNA 对 *CART* 表达的调控机

制目前未见相关报道。本研究利用 PCR 扩增、生物信息学分析、双荧光素酶报告基因技术对极显著抑制牛下丘脑 *CART* 表达的 *miR-381/491* 靶向结合的 lncRNA 进行分析和鉴定;利用细胞共转染技术探究 lncRNAs 对牛下丘脑 *CART* 表达的作用机制,筛选调控 *CART* 表达效果最强的 lncRNA SNHG3;并通过动物活体实验对筛选获得的 lncRNA SNHG3 进行功能验证。本研究首次探究了 lncRNA 对牛下丘脑 *CART* 表达的调控作用,进一步完善了牛下丘脑 *CART* 的分子网络调控机制,同时也丰富了 *CART* 调控牛卵泡发育的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验样品

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.XS.0090170147)要求执行。

山西省文水县肉牛屠宰场选取 3 头健康成年西门塔尔母牛,屠宰后采集其下丘脑组织,在无菌杜氏磷酸缓冲盐溶液(Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS)中洗涤后立即投入液氮保存。40 只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 6 周龄 ICR 雌性小鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,适应性饲养 7 d,处死后取其下丘脑组织于液氮中保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 牛下丘脑 lncRNAs-miRNAs 靶向关系及结合位点预测

从 miRBase 数据库(<https://www.mirbase.org/>)中获取牛和人 *miR-381/491* 的 FASTA 序列,利用 DNAMAN 进行序列比对;利用 StarBase v2.0 (<https://starbase.sysu.edu.cn/starbase2/index.php>)、NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、DIANA tools (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>)数据库预测 *miR-381/491* 结合的

lncRNAs, 并对这 3 个数据库中获取的信息取交集; 利用 RNAhybrid (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) 预测 lncRNA-miRNAs 结合位点。

1.2.2 引物设计与合成

从 NCBI 数据库中分别获取牛 (*Bos Taurus*) 相对应 lncRNA TUG1、SNHG3、H19、SNHG12、DANCR、miR-381/491 序列, 利用 Primer 5.0 在线设计 lncRNA-miRNA 包括结合位点 300 bp 左右的特异性引物(表 1), 交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence of primer (5'→3')
RT-PCR	
TUG1-F	AGAGACAATGACTGAGCAAGCACTG
TUG1-R	AACAGGACAGGAGTGGAGGTGAAG
SNHG3-F	TCACCGACTTCGCAGTTAGCAATG
SNHG3-R	GGTCTTTTGAGCCTTCCAGGTCAC
H19-F	GGTCCTTGCTCTCCTGGTCTCC
H19-R	GCTCTCTGGAAATGCCCTTGCC
SNHG12-F	CGTCGGTCGTCTTGCTGTCTTG
SNHG12-R	TCATCCTGGAATCTTCTGGCACAAC
DANCR-F	CACAAGAAGCGTCACTCCACTGAG
DANCR-R	CTGTAGCCTGCACGGACTGTAATC
qRT-PCR	
U6-F	GGAACGATACAGAGAAGATTAGC
U6-R	TGGAACGCTTCACGAATTTGCG
β-actin-F	GGGACCTGACTGACTACCTC
β-actin-R	TCATACTCCTGCTTGCTGAT
miR-381-F	CCGTATACAAGGGCAAGCTCTCTGT
miR-491-F	ATAGTGGGGAACCCTTCCATGAGG
CART-F	CCTGCTGCTGCTGCTACCTTTG
CART-R	CCACGGCGGAGTAGATGTCCAG
TUG1-F	TGGTGGGCATCTCAAATCCGTATC
TUG1-R	GGGACTGTGGTCTTGTGACATTGG
SNHG3-F	CCTCACCGACTTCGCAGTTAGC
SNHG3-R	ATGGGTTCCACTCCAGTAGTTTTGC
H19-F	GGTCCTTGCTCTCCTGGTCTCC
H19-R	CGATATCACCTGTGCTGCCTGAC
SNHG12-F	CGTCGGTCGTCTTGCTGTCTTG
SNHG12-R	GCTCAACATCTTGCCGCCTCTAG
DANCR-F	CACAAGAAGCGTCACTCCACTGAG
DANCR-R	CTGTGGCAGACCCAAGGTTTCC

1.2.3 牛下丘脑组织总 RNA 提取与 RT-PCR 反应

Trizol 法提取牛下丘脑组织总 RNA, Nanodrop 超微量核酸蛋白测定仪检测 RNA 浓度, 合格后进行反转录, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。按照反转录试剂盒说明书配制 20 μL 反应体系: 去除基因组反应液 10 μL, Primer Script RT Enzyme Mix I 1 μL, RT Primer Mix 1 μL, 5×Primer Script Buffer II 4 μL, RNase-Free ddH₂O 4 μL; 反应条件为: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 保存。

1.2.4 重组载体质粒构建及双荧光素酶活性检测

获取 miR-381 和 miR-491 预测的有相互结合位点的 lncRNAs 片段序列及突变位点序列, 并在序列的 5' 和 3' 端分别加入 Sac I 和 Xho I 酶切位点, 交由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。利用限制性内切酶 (Sac I、Xho I) 对 pmirGLO 载体进行双酶切, 酶切产物经 T4 DNA 连接酶连接后转化感受态细胞, 选取阳性重组质粒测序, 获得 lncRNA TUG1、SNHG3、H19、SNHG12、DANCR 野生型 (wild type, WT) 和突变型 (mutant type, MUT) 双荧光素酶载体。

将 lncRNA TUG1、SNHG3、H19、SNHG12、DANCR 野生型和突变型双荧光素酶载体分别与 miR-381/491 mimics 共转染至 293T 细胞 (人胚肾细胞), 具体方法参照 TransIntroTM EL 说明书进行, 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 36 h, 报告基因细胞裂解液裂解细胞, 参照双荧光素酶检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司) 说明书测定萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性, 萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性的比值即为荧光素酶相对活性 (relative luciferase activity, RLA)。

1.2.5 293T 细胞转染

利用限制性内切酶 (*Hind* III、*Kpn* I) 将 lncRNAs 序列克隆到 pcDNA3.1-EGFP 载体上, 获得 pcDNA3.1-EGFP-TUG1、pcDNA3.1-EGFP-SNHG3、pcDNA3.1-EGFP-H19、pcDNA3.1-EGFP-

SNHG12、pcDNA3.1-EGFP-DANCR 过表达载体。根据上述序列设计 lncRNAs、miRNA、CART 定量引物, U6 和 β -actin 作为内参基因, 交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 具体引物序列见表 1。

按照 5×10^5 /孔的密度将 293T 细胞接种于 24 孔板, 细胞融合度达到 50%–60% 时, 将 lncRNA 过表达载体质粒、miR-381/491 mimics、CART 过表达载体质粒(克隆到 pEX-1 上)共转染至 293T 细胞。按照质粒总量:转染试剂($\mu\text{g}:\mu\text{L}$)=1:3 进行转染, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 5 h 后更换培养液, 继续培养 24 h。当细胞融合度达到 70%–80% 时, 收集细胞进行下一步实验。

1.2.6 qRT-PCR 检测

Trizol 法提取上述收集的 293T 细胞总 RNA, 反转录获得 cDNA, 统一浓度后进行 qRT-PCR 扩增。反应条件: 95 °C 10 s; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 72 °C 20 s, 40 个循环; 溶解曲线阶段: 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s。

1.2.7 小鼠脑室注射处理

将 40 只 6 周龄 SPF 级 ICR 雌性小鼠适应性饲养 7 d 后, 随机分为空白组、生理盐水组、pcDNA3.1-EGFP 组及 lncRNA SNHG3 过表达组, 每组 10 只。将 lncRNA SNHG3 过表达质粒稀释至 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 按照质粒: EntransterTM-in vivo ($\mu\text{g}:\mu\text{L}$)=1:2 混匀配制, 室温静置 15 min。小鼠固定于脑定位仪后, 用 75% 乙醇擦拭头部, 将微量注射器放于头部正中线和两耳连线交点位置左/右 1.2 mm, 垂直颅骨进针 2.2 mm, 以 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流量分别注射生理盐水、pcDNA3.1-EGFP 和 lncRNA SNHG3 过表达质粒各 2 μL , 注射后观察小鼠活力, 无异样可放回鼠笼。72 h 后进行眼球采血, 将装有全血的 EP 管倾斜 45°, 室温放置 2 h, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 析出血清,

