

УДК 577.217.5

bta-miRNA-1271 БЫКА СПОСОБСТВУЕТ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ ПРЕАДИПОЦИТОВ, НАПРАВЛЕННО ВОЗДЕЙСТВУЯ НА ФАКТОР АКТИВАЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ 3*

© 2020 Х.Ю. Сюй^{1#}, Ж. Шао^{1#}, Б.З. Инь¹, Л.М. Чжан¹,
Ж.К. Фан², Ж.С. Чжан¹, Г.Ж. Ся^{1**}

¹ Agriculture College, Yanbian University, 133002 Yanji, Jilin, China; E-mail: ybuac@ybu.edu.cn

² Hirosaki University, Faculty of Agriculture and Life Science, 036-8560 Hirosaki, Japan

Поступила в редакцию 04.03.2020

После доработки 21.05.2020

Принята к публикации 21.05.2020

Желтый крупный рогатый скот Яньбянь является одной из пяти наиболее многочисленных пород крупного рогатого скота в Китае. Ранее нами были обнаружены различия в степени экспрессии микроRNA bta-miR-1271 в длинных мышцах спины быков и бычков желтого крупного рогатого скота Яньбянь. Однако при этом не был получен ответ на вопрос о влиянии этой микроRNA (miRNA) на процесс образования бычьего жира. Для определения роли bta-miR-1271 в процессе адипогенеза в настоящей работе нами были использованы методы предсказания генов-мишеней, репортерного теста двойной люциферазы и повышенной в результате трансфекции экспрессии и ингибирования bta-miR-1271 в клеточных культурах преадипоцитов желтого крупного рогатого скота Яньбянь. Нами было показано, что bta-miR-1271 целенаправленно воздействует на 3'-нетранслируемый участок фактора активации транскрипции 3 (ATF3), вызывая снижения уровня экспрессии гена *ATF3*. Повышенная экспрессия bta-miR-1271 усиливалась в результате использования имитаторов miRNA, вызывающих накопление триглицеридов. Кроме того, используя RT-qPCR и вестерн-блоттинг, мы показали, что повышенная экспрессия bta-miR-1271 приводит к значительному увеличению экспрессии гена адипогенного пероксисомального пролифератор-активированного рецептора γ (PPAR γ) и ССААТ энхансер-связывающего белка α (C/EBP α) как на уровне белка, так и на уровне mRNA. Ингибирование экспрессии bta-miR-1271 приводило к обратному эффекту. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что bta-miR-1271 регулирует дифференцировку преадипоцитов желтого рогатого скота Яньбянь путем ингибирования экспрессии гена *ATF3*, что указывает на важную роль miRNA-опосредованной регуляции процесса адипогенеза. Кроме того, miR-1271 и ее ген(-ы)-мишени могут стать объектами для развития нового направления исследований для изучения биологических агентов, влияющих на внутримышечное отложение жира у крупного рогатого скота.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ATF3, bta-miR-1271, дифференцировка преадипоцитов, желтый крупный рогатый скот Яньбянь.

DOI: 10.31857/S0320972520070039

ВВЕДЕНИЕ

Желтый крупный рогатый скот Яньбянь входит в пятерку наиболее многочисленных пород крупного рогатого скота в Китае. Это крупные,

легко приспособляемые, холодостойкие, крепкие животные, которые обладают стабильными генетическими характеристиками и производят говядину с уникальным вкусом. Из-за религиозных убеждений и привычек потребителей, а также в связи с производством говядины, отличающейся высоким содержанием белка и ненасыщенных жирных кислот, этот сорт мяса набирает популярность среди потребителей [1].

Внутримышечное содержание жира оказывает большое влияние на качество и вкус мяса. В свою очередь, на него влияют многие факторы, включая породу, пол животного и состав используемого корма [2, 3]. Отложение жира в мышцах обусловлено повышением количества и объема адипоцитов. Адипоциты берут начало от мезенхимальных стволовых клеток (MSC – mesenchymal stem cells), которые сначала диффе-

Принятые сокращения: miRNA – микроRNA; UTR – нетранслируемый участок; PPAR γ – пероксисомальный рецептор активации пролиферации; C/EBP α – ССААТ энхансер-связывающего белка α ; ATF3 – фактор активации транскрипции 3; NC – отрицательный контроль; FBS – фетальная бычья сыворотка; MUT – мутантный тип; WT – дикий тип.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», BM20-055, 15.06.2020.

** Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

ренцируются в адипобласты, затем в преадипоциты и, наконец, в зрелые адипоциты [4, 5]. Процесс дифференцировки преадипоцитов включает четыре этапа: пролиферация, митотическое клонирование, ранняя дифференцировка и терминальная дифференцировка [6]. Рост преадипоцитов в конечном итоге приводит к высокой плотности клеточек, которая вызывает эффект контактного ингибирования клеточного роста. В результате клетки постепенно прекращают пролиферировать и начинают подвергаться дифференцировке [7]. Процесс дифференцировки клеток строго регулируется различными факторами транскрипции. Так, например С/ЕВР β индуцирует экспрессию PPAR γ , а PPAR γ активирует С/ЕВР α , который, в свою очередь, способствует дифференцировке преадипоцитов. В конечном итоге преадипоциты дифференцируются с образованием зрелых адипоцитов, в которых содержатся крупные липидные капли [8].