取上清-80 °C 保存; 断颈处死小鼠, 手术剪剥离大脑, 分离下丘脑于液氮保存备用。

1.2.8 Western blotting 检测

WB Lysis Buffer 裂解液提取小鼠下丘脑总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度, 浓度统一后取 40 μg 进行 SDS-PAGE, 转至硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane, NC), 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 孵育 CART 抗体(北京康为世纪生物科技有限公司), 4 °C 过夜, 第 2 天用 1 \times TBST 缓冲液洗涤 3 次后, 37 °C 摇床孵育二抗 1 h (北京康为世纪生物科技有限公司), 1 \times TBST 缓冲液洗涤 3 次, 使用 ECL 发光液将蛋白条带显影成像。

1.2.9 统计分析

$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各基因相对表达量; Image J 软件分析 Western blotting 条带灰度值, 计算各组 CART 蛋白浓度; 每个实验重复 3 次, 结果采用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用 GraphPad Prism 8.0 软件对所有结果进行 t 检验分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 miRNAs-lncRNAs 靶向关系预测

利用生物信息学分析与 miR-381/491 结合的 lncRNAs, 结果如图 1 所示, lncRNA TUG1、SNHG3 与 miR-381 存在靶向结合关系, lncRNA H19、SNHG12、DANCR 与 miR-491 存在靶向结合关系。

2.2 牛下丘脑 lncRNAs 内源性表达分析

以牛下丘脑 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 结果显示(图 2), lncRNA TUG1、SNHG3、DANCR、H19、SNHG12 的部分片段大小分别为 266、374、238、687、356 bp, 条带清晰、无特异性扩增, 测序结果与 NCBI 上已公布序列完全一致, 表明以上 lncRNAs 在牛下丘脑中均有表达, 可进行下一步实验。

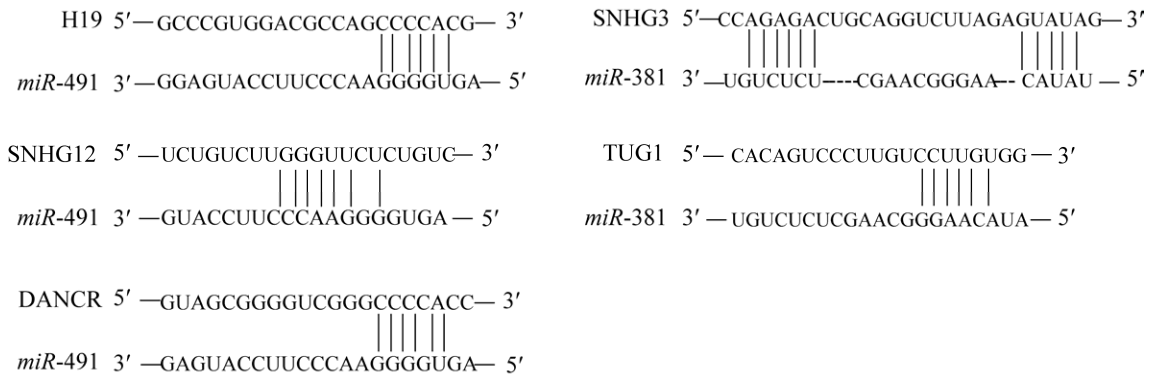


图 1 miRNAs-lncRNAs 的靶向关系

Figure 1 The targeting relationship of miRNAs-lncRNAs.

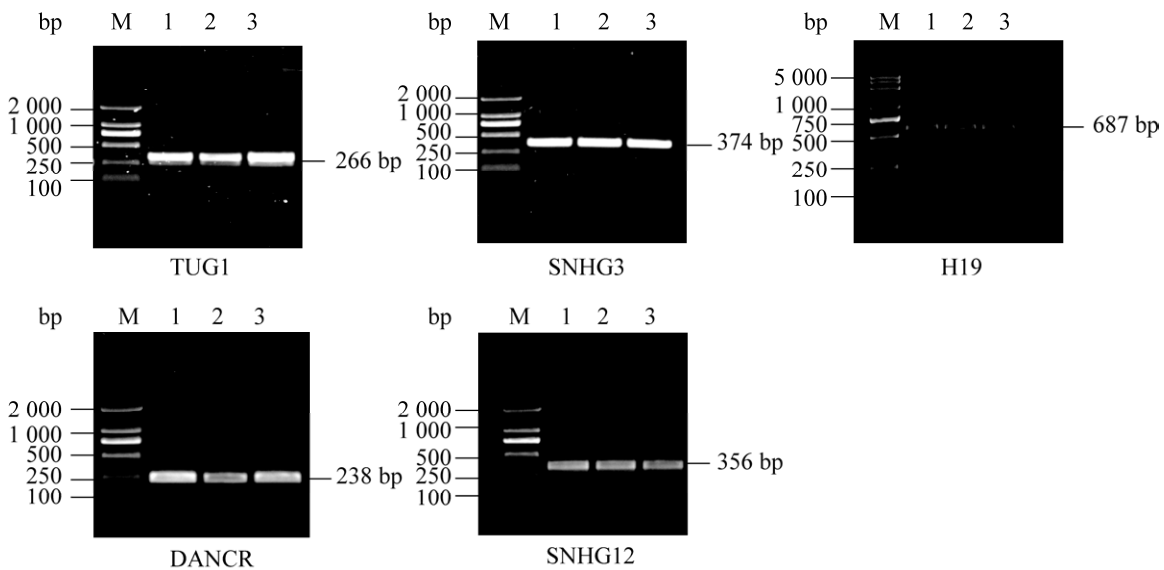


图 2 lncRNAs 内源性表达 M: DNA marker. 泳道中 1、2、3 代表实验重复 3 次

Figure 2 The endogenous expression of lncRNAs. M: DNA marker. 1, 2, and 3 in the lane represent the experiment repeated three times.

2.3 双荧光素酶报告基因靶标关系分析

阴性对照 mimic (negative control mimic, NC mimic)与 pmirGLO 载体、miR-381/491 与 pmirGLO 载体分别共转染至 293T 细胞, 结果显示(图 3A), 两组相对荧光活性无显著差异($P>0.05$), 表明实验体系良好; miR-381 mimics 与 TUG1-WT 共转染时, 与 NC mimic 和 TUG1-WT 组相比, 相对荧光活性显著下降($P<0.05$); miR-381 mimics 与

TUG1-MUT 共转染时, 相对荧光活性与 NC mimic 和 TUG1-MUT 组相比无显著差异($P>0.05$), 表明 miR-381 与 lncRNA TUG1 存在结合位点。miR-381 mimics 与 SNHG3-WT 共转染时, 与 NC mimic 和 SNHG3-WT 组相比, 相对荧光活性极显著下降($P<0.001$, 图 3B); miR-381 mimics 与 SNHG3-MUT 组共转染时, 相对荧光活性与 NC mimic 和 SNHG3-MUT 组相比无显著差异($P>0.05$), 表明

miR-381 与 lncRNA SNHG3 存在结合位点。

miR-491 mimics 与 H19-WT 共转染时, 与 NC mimic 和 H19-WT 组相比, 相对荧光活性显著下降 ($P < 0.05$, 图 3C); *miR-491* mimics 与 H19-MUT 共转染时, 相对荧光活性与 NC mimic 和 H19-MUT 组相比无显著差异 ($P > 0.05$), 表明 *miR-491* 与 lncRNA H19 存在结合位点。*miR-491* mimics 与 SNHG12-WT 共转染时, 与 NC mimic 和 SNHG12-WT 组相比, 相对荧光活性极显著下降 ($P < 0.01$, 图 3D); *miR-491* mimics 与