МикроRNA (miRNA), впервые обнаруженные Lee в клетках *Caenorhabditis elegans* в 1993 г., широко экспрессируются в различных эукариотических клетках [9]. MiRNA транскрибируются из геномной DNA, но не подвергаются процессу трансляции с образованием молекул белка (т.е., они являются некодирующими RNA). Вместо этого они связываются с целевыми mRNA и регулируют экспрессию генов-мишеней, ингибируя трансляцию транскрибируемых mRNA или вызывая их деградацию [10]. MiRNA проявляют свои биологические функции на уровне mRNA и участвуют в регуляции различных типов физиологической активности, включая обмен жиров и дифференцировку клеток [11]. Например, было показано, что miR-16-5p [12], miR-26b [13] и miR-181a [14] способствуют развитию ангиогенеза, в то время как miR-124-3p [15], miR-375 [16] и miR-127 [17] этот процесс ингибируют. Ранее мы проанализировали экспрессию miRNA в широчайшей мышце спины (latissimus dorsi muscle) быков и бычков желтого крупного рогатого скота Яньбянь с использованием набора Affymetrix GeneChip miRNA 3.0 и обнаружили в этой мышце дифференциальную экспрессию bta-miR-1271 [18]. Мы также использовали методы секвенирования следующего поколения (miRNA-seq и RNA-seq) для анализа длинной мышцы спины (longissimus dorsi muscle) бычков желтого крупного рогатого скота Яньбянь в возрасте 30 месяцев, отличающихся высоким и низким содержанием жира (по три особи из каждой группы). Было показано, что уровни экспрессии bta-miR-1271 и гена *ATF3* в группах с высоким и низким содержанием в мясе жира отличаются друг от друга (рис. S1

в Приложении). С помощью программы Targetscan ген *ATF3* предсказан, как целевой ген bta-miR-1271. Нами было высказано предположение, что bta-miR-1271 и *ATF3* могут повлиять на внутримышечные отложения жира желтого крупного рогатого скота Яньбянь, хотя, по нашим сведениям, до сих пор не было сообщений, подтверждающих наличия связи между bta-miR-1271 и каким-либо из ее генов-мишеней и процессом адипогенеза.

В настоящем исследовании мы изучали адипогенез в преадипоцитах новорожденной особи желтого крупного рогатого скота Яньбянь. Бычьи преадипоциты дают значительные преимущества для изучения процесса адипогенеза у представителей желтого крупного рогатого скота Яньбянь по сравнению с более широко используемой клеточной линией мышей 3T3-L1, поскольку уникальные видоспецифичные пути синтеза и метаболизма жира в бычьих клетках не могут быть точно воспроизведены в мышинных клетках [19]. Целью настоящего исследования явилось выяснение роли bta-miR-1271 в дифференцировке преадипоцитов и создание основы для дальнейших исследований miRNA-опосредованной физиологической регуляции в жировой ткани крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная культура и дифференцировка преадипоцитов. Преадипоциты, выделенные из представителей желтого крупного рогатого скота Яньбянь были получены от отделения животноводства Цзилинской Академии сельскохозяйственных наук, Гунчжулин (Jilin Gongzhuling Animal Husbandry Branch), клеточная линия HepG2 гепатоцитов человека была получена от фармацевтического факультета Яньбяньского университета (Yanbian University School of Pharmacy). Клетки культивировали при 37 °C в инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ в модифицированной среде Дульбекко (DMEM, «Gibco», Китай), дополненной 10%-ой фетальной бычьей сывороткой (FBS) («BI», Израиль). Когда преадипоциты выросли до 70–80% слияния, их рассеивали в 6-луночные культуральные планшеты. Когда слияние клеток достигало 100%, культуральную среду заменяли DMEM, содержащим 10 мкг/мл инсулина, 0,5 мМ 3-изобутил-1-метилксантина, 1,0 мкМ дексаметазона («Sigma-Aldrich», Китай) и 10% FBS. Через два дня среда была заменена DMEM, содержащим 10 мкг/мл инсулина и 10% FBS, а затем через два дня снова заменена DMEM, содержащим 10% FBS. Клетки выращивали в культуре в течение 9 дней.

Биоинформатика. Последовательность зрелой bta-miR-1271 была получена из базы данных miRBase (<http://www.mirbase.org/>). Гены, которые могут быть мишенями для miRNA, были предсказаны с помощью программы TargetScan (http://www.targetscan.org/vert_71/).