SNHG12-MUT 组共转染时, 相对荧光活性与 NC mimic 和 SNHG12-MUT 组相比无显著差异 ($P > 0.05$), 表明 *miR-491* 与 lncRNA SNHG12 存在结合位点。*miR-491* mimics 与 DANCR-WT 共转染时, 与 NC mimic 和 DANCR-WT 组相比, 相对荧光活性显著下降 ($P < 0.05$, 图 3E); *miR-491* mimics 与 DANCR-MUT 组共转染时, 相对荧光活性与 NC mimic 和 DANCR-MUT 组相比无显著差异 ($P > 0.05$), 表明 *miR-491* 与 lncRNA DANCR 存在结合位点。

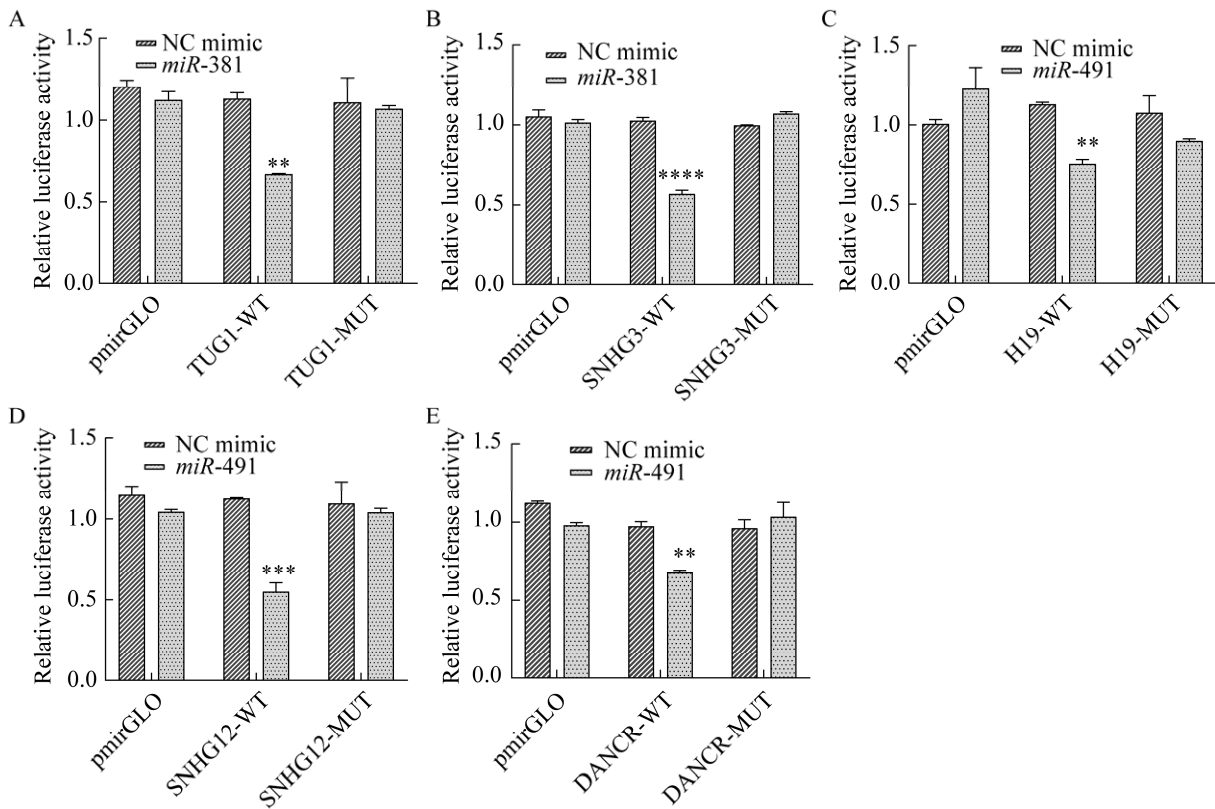


图 3 lncRNA 与 miRNA 相对荧光素酶活性检测 A-E 依次为 TUG1-*miR-381*、SNHG3-*miR-381*、H19-*miR-491*、SNHG12-*miR-491*、DANCR-*miR-491* 双荧光素酶报告基因检测结果. ****: $P < 0.0001$, ***: $P < 0.001$, **: $P < 0.01$

Figure 3 Detection of relative luciferase activity between lncRNA and miRNA. A-E are the results of double luciferase reporter gene detection. A: TUG1-*miR-381*; B: SNHG3-*miR-381*; C: H19-*miR-491*; D: SNHG12-*miR-491*; E: DANCR-*miR-491*. ****: $P < 0.0001$, ***: $P < 0.001$, **: $P < 0.01$.

2.4 细胞转染效果

pcDNA3.1-EGFP 和 pEX-1 分别转染至 293T 细胞, 培养 24 h 后观察细胞生长状况, 结果如图 4 所示, 转染后细胞生长状况良好、荧光强度高、质粒表达稳定、分布均匀, 表明 pcDNA3.1-EGFP 和 pEX-1 过表达载体转染成功, 可用于后续实验。

2.5 miR-381/491 对 CART 表达的影响

瞬时转染 miR-381/491-CART 后, miR-381/491 表达结果见图 5。相比于 miR-381/491+PEX-3 组(图 5A), miR-381/491+CART 组中 miR-381/491 的表达量均极显著降低($P<0.0001$, $P<0.001$), 表明各组 miR-381/491 转染成功; 对 CART 相对表达量分析见图 5B, miR-381/491+CART 组中 CART 表达量均极显著低于 NC mimic+CART 组($P<0.001$, $P<0.0001$), 表明

miR-381/491-CART 过表达细胞模型构建成功, miR-381/491 均极显著抑制 CART 表达。

2.6 lncRNAs 对 CART 表达的影响

分别瞬时共转染 lncRNA TUG1/SNHG3/H19/SNHG12/DANCR+CART 后, 各实验组中 lncRNA TUG1、SNHG3、H19、SNHG12 和 DANCR 的表达量如图 6A 所示, 表明 lncRNA TUG1、SNHG3、H19、SNHG12 和 DANCR 均成功转染至 293T 细胞; CART mRNA 相对表达量分析由图 6B 可知, 各实验组与对照组 pcDNA3.1-EGFP+CART 中, CART 相对表达量无显著差异($P>0.05$), 表明 TUG1/SNHG3/H19/SNHG12/DANCR-CART 过表达细胞模型构建成功, lncRNA TUG1、SNHG3、H19、SNHG12 和 DANCR 均对 CART 表达无显著影响($P>0.05$)。

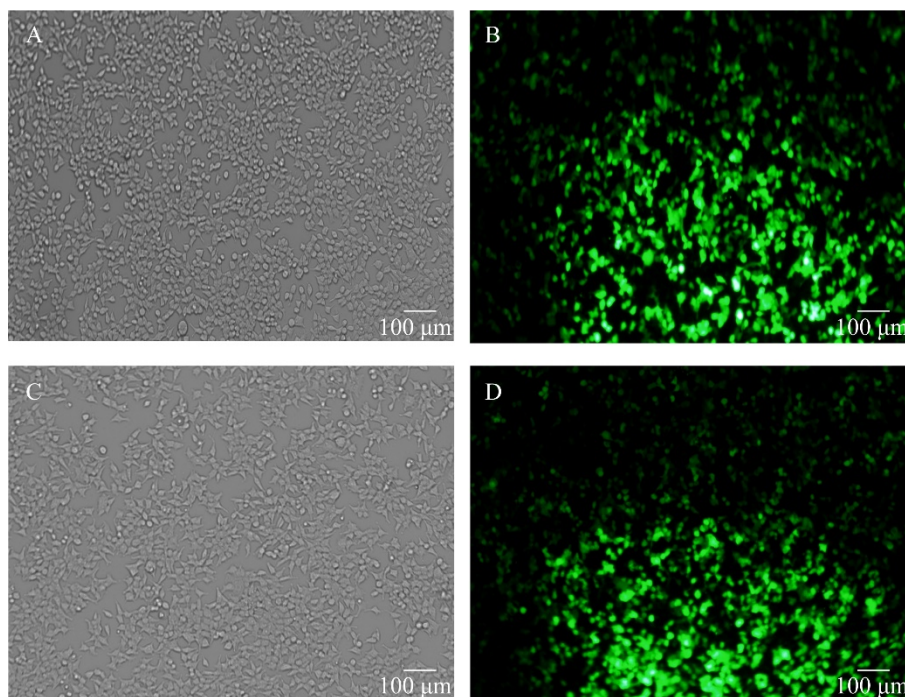


图 4 细胞转染效果(10×) A、C 为普通显微镜下观察结果, B、D 为荧光显微镜下观察结果

Figure 4 The transfection effect of cells (10×). A and C are the results of fluorescence microscope observation. B and D are the results of fluorescence microscope observation.