Трансфицирование преадипоцитов быка. Преадипоциты быка рассеивали в 6-луночные культуральные планшеты при плотности 1×10^6 клеток в лунку в 2 мл среды DMEM, содержащей 10% FBS. Для трансфекции 5 мкл Lipofectamine™ 2000 («Invitrogen», Китай) и 10 мкл 20 мкМ раствора имитатора bta-miR-1271 или эквивалентное количество имитатора отрицательного контроля (NC) (ингибитора miRNA или ингибитора отрицательного контроля) добавляли в 100 мкл среды Opti-MEM («Gibco», США). Эти реагенты смешивали друг с другом и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре, и затем их добавляли к клеткам, культивируемым в среде DMEM, содержащей 10% FBS. Все препараты miRNA были приобретены в компании «Jiangsu GenePharma», Китай. Последовательности miRNA перечислены в табл. S1 в Приложении.

Репортерный тест двойной люциферазы. На основании последовательности 3'-нетранслируемого участка (3'UTR) гена *ATF3* крупного рогатого скота, которая была получена от Национального центра биотехнологической информации (NCBI, National Center for Biotechnology Information), были сконструированы праймеры, которые использовали для амплификации фрагмента гена, полностью соответствующего последовательности затравки bta-miR-1271 (от 2-го до 8-го нуклеотида на 5'-конце miRNA). Последовательности, кодирующие сайты эндонуклеазы рестрикции SacI и XbaI, были добавлены к 5'-концам прямого и обратного праймеров соответственно. Полученный продукт ПЦР лигировали в вектор pmirGLO («Promega», Китай). Мутации в предполагаемый сайт связывания (3 нуклеотида) вводили с помощью мутационных праймеров; мутантные последовательности амплифицировали методом ПЦР и клонировали в вектор pmirGLO. Последовательности праймеров приведены в табл. S2 в Приложении.

Клетки HerG2 рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты, и их трансфицировали совместно с 0,1 мкг репортерного вектора двойной люциферазы и 0,5 мкл 20 мкМ имитатора bta-miR-1271 или NC с использованием реагента Lipofectamine™ 3000 («Invitrogen», Китай). Через 48 ч после проведения трансфекции активность люциферазы определяли с использованием набора Dual-Glo™ «Luciferase Assay System», («Promega», Китай) и рассчитывали ак-

тивность с использованием люминометра «GloMax 20/20» («Promega», Китай). Все эксперименты выполнялись по три раза и независимо друг от друга.

Окрашивание клеток с помощью красителя «Oil Red O» и анализ триглицеридов. Клетки дважды промывали фосфатным солевым буфером (PBS) и фиксировали *in situ* в 4%-м растворе параформальдегида при комнатной температуре в течение 30 мин. Фиксированные клетки дважды промывали с помощью PBS. Концентрированный раствор красителя «Oil Red O» («Sigma-Aldrich», Китай) (0,5 г красителя растворяли в 100 мл изопропанола и затем фильтровали) смешивали со стерильной водой в соотношении 6/4. Полученный раствор добавляли в ячейки 6-луночного культурального планшета, где проводили окрашивание клеток при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем раствор красителя «Oil Red O» удаляли, и клетки три раза промывали водой и наблюдали под микроскопом. Для определения содержания триглицеридов в адипоцитах использовали набор «Triglyceride Assay Kit» («NanJing Jiancheng Bioengineering Institute», Китай).

Экстракция RNA и количественная ПЦР-в реальном времени (RT-qPCR). RNA была извлечена из клеток с помощью набора «Easyprep® Super Total RNA Extraction Kit» («Promega», Китай). MiRNA были извлечены с помощью набора «Mircute miRNA Isolation Kit» («Tiangen», Китай). RT-qPCR проводили с использованием набора «SYBR Premix Ex Taq II kit» («Takara», Китай). Для определения количества miRNA осуществляли обратную транскрипцию с использованием набора «miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA Kit» («Tiangen», Китай), и RT-qPCR выполняли с помощью наборов «miRcute Plus miRNA qPCR Kit» (SYBR Green) («Tiangen», Китай) и «SYBR Premix Ex Taq II kit» («Takara», Китай). Реакции RT-qPCR проводили на приборе «PCRmax Eco 48 real-time PCR machine» («PCRmax», Великобритания). Все эксперименты были выполнены три раза независимо друг от друга. Для расчета относительного уровня экспрессии соответствующей mRNA или miRNA использовали формулу $2^{-\Delta\Delta Ct}$. В качестве домашнего гена (housekeeping gene) и нормализации уровня экспрессии других белок-кодирующих генов использовали ген β -актина, в то время как для нормализации экспрессии miRNA использовали miРНК let-7a. Последовательности праймеров, используемых для проведения ПЦР (qPCR), представлены в табл. S3 в Приложении.

Экстракция белка и вестерн-блоттинг. Клетки лизировали путем инкубации с буфером лизиса

RIPA («Beoyotime», Китай), содержащим 1 мМ PMSF («Beoyotime», Китай) на льду. Общую концентрацию белка в клеточных лизатах измеряли с помощью усиленного набора «BCA Protein Assay Kit» («Beoyotime», Китай) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы белков подвергали электрофорезу в 12%-м SDS-ПААГ (20 мкг белка на полосу) и переносили на мембрану из поливинилидендифторида (PVDF) («Millipore», США) в соответствии с инструкциями производителя («Bio-Rad», США). Мембрану PVDF промывали TBS, содержащим 0,1% Tween 20 (TBST), и блокировали 5%-м овалбумином («Solarbio», Китай) в TBST в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем мембрану инкубировали с первичными антителами в блокирующем буфере в течение ночи при 4 °С, пять раз промывали TBST и инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, при 4 °С в течение 2 ч. После 5× промывания TBST получали иммуноблоты с использованием раствора хемилюминесценции и анализировали с помощью системы визуализации «Alliance MINI HD9 AUTO Western Blot Imaging System» («UVITEC», США). Интенсивность полос целевого белка была нормализована к интенсивности полосы β-актина и вычислена с помощью программы «ImageJ». Кроличьи анти-ATF3 (bs-0519R), кроличьи анти-СЕРР α (bs-1630R) и кроличьи анти-PPAR γ (bs-0530R) антитела были получены от компании «Bioss», Китай; мышиные анти-АС-актин (BS6007M) антитела были получены от компании «Bioworld Technology», США. Все эксперименты проводились в трех независимых повторах.

Статистическая обработка полученных результатов. Все полученные результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD). Данные были обработаны с использованием критерия Стьюдента (количественная ПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинг, тест определения триглицеридов) или с помощью метода ANOVA (репортерный тест двойной люциферазы). Различия между группами рассматривались как статистически достоверные при условии, что значение $p < 0,05$. Статистическая обработка данных была выполнена с помощью программного пакета «SPSS 20 software».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

miR-1271 является высоко консервативной miРНК клеток млекопитающих. В клетках быка ген (*bta*) miR-1271 локализован на хромосоме 7,

и он кодирует только одну молекулу зрелой miRNA — *bta*-miR-1271, в то время как ген (*hsa*) miR-1271 человека локализован на хромосоме 5 и генерирует две зрелых miRNA (*hsa*-miR-1271-5p и *hsa*-miR-1271-3p). Интересно, что *hsa*-miR-1271-5p и *bta*-miR-1271 являются гомологичными miRNA. Последовательность зрелой miRNA является высоко консервативной для клеток млекопитающих, включая горилл, других обезьян, свиней, козлов и т.д. Хотя существуют некоторые небольшие различия в последовательностях miRNA, исходные последовательности оказались одними и теми же (рис. 1, *a*). Целевой сайт на молекуле *bta*-miR-1271, который был предсказан в последовательности mRNA *ATF3*, показан на рис. 1, *b*. Далее мы сравнили гены-мишени, которые были предсказаны с помощью программы TargetScan, с другими в различной степени экспрессируемыми генами, выявленными в результате ранее проведенного анализа с использованием программы «RNAseq» (рис. S1 в Приложении). Было показано, что ген *ATF3* является кандидатным геном-мишенью *bta*-miR-1271.

***bta*-miR-1271 способствует дифференцировке преадипоцитов у особей желтого крупного рогатого скота Яньбянь.** Чтобы выяснить роль *bta*-miR-1271 в процессе дифференцировки преадипоцитов, меченые FAM имитаторы *bta*-miR-1271 или miRNA, служащие в качестве NC, были трансфицированы в преадипоциты особей желтого крупного рогатого скота Яньбянь. Эффективность трансфекции была высокой, что определяли измерением флуоресценции меченых FAM нуклеиновых кислот через 6 ч после трансфекции (рис 2, *a*). Эффективность трансфекции составила более 60% и существенно не отличалась между имитаторами *bta*-miR-1271 и NC (рис. 2, *b*). Через 48 ч после проведения трансфекции уровень miR-1271 был количественно определен методом RT-qPCR. Оказалось, что экспрессия miR-1271 была значительно повышена в случае проведения трансфекции имитатором miRNA в сравнении с клетками, которые были трансфицированы имитатором NC (рис. 2, *c*). Через 0, 2, 4, 6 и 8 дней культивирования клеток из них выделяли mRNA, чтобы охватить все стадии процесса дифференцировки преадипоцитов, и затем с помощью RT-qPCR измеряли уровни экспрессии генов-маркеров процесса адипогенеза — генов *PPAR γ* и *С/ЕВР α* . Уровни экспрессии mRNA *PPAR γ* и *С/ЕВР α* достигали пиковых значений на 6-ой день индуцированной дифференцировки преадипоцитов (рис. 2, *d*). Поэтому содержание mRNA *PPAR γ* и *С/ЕВР α* и количество соответствующих белков в клетках из разных групп, различающихся по