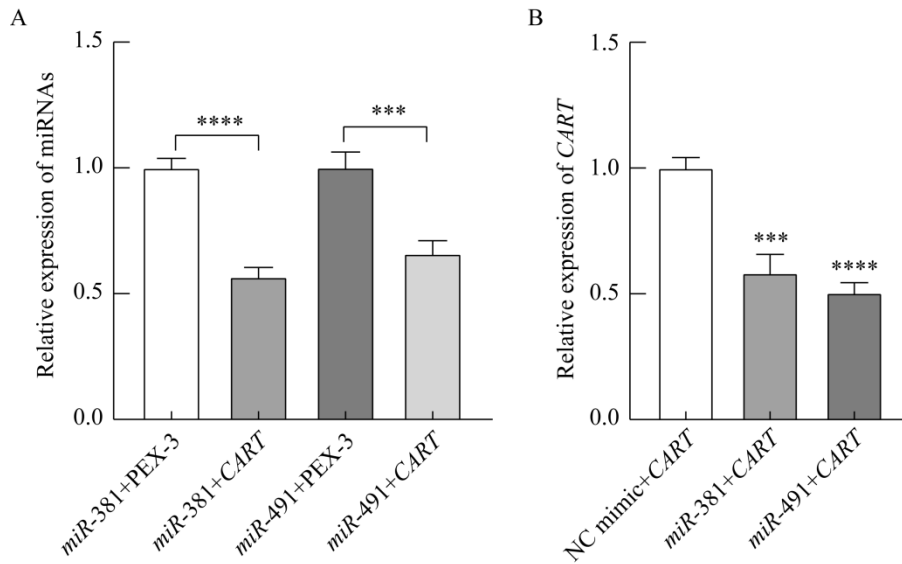


图 5 miRNAs 和 *CART* 表达量检测 A: 各组中 *miR-381*、*miR-491* 过表达检测. B: 各组中 *CART* mRNA 相对表达量检测. ****: $P < 0.0001$; ***: $P < 0.001$

Figure 5 Relative expression of miRNAs and *CART*. A: The overexpression detection of *miR-381* and *miR-491* in each group. B: The relative expression of *CART* mRNA in each group. ****: $P < 0.0001$; ***: $P < 0.001$.

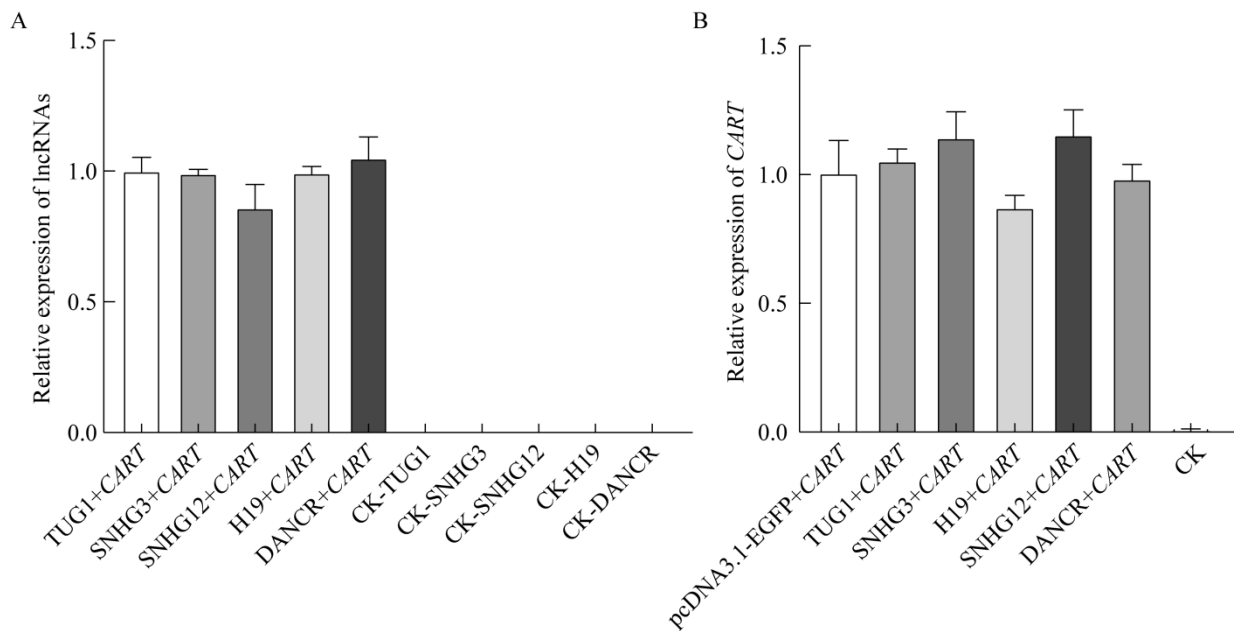


图 6 lncRNAs 和 *CART* mRNA 相对表达量 A: 各组中 lncRNA TUG1、SNHG3、SNHG12、H19、DANCR 过表达检测. B: 各组中 *CART* 相对表达量检测

Figure 6 Relative expression of lncRNAs and *CART* mRNA. A: The overexpression detection of lncRNA TUG1, SNHG3, SNHG12, H19 and DANCR in each group. B: The relative expression of *CART* mRNA in each group.

2.7 牛下丘脑 lncRNAs-miRNAs 对 CART 表达的影响

2.7.1 瞬时转染后 lncRNAs 过表达检测

293T 细胞瞬时共转染 lncRNAs-miRNAs-CART 检测各组 lncRNA 表达情况,结果显示(图 7),实验组 TUG1/SNHG3+miR-381+CART、H19/SNHG12/DANCR+miR-491+CART 与对照组 TUG1/SNHG3/H19/SNHG12/DANCR+NC+CART 相比, lncRNA TUG1、SNHG3、H19、SNHG12 和 DANCR 表达量均极显著降低($P<0.0001$, $P<0.001$),表明 lncRNA TUG1、SNHG3、H19、SNHG12 和 DANCR 过表达质粒均转染成功。

2.7.2 瞬时转染后 miRNAs 过表达检测

293T 细胞瞬时共转染 lncRNAs-miRNAs-CART 检测 miR-381 过表达情况,结果显示(图 8),TUG1/SNHG3+miR-381+CART 与对照组 TUG1/SNHG3+NC+CART 相比,各实验组中均有 miR-381 表达,表明 miR-381 转染成功; H19/SNHG12/DANCR+miR-491+CART 组相比于 H19/SNHG12/

DANCR+NC+CART 组,均有 miR-491 表达,表明各实验组中 miR-491 转染成功。

2.7.3 瞬时转染 lncRNAs-miRNAs-CART 对 CART 表达的影响

qRT-PCR 检测 CART 表达情况,结果显示(图 9), pcDNA3.1-EGFP+miR-381/491+CART、TUG1/SNHG3/H19/SNHG12/DANCR+NC+CART、TUG1/SNHG3+miR-381+CART、H19/SNHG12/DANCR+miR-491+CART 组中均有 CART 表达,表明各组中 CART 均转染成功,各组 lncRNA-miRNA-CART 细胞模型也均构建成功。