способу их обработки, оценивали методом RT-qPCR и вестерн-блоттинга соответственно, на 6-й день индуцированной дифференцировки. Клетки, трансфицированные bta-miR-1271, демонстрировали повышенное накопление триглицеридов в липидных каплях на 9-й день дифференцировки, что было подтверждено окрашиванием красителем «Oil Red O» (рис. 2, e и f) и количественным определением триглицеридов (рис. 2, g). По сравнению с имитатором отрицательного контроля, повышенная экспрессия bta-miR-1271, усиленная трансфекцией имитатора этой miRNA, приводила к существенному повышению экспрессии PPAR γ и С/ЕВР α на уровне mRNA и белка. Уровни mRNA и белка PPAR γ были соответственно в 1,71 и 1,23 раза выше, а уровни mRNA и белка С/ЕВР α – соответственно в 1,72 и 1,89 раза выше, чем в клетках, трансформированных с помощью NC-имитаторов ($p < 0,05$) (рис. 2, h и i). Использование ингибитора bta-miR-1271 приводило к противоположному результату. В этом случае уровни mRNA и белка PPAR γ были понижены. Они были равны 0,83 и 0,48 от соответствующих значений в группе ингибитора NC. В случае С/ЕВР α уровни mRNA и белка по сравнению с группой NC были равны 0,66 и 0,54 от соответствующих значений для контрольной группы ($p < 0,05$) (рис. 2, j и k). В целом, представленные результаты позволяют сделать предположение, что bta-miR-1271 способствует развитию процесса адипогенеза в культуре преадипоцитов желтого крупного рогатого скота Яньбянь.

bta-miR-1271 взаимодействует непосредственно с mRNA 3'UTR ATF3. Чтобы выяснить, действительно ли bta-miR-1271 непосредственно взаимодействует с mRNA ATF3, нами был создан вектор дикого типа pmirGLO-wild type (WT) и мутантный вектор (pmirGLO-mutant type (MUT) (рис. 3, a и b). Клетки HepG2 были подвергнуты совместной трансфекции имитатором bta-miR-1271 или имитатором NC, а также или с вектором pmirGLO дикого типа (pmirGLO-WT) или с вектором pmirGLO-MUT. Через 24 ч после трансфекции активность люциферазы в клетках, трансфицированных имитаторами bta-miR-1271, была ниже, чем в клетках, трансфицированных имитаторами NC (рис. 3, c).

Экспрессия гена ATF3 во время дифференцировки преадипоцитов понижается и достигает минимальных значений на 4-й день культивирования клеток (рис. 3, d). Чтобы проверить предположение о том, что bta-miR-1271 может способствовать процессу адипогенеза через подавление экспрессии гена ATF3, нами была осуществлена кратковременная трансфекция пре-

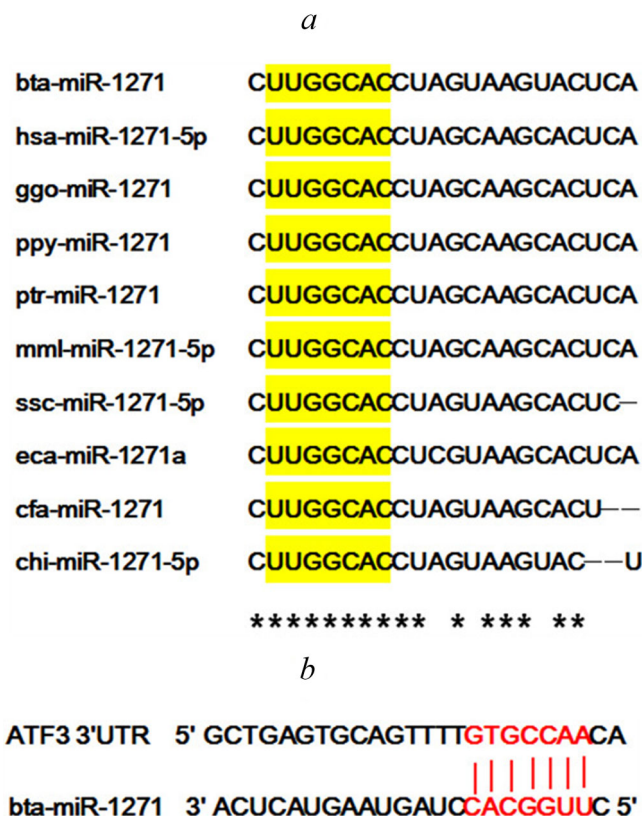


Рис. 1. Гомологичные последовательности miR-1271 и предсказание гена-мишени для этой miRNA с помощью биоинформатических подходов. a – Последовательность miR-1271 клеток млекопитающих с исходными участками последовательности, выделенными желтым цветом. Звездочками отмечены положения строго консервативных остатков. b – Сайт-мишень на молекуле bta-miR-1271 внутри 3'UTR транскрипта mRNA гена ATF3 (выделен красным цветом). (С цветными вариантами рис. 1–3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm>)

адипоцитов быка имитатором bta-miR-1271 или ее ингибитором. Было показано, что на средних стадиях процесса дифференцировки преадипоцитов (4 дня после индукции процесса дифференцировки клеток) уровни mRNA и белка ATF3 были значительно понижены вследствие усиленной имитаторами повышенной экспрессии bta-miR-1271 (рис. 3, e и f). Подавление экспрессии bta-miR-1271 с помощью ингибитора bta-miR-1271, напротив, приводило к повышенной экспрессии ATF3 (рис. 3, g и h). В целом полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ген ATF3 является непосредственной мишенью bta-miR-1271.