对 CART mRNA 相对表达量进行显著性分析,结果显示, TUG1+miR-381+CART 组中 CART 表达量极显著低于 TUG1+NC+CART 组($P<0.01$),但与 miR-381+CART 组相比无显著差异($P>0.05$),表明 lncRNA TUG1 对 CART 调控作用不显著; SNHG3+miR-381+CART 组与 SNHG3+NC+CART 组之间 CART 表达量差异不显著($P>0.05$),但极显著高于 miR-381+CART 组

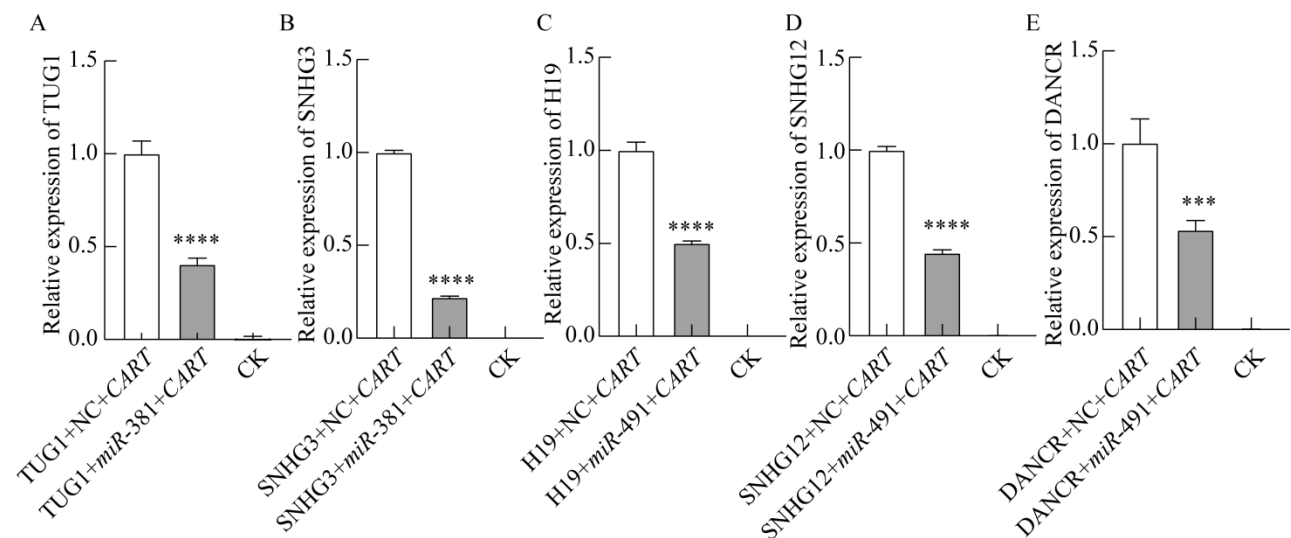


图 7 各组 lncRNA 相对表达量 A-E 依次为 TUG1、SNHG3、H19、SNHG12、DANCR 过表达检测。****: $P<0.0001$; ***: $P<0.001$

Figure 7 The relative expression of lncRNAs in each group. A-E are the overexpression detection of TUG1, SNHG3, H19, SNHG12 and DANCR. ****: $P<0.0001$; ***: $P<0.001$.

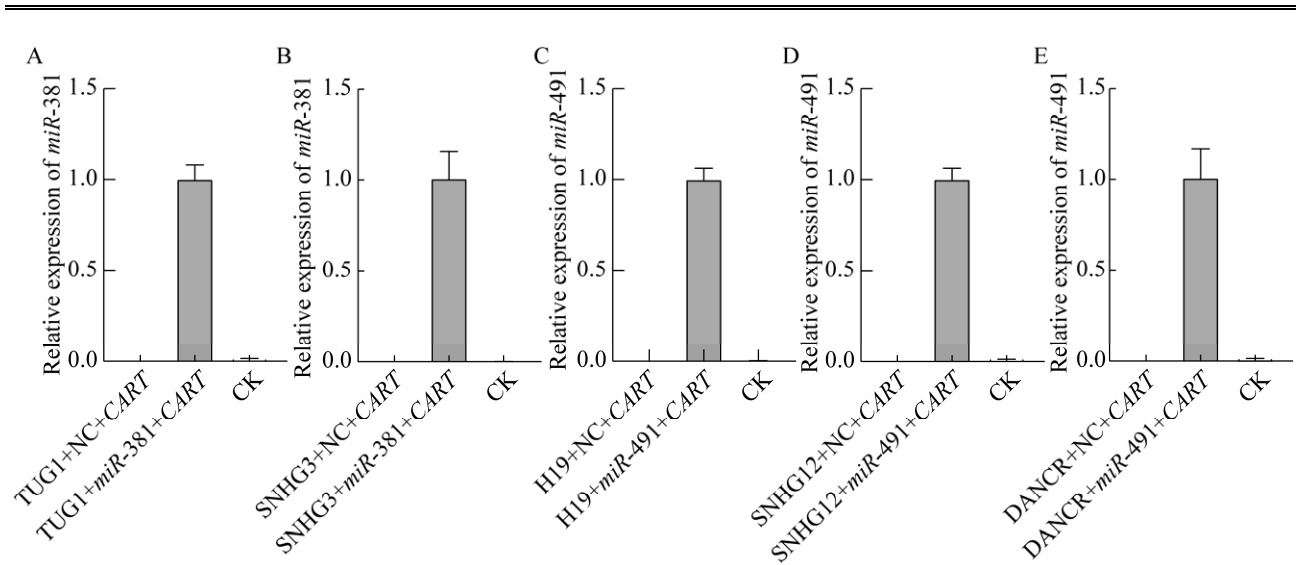


图8 各组 miRNAs 相对表达量 A 和 B 为 miR-381 过表达检测. C-E 为 miR-491 过表达检测

Figure 8 The relative expression of miRNAs in each group. A and B are the overexpression detection of miR-381. C-E are the overexpression detection of miR-491.

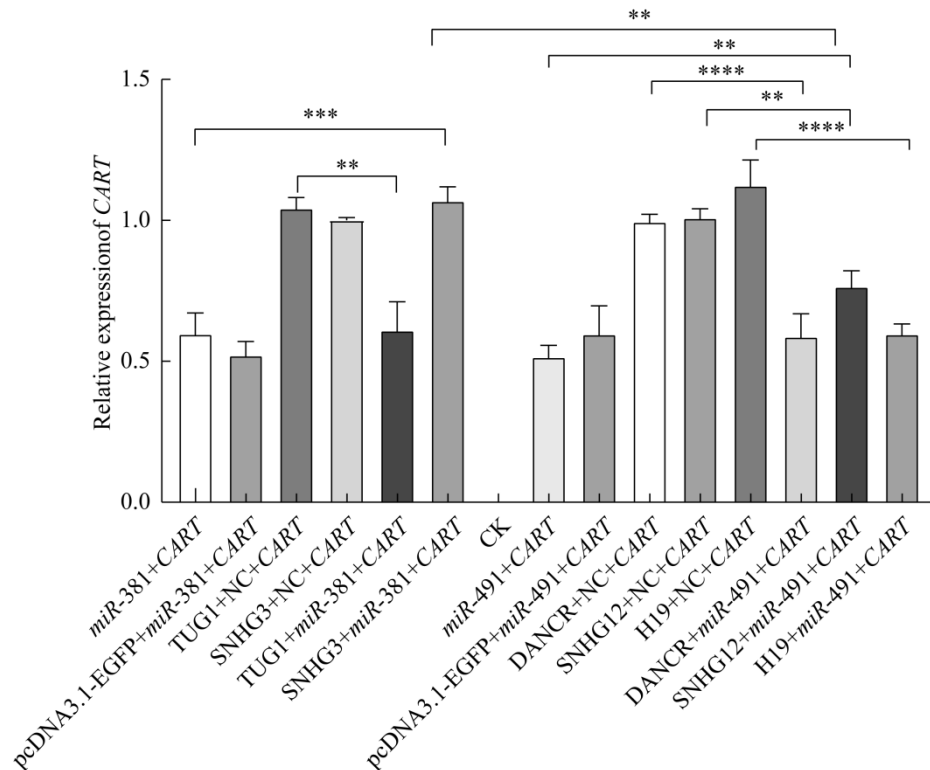


图9 各组 CART mRNA 相对表达量

Figure 9 Relative expression of CART mRNA in each group. ****: $P < 0.0001$; ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$.

($P < 0.001$), 表明 lncRNA SNHG3 通过特异性结合 miR-381 极显著增加 CART 表达; H19+miR-491+CART 组中 CART 表达量极显著低于

H19+NC+CART 组($P < 0.0001$), 但与 miR-491+CART 组相比无显著差异($P > 0.05$), 表明 lncRNA H19 对 CART 调控作用效果不显著; SNHG12+

miR-491+CART 组中 *CART* 表达量极显著低于 SNHG12+NC+CART 组($P<0.01$), 但极显著高于 *miR-491*+CART 组($P<0.01$), 表明 lncRNA SNHG12 可通过特异性结合 *miR-491* 极显著提高 *CART* 表达; DANCR+*miR-491*+CART 组中 *CART* 表达量极显著低于 DANCR+NC+CART 组($P<0.0001$), 但与 *miR-491*+CART 相比无显著差异($P>0.05$), 表明 lncRNA DANCR 对 *CART* 调控作用效果不显著; 同时, 由图 8 可知, SNHG3+*miR-381*+CART 组中 *CART* 表达量极显著高于 SNHG12+*miR-491*+CART 组($P<0.01$), 表明 lncRNA SNHG3 对 *CART* 表达的调控效果最强。

2.8 小鼠下丘脑 *miR-381*、lncRNA SNHG3 和 *CART* mRNA 表达显著性分析

qRT-PCR 检测 *miR-381*、lncRNA SNHG3 和 *CART* 在小鼠下丘脑中的表达情况, 结果显示(图 10A), *miR-381* 在空白组、生理盐水组、pcDNA3.1-EGFP 组和 SNHG3 组均有表达,

SNHG3 组 *miR-381* 表达量极显著低于其他各组($P<0.001$); lncRNA SNHG3 在各组中的表达量如图 10B 所示, SNHG3 组 lncRNA SNHG3 表达量极显著高于空白组、生理盐水组和 pcDNA3.1-EGFP 组($P<0.0001$), 表明 lncRNA SNHG3 过表达成功。小鼠体内过表达 SNHG3, 各组 *CART* mRNA 相对表达量如图 10C 所示, SNHG3 组 *CART* 表达量极显著高于空白组、生理盐水组和 pcDNA3.1-EGFP 组($P<0.01$), 表明 lncRNA SNHG3 通过特异性结合 *miR-381* 极显著提高 *CART* 表达。

2.9 *CART* 蛋白表达显著性分析

Western blotting 检测各组小鼠体内 *CART* 蛋白表达水平, 结果显示, 与空白组、生理盐水组、pcDNA3.1-EGFP 组相比, 脑室注射 lncRNA SNHG3 过表达质粒可显著提高 *CART* 蛋白表达($P<0.05$, 图 11), 表明 lncRNA SNHG3 通过特异性结合 *miR-381* 在转录后水平调控 *CART* 表达。

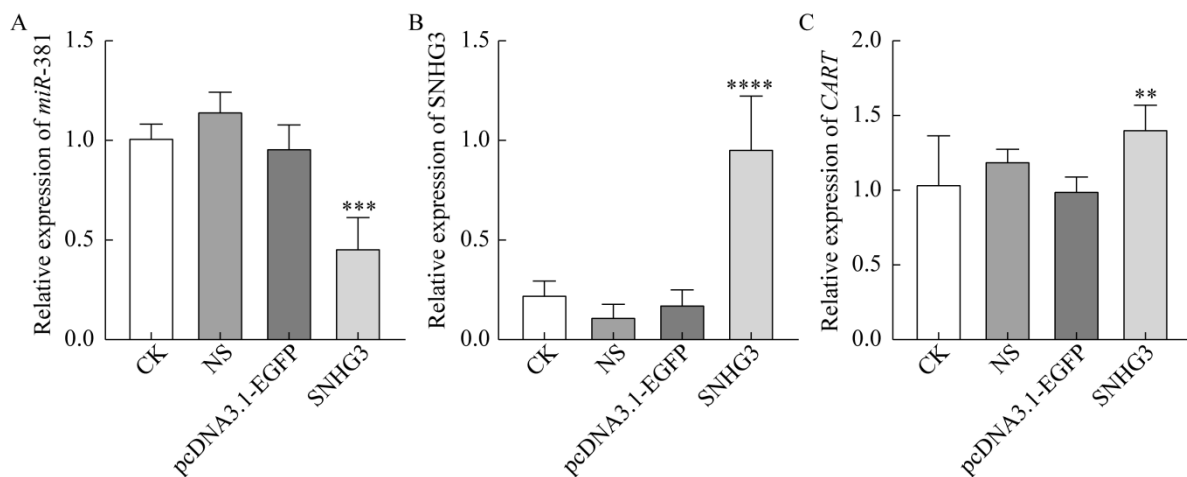


图 10 各组 *miR-381*、lncRNA SNHG3 和 *CART* mRNA 相对表达量 A: *miR-381* 内源性表达检测. B: lncRNA SNHG3 过表达检测. C: *CART* mRNA 相对表达量检测. CK: 空白对照组, NS: 生理盐水组(****代表 $P<0.0001$, ***代表 $P<0.001$, **代表 $P<0.01$)

Figure 10 The relative expression of *miR-381*, lncRNA SNHG3 and *CART* mRNA level in each group. A: The overexpression detection of *miR-381*. B: The overexpression detection of lncRNA SNHG3. C: The relative expression of *CART* mRNA. CK: Blank control group; NS: Normal saline group (****: $P<0.0001$; ***: $P<0.001$; **: $P<0.01$).

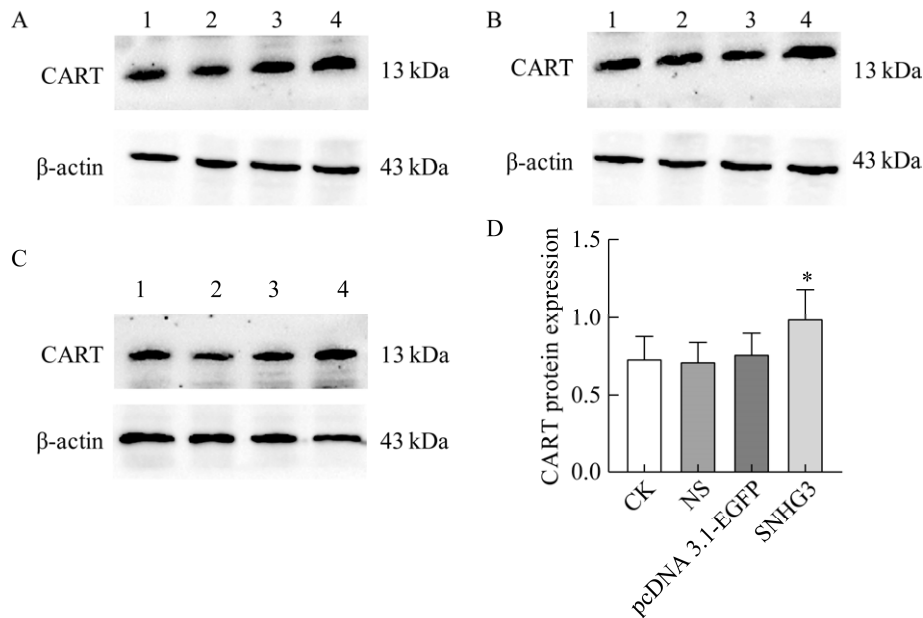


图 11 lncRNA SNHG3 对 CART 蛋白表达量的影响 A-C 为 Western blotting 部分检测结果. 1: 空白对照组; 2: 生理盐水组; 3: pcDNA3.1-EGFP 组; 4: lncRNA SNHG3 组. D: Image J 灰度分析结果. CK: 空白对照组; NS: 生理盐水组(*: $P < 0.05$)

Figure 11 The effect of lncRNA SNHG3 on the expression of CART protein. A-C are partial results of Western blotting detection. 1: Blank control group; 2: Normal saline group; 3: pcDNA3.1-EGFP group; 4: lncRNA SNHG3 group. D: Semi-quantitative densitometric analysis by Image J. CK: Blank control group; NS: Normal saline group (*: $P < 0.05$).