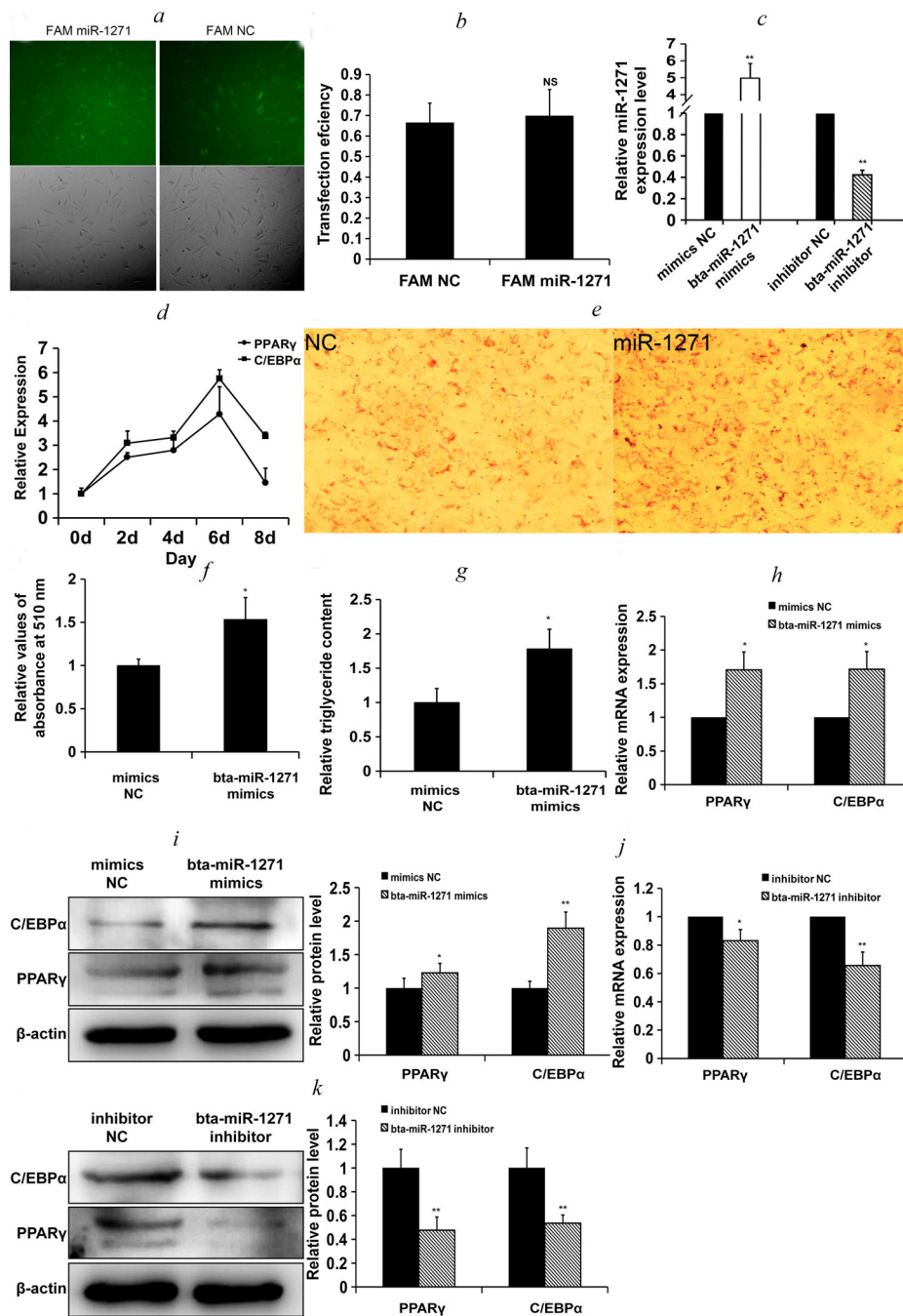


Рис. 2. bta-miR-1271 способствует дифференцировке преадипоцитов желтого крупного рогатого скота Яньбянь. *a* – Меченый FAM имитатор NC и имитатор miR-1271 были кратковременно трансфицированы в преадипоциты. Эффективность трансфекции определяли через 6 ч после проведения трансфекции с помощью яркой световой визуализации и флуоресцентной микроскопии. Зелёным цветом представлены имитатор NC или имитатор miR-1271, трансфицированные в клетку (увеличение 100 \times). *b* – эффективность трансфекции FAM-меченой miRNA ($n = 3$; NS – незначительные различия). *c* – Уровни bta-miR-1271, выявленные методом RT-qPCR через 48 ч после проведения трансфекции ($n = 3$; ** $p < 0,01$). *d* – Изменения уровня mRNA PPAR γ и C/EBP α во время дифференцировки преадипоцитов (n = 3; * $p < 0,05$). *e* – Образование липидных капель в клетках, трансфицированных имитаторами NC и bta-miR-1271 через 9 дней после индукции процесса дифференцировки преадипоцитов, определенное с помощью окрашивания клеток красителем «Oil Red O» (увеличение 200 \times). *f* – Содержание липидов определяли после экстракции изопропанолом красителя «Oil Red O» и последующего измерения поглощения при 510 нм ($n = 3$). *g* – Содержание триглицеридов в клетках, трансфицированных NC или имитатором ($n = 3$). *h* и *i* – Влияние повышенной экспрессии bta-miR-1271, индуцированной в результате трансфекции имитатором, на уровни mRNA (*h*) и белка PPAR γ (*i*) C/EBP α , рассчитанные по результатам RT-qPCR и вестерн-блоттинга соответственно ($n = 3$). *j* и *k* – Влияние нокдауна bta-miR-1271 на экспрессию PPAR γ и C/EBP α после проведения трансфекции ингибитором этой miRNA, определенное на уровне mRNA (*j*) и белка (*k*) в сравнении с клетками, трансфицированными ингибитором NC ($n = 3$); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