3 讨论

CART 是下丘脑分泌的一种神经肽, 在动物体内执行多种功能, 包括调控动物摄食和能量代谢平衡^[17]、调节机体应激反应^[18]、调控下丘脑-垂体-性腺轴和下丘脑-垂体-肾上腺轴^[19-20]; 调控动物卵泡发育, 引起卵泡闭锁^[21-22]。本课题组对 CART 的转录调控机制进行探究, 发现 *bta-miR-381* 和 *bta-miR-491* 可与牛下丘脑 CART 3'UTR 区特异性结合而极显著抑制 CART 转录和翻译。ceRNA 网络由 circRNA、lncRNA 和 miRNA 等各种 RNA 分子构成^[23], 该网络中各 RNA 分子间的相互作用由 miRNA 联结, 在基因表达过程中发挥重要调控作用。为进一步完善牛下丘脑 CART 的分子调控网络, 本研究初

步探究了调控 CART 表达的 lncRNA 功能, 丰富了调控 CART 表达的关键因子, 对进一步探究 CART 通过下丘脑-垂体-卵巢轴调控牛生殖生理的作用机制具有重要意义。

lncRNA 是一类无编码功能的 RNA, 已被证实是真核转录过程中的重要调控因子, 主要参与基因表观修饰、转录及转录后表达过程^[24]。lncRNA 发挥调控作用主要有两种形式: 与 RNA 结合蛋白直接作用而发挥效应; 或作为 miRNA 的 ceRNA, 通过减少或降解细胞中游离的 miRNA, 减弱其对靶基因的抑制作用^[25-26]。lncRNA TUG1、H19、DANCR 与 CART 存在结合位点, 但不参与 CART 的转录及转录后调控作用, 因此认为可能参与 CART 基因的表观修饰过程。SNHG3 是小核仁 RNA 宿主基因 (small

nucleolar RNA host genes, SNHG3)家族成员之一,同时存在于细胞质和细胞核^[27],可通过吸附多种 miRNA 调控下游基因表达。研究发现^[28],在黑色素瘤发生发展过程中, lncRNA SNHG3 通过 *miR-186-5p/WNT5A* 轴调控黑色素瘤细胞的增殖和侵袭能力; Liang 等^[29]研究发现,在七氟醚引起的脑组织退化过程中, lncRNA SNHG3 通过 NIMA 相关激酶 7 (NIMA-associated kinase7, NEK7)激活 NLRP3 促进七氟醚诱导的神经元损伤,表明 SNHG3 是神经元损伤的潜在靶基因;本研究初步探究了 lncRNA 对神经肽 CART 表达调控的影响,发现 lncRNA SNHG3 通过降解 *miR-381* 进而上调 CART 表达,发挥其 ceRNA 功能,在转录和转录后水平调控牛下丘脑 CART 的表达。

CART 广泛分布于动物的边缘下丘脑、室旁核、弓状核、伏隔核等部位,可通过 HPO 轴直接作用于卵巢卵泡 GCs。相比于牛,雌性小鼠具有饲养管理方便、繁殖周期短、便于实验室操作等优点^[30],是神经学和生殖发育研究中一种常用的模式动物。因此本研究选用雌性小鼠对 lncRNA SNHG3 功能展开探究。研究表明^[16], *mmu-miR-381* 成熟序列与 *bta-miR-381* 具有一致性, *mmu-miR-381* 和 CART mRNA 3'UTR 区结合位点与 *bta-miR-381* 和 CART mRNA 3'UTR 区结合位点一致,该研究结果与 miRNA 和 CART 序列在物种间具有高度保守性的理论相符^[31],表明实验的可行性;进一步在小鼠脑室注射 *miR-381* 发现, *miR-381* 能够与 CART mRNA 3'UTR 区特异性结合进而显著抑制 CART mRNA 和蛋白表达,这一结果为后续 lncRNA 对牛下丘脑 CART 的功能研究奠定基础。lncRNA 虽在物种间基因组染色体上的位置保守性较高,但其序列保守性极低^[32],表明小鼠内源性 lncRNA SNHG3 不会影响外源性注射

的牛 lncRNA SNHG3 与 *miR-381* 结合,而双荧光素酶报告基因实验结果表明, *miR-381* 能够特异性与牛 lncRNA SNHG3 结合,所以采用脑室注射法在活体内进行 lncRNA SNHG3 的功能验证。活体实验结果证实了, lncRNA SNHG3 可通过抑制 *miR-381*,上调 CART mRNA 和蛋白的表达,与细胞水平研究结果一致,表明牛 lncRNA SNHG3 通过 *miR-381* 在转录和转录后水平均调控 CART 表达,可将 lncRNA SNHG3 作为调控 CART 表达的潜在靶基因,为后续深入探究 CART 的分子调控机制和生物学功能奠定基础。

4 结论

本研究在牛下丘脑中检测到 lncRNA TUG1、SNHG3、H19、SNHG12、DANCR 的表达,通过构建双荧光素酶载体证实 lncRNA TUG1、SNHG3 与 *bta-miR-381* 能够靶向结合, lncRNA H19、SNHG12、DANCR 与 *bta-miR-491* 能够靶向结合;在细胞水平,明确了牛 lncRNA SNHG3 通过特异性结合 *bta-miR-381* 提高 CART 表达效果最强;活体实验证实,牛 lncRNA SNHG3 作为 ceRNA,显著上调 CART mRNA 和蛋白表达,表明 lncRNA SNHG3 通过 *bta-miR-381* 在转录和转录后水平均调控 CART 表达。

REFERENCES

- [1] 李鹏飞. 牛卵泡可卡因-苯丙胺调节转录肽(CART)受体的筛选[D]. 太谷: 山西农业大学, 博士学位论文, 2014.
LI P F. Screening of cocaine-and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) receptor of cattle follicle[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, PhD thesis, 2014 (in Chinese).
- [2] MO CH, LV C, HUANG L, LI ZY, ZHANG JN, LI J, WANG YJ. Regulation of pituitary cocaine- and amphetamine-regulated transcript expression and secretion by hypothalamic gonadotropin-releasing

- hormone in chickens[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 882-897.
- [3] 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.
- [4] IDELEVICH A, SATO K, AVIHAI B, NAGANO K, GALIEN A, ROWE G, GORI F, BARON R. Both NPY-expressing and CART-expressing neurons increase energy expenditure and trabecular bone mass in response to AP1 antagonism, but have opposite effects on bone resorption[J]. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2020, 35(6): 1107-1118.
- [5] 侯淑宁, 郝庆玲, 景灵婕, 王锴, 成俊丽, 吕丽华, 李鹏飞. 牛卵泡 CART 受体的筛选及其表达特性分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(3): 505-513.
- HOU SN, HAO QL, JING JJ, WANG K, CHENG JL, LV LH, LI PF. Screening and expression analysis of CART receptor in bovine follicle[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(3): 505-513 (in Chinese).
- [6] LAURESSERGUES D, COUZIGOU JM, CLEMENTE HS, MARTINEZ Y, DUNAND C, BÉCARD G, COMBIER JP. Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides[J]. *Nature*, 2015, 520: 90-93.
- [7] 任静, 郝琴琴, 成俊丽, 朱芷葳, 许冬梅, 贾雪纯, 李鹏飞. bta-miR-377 靶向调控牛下丘脑 CART 基因表达的研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(9): 3301-3309.
- REN J, HAO QQ, CHENG JL, ZHU ZW, XU DM, JIA XC, LI PF. Expression analysis of bta-miR-377 regulate *CART* gene in bovine hypothalamus[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 49(9): 3301-3309 (in Chinese).
- [8] PAN Y, YANG SF, CHENG JR, LV Q, XING QH, ZHANG RM, LIANG JY, SHI DS, DENG YF. Whole-transcriptome analysis of lncRNAs mediated ceRNA regulation in granulosa cells isolated from healthy and atresia follicles of Chinese buffalo[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8: 680182.
- [9] XIONG Y, LIU T, WANG SW, CHI HY, CHEN C, ZHENG J. Cyclophosphamide promotes the proliferation inhibition of mouse ovarian granulosa cells and premature ovarian failure by activating the lncRNA-Meg3-p53-p66Shc pathway[J]. *Gene*, 2017, 596: 1-8.
- [10] LIU AJ, LIU MH, LI YX, CHEN XY, ZHANG LM, TIAN SJ. Differential expression and prediction of function of lncRNAs in the ovaries of low and high fecundity Hanper sheep[J]. *Reproduction in Domestic Animals*, 2021, 56(4): 604-620.
- [11] SPIZZO R, ALMEIDA MI, COLOMBATTI A, CALIN GA. Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research?[J]. *Oncogene*, 2012, 31(43): 4577-4587.
- [12] ZHANG XZ, LIANG HY, KOURKOU MELIS N, WU ZD, LI GY, SHANG XF. Comprehensive analysis of lncRNA and miRNA expression profiles and ceRNA network construction in osteoporosis[J]. *Calcified Tissue International*, 2020, 106(4): 343-354.
- [13] SUN L, ZHANG PJ, LU WF. lncRNA MALAT1 regulates mouse granulosa cell apoptosis and 17 β -estradiol synthesis via regulating miR-205/CREB1 axis[J]. *BioMed Research International*, 2021, 2021: 6671814.
- [14] 孟朝轶, 王运路, 徐业芬, 牛家强, 索朗斯珠, 郭敏, 席广银. 牦牛 lncRNA ENSBGRT0000000387.1 慢病毒载体构建及其对卵泡 GCs 凋亡的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(3): 1058-1070.
- MENG CY, WANG YL, XU YF, NIU JQ, SUO L, GUO M, XI GY. Construction of yak lncRNA ENSBGRT0000000387.1 lentivirus vector and its effect on apoptosis of yak follicular granulosa cells[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(3): 1058-1070 (in Chinese).
- [15] 王运路, 孟朝轶, 姚一龙, 郭敏, 牛家强, 索朗斯珠, 徐业芬. 牦牛“海绵吸附” bta-miR-146a 的 lncRNA 筛选及靶向验证[J]. *中国畜牧兽医*, 2023, 50(3): 859-869.
- WANG YL, MENG CY, YAO YL, GUO M, NIU JQ, SUO L, XU YF. Screening and targeting verification of lncRNA of “sponge adsorption” bta-miR-146a in yak[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 50(3): 859-869 (in Chinese).
- [16] 成俊丽. miRNAs 对牛下丘脑 CART 转录后表达调控的研究[D]. 太谷: 山西农业大学硕士学位论文, 2022.
- CHEN JL. The regulation of miRNAs on post transcriptional expression of CART in bovine hypothalamus[D]. Taigu: Master's Thesis of Shanxi Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [17] YANIK T, DOMINGUEZ G, KU HAR MJ, del GIUDICE EM, LOH YP. The Leu34Phe ProCART mutation leads to cocaine- and amphetamine-regulated

- transcript (CART) deficiency: a possible cause for obesity in humans[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(1): 39-43.
- [18] STANEK LM. Cocaine- and amphetamine related transcript (CART) and anxiety[J]. *Peptides*, 2006, 27(8): 2005-2011.
- [19] JIA J, CHEN XM, ZHU WJ, LUO Y, HUA ZC, XU Y. CART protects brain from damage through ERK activation in ischemic stroke[J]. *Neuropeptides*, 2008, 42(5/6): 653-661.
- [20] UPADHYA MA, NAKHATE KT, KOKARE DM, SINGH U, SINGRU PS, SUBHEDAR NK. CART peptide in the nucleus accumbens shell acts downstream to dopamine and mediates the reward and reinforcement actions of morphine[J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(4): 1823-1833.
- [21] KOBAYASHI Y, JIMENEZ-KRASSEL F, LI QL, YAO JB, HUANG RP, IRELAND JJ, COUSSENS PM, SMITH GW. Evidence that cocaine- and amphetamine-regulated transcript is a novel intraovarian regulator of follicular atresia[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(11): 5373-5383.
- [22] LV LH, JIMENEZ-KRASSEL F, SEN A, BETTEGOWDA A, MONDAL M, FOLGER JK, LEE KB, IRELAND JJ, SMITH GW. Evidence supporting a role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CARTPT) in control of granulosa cell estradiol production associated with dominant follicle selection in cattle[J]. *Biology of Reproduction*, 2009, 81(3): 580-586.
- [23] SALMENA L, POLISENO L, TAY Y, KATS L, PANDOLFI PP. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?[J]. *Cell*, 2011, 146(3): 353-358.
- [24] ST LAURENT G, WAHLESTEDT C, KAPRANOV P. The landscape of long noncoding RNA classification[J]. *Trends in Genetics: TIG*, 2015, 31(5): 239-251.
- [25] WU XX, SUI ZL, ZHANG HD, WANG Y, YU ZT. Integrated analysis of lncRNA-mediated ceRNA network in lung adenocarcinoma[J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10: 554759.
- [26] XU Y, HU JF, ZHANG YL, LIU MY, ZHANG H, XIA CH, XIONG YQ. LncRNA HOTAIR modulates the expression of OATP1B1 in HepG2 cells by sponging miR-206/miR-613[J]. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 2020, 50(12): 1494-1500.
- [27] 胡凯. LncRNA SNHG3 通过 UPF1/SMAD 轴促进乳腺癌进展[D]. 重庆: 重庆医科大学硕士学位论文, 2022.
- HU K. LncRNA SNHG3 promotes breast cancer progression through UPF1/SMAD axis[D]. *Chongqing: Master's Thesis of Chongqing Medical University*, 2022 (in Chinese).
- [28] 袁春蓉, 刘勇宁. 长链非编码 RNA SNHG3 通过靶向调节 miR-186-5p 调控 WNT5A 对黑色素瘤增殖和侵袭的影响[J]. *肿瘤药理学*, 2020, 10(3): 304-312.
- YUAN CR, LIU YN. Long noncoding RNA SNHG3 regulates proliferation and invasion of melanoma by WNT5A through targeted regulation of miR-186-5p[J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2020, 10(3): 304-312 (in Chinese).
- [29] LIANG MQ, WANG FF, LI Q, LEI X, CHEN Y, HU N. LncRNA SNHG3 promotes sevoflurane-induced neuronal injury by activating NLRP3 via NEK7[J]. *Neurochemical Research*, 2023, 48(9): 2754-2766.
- [30] 丁毅飞. 慢病毒介导的 PNX 沉默对雌性小鼠生殖发育的影响[D]. 重庆: 重庆大学硕士学位论文, 2020.
- DING YF. Effect of lentivirus-mediated PNX silencing on reproductive development of female mice[D]. *Chongqing: Master's Thesis of Chongqing University*, 2020 (in Chinese).
- [31] DONG YF, ZHANG NN, ZHAO SM, CHEN XY, LI F, TAO X. MiR-221-3p and miR-15b-5p promote cell proliferation and invasion by targeting Axin2 in liver cancer[J]. *Oncology Letters*, 2019, 18(6): 6491-6500.
- [32] YUE BL, LI H, LIU M, WU JY, LI MX, LEI CZ, HUANG BZ, CHEN H. Characterization of lncRNA-miRNA-mRNA network to reveal potential functional ceRNAs in bovine skeletal muscle[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 91-101.

(本文责编 郝丽芳)