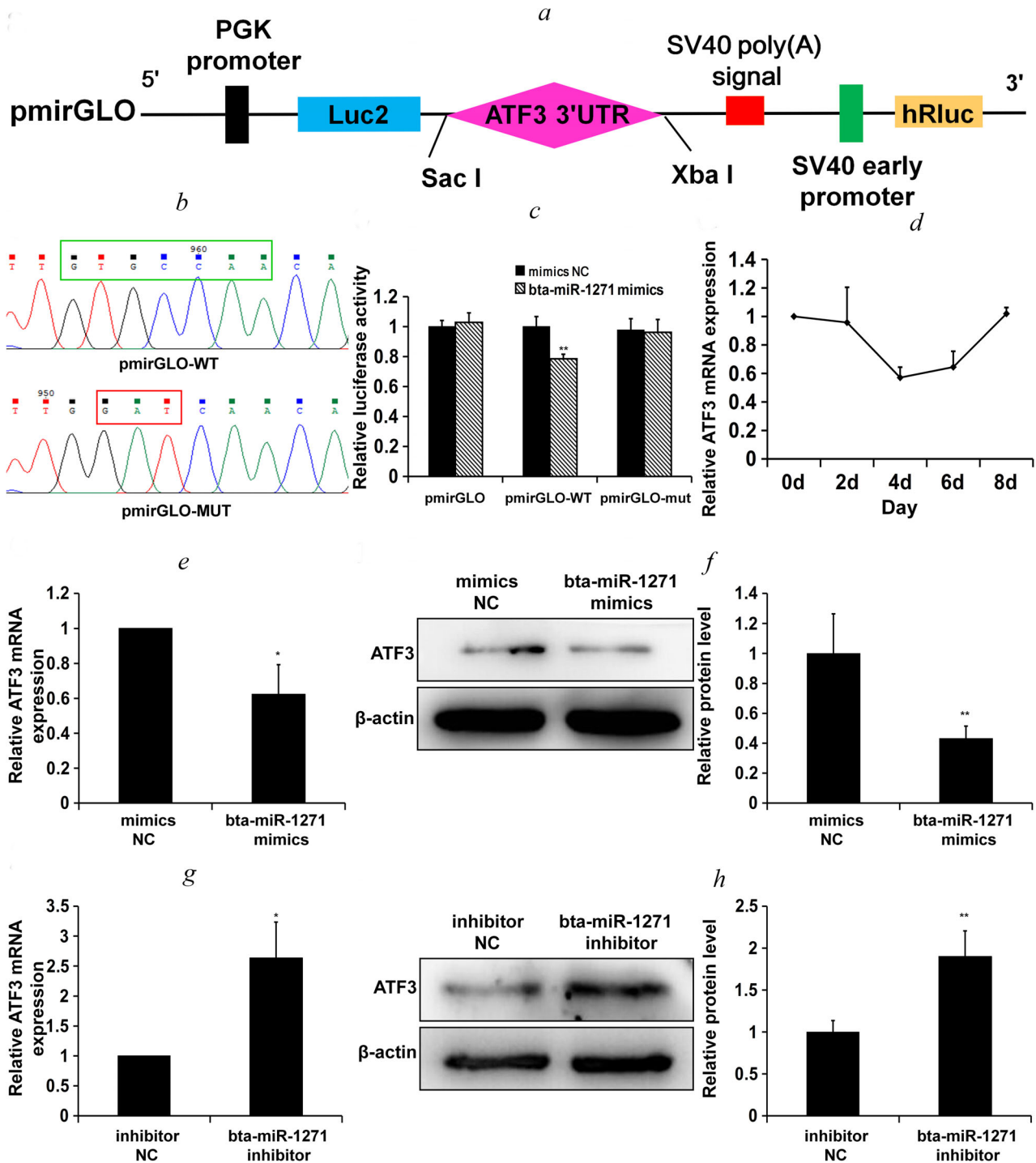


Рис. 3. Ген *ATF3* – мишень bta-miR-1271. *a* – Схематическое представление стратегии клонирования целевой последовательности гена *ATF3*, нижележащей по отношению к гену люциферазы светлячков в векторе pmirGLO. *b* – Участок связывания bta-miR-1271 (он выделен зелёным цветом) в 3'UTR участке гена *ATF3*, который был клонирован в вектор pmirGLO для создания вектора дикого типа, pmirGLO-WT. Три нуклеотида в участке связывания bta-miR-1271 (они выделены красным цветом) были заменены, чтобы создать мутантный вектор pmirGLO-MUT. *c* – Активность люциферазы в клетках линии HepG2, трансфицированных векторами pmirGLO с репортером двойной люциферазы. Относительную активность люциферазы рассчитывали на основе соотношения люминесценции светлячков (Firefly) с люминесценцией Renilla ($n = 3$; * $p < 0,05$). *d* – Экспрессия гена *ATF3* во время дифференцировки преадипоцитов из особой желтого крупного рогатого скота Яньбянь ($n = 3$). *e* и *f* – Влияние повышенной экспрессии bta-miR-1271 (усиленной имитатором bta-miR-1271) или ее нокдауна (с помощью ингибитора bta-miR-1271) в адипоцитах быка на уровень mRNA (*e*) ($n = 4$) и белка (*f*) ($n = 3$). *g* и *h* – Влияние нокдауна bta-miR-1271 (с помощью ингибитора bta-miR-1271) в адипоцитах крупного рогатого скота на количество мРНК *ATF3* (*g*) ($n = 4$) и белка (*h*) ($n = 3$); * $p \approx 0,05$; ** $p \approx 0,01$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Желтый крупный рогатый скот Яньбянь является высоко производительным источником мяса с уникальными вкусовыми качествами. Он занимает передовые позиции на рынке говядины. Это всемирно известная порода мясного скота, несмотря на очевидные недостатки, такие как низкий уровень убоя и недостаточный уровень производства говядины высшего качества. Понимание молекулярных механизмов, которые регулируют синтез жиров у особей желтого крупного рогатого скота Яньбянь, стало важной частью программы по его молекулярному разведению. В последние годы широкое внимание привлекло культивирование преадипоцитов *in vitro* в связи с тем, что появилась возможность непосредственно контролировать процесс адипогенеза в ответ на воздействие различных регуляторных факторов и тем самым получить представление о механизмах образования жировой ткани в клетках преадипоцитов *in vivo* [20]. Количество жировых клеток, их объем и накопление в них липидных капель оказывают прямое влияние на уровень отложения жира в тканях. В свою очередь, тип и содержание жировой ткани быка непосредственно сказывается на нежности и аромате мяса [21]. MiRNA являются важнейшими регуляторами процесса адипогенеза и метаболизма липидов, а некоторые из них, такие как miR-214-3p, miR-20a-5p и miR-144-3p, способствуют адипогенезу [22–24], в то время как другие miRNA отрицательно регулируют адипогенез (miR-18b-3p и miR-27) [25, 26].

В то время как во многих работах было показано, что miR-1271 регулирует некоторые ключевые биологические функции, включая пролиферацию опухолевых клеток [27, 28] и нейромодуляцию [29], до сих пор не было работ, предполагающих участие miR-1271 в процессе адипогенеза. В наших предыдущих работах с помощью анализа miRNA-seq и RNA-seq мы показали, что miR-1271 дифференцированно экспрессировался в длинных мышцах спины у особей желтого крупного рогатого скота Яньбянь, отличающихся высоким или низким содержанием жира. Среди генов-мишеней miR-1271, предсказанных методами биоинформатики, ген *ATF3* также был дифференцированно экспрессирован в этих двух группах крупного рогатого скота. Поэтому мы предположили, что miR-1271 регулирует липидный обмен, нацеливаясь на mRNA *ATF3*. В настоящей работе исследовали регулируют ли bta-miR-1271 адипогенез в культивируемых *in vitro* преадипоцитах желтого крупного рогатого скота Яньбянь. Установлено, что сверхэкспрессия bta-miR-1271, усиленная трансфекцией кле-

ток с имитацией bta-miR-1271, способствует дифференцировке адипоцитов и образованию липидных капель. Кроме того, во время дифференцировки преадипоцитов повышение экспрессии bta-miR-1271 приводило к повышению экспрессии адипогенных генов *PPAR γ* и *C/EBP α* . Для проведения сравнения уровня экспрессии miRNA в длинных мышцах спины у 30-месячных бычков желтого крупного рогатого скота Яньбянь с различным содержанием жира в мышцах нами был использован метод miRNA-seq. Было показано, что уровень экспрессии miR-1271 выше среднего уровня miRNA, экспрессируемых в различной степени. Это подтвердило, что уровень эндогенной экспрессии miR-1271 тоже выше среднего уровня. Поэтому, чтобы подавить эндогенную экспрессию bta-miR-1271, клетки были нами трансфицированы ингибитором bta-miR-1271. Полученные нами результаты свидетельствовали о том, что ингибирование синтеза эндогенной miR-1271 может привести к снижению уровня экспрессии *PPAR γ* и *C/EBP α* и повысить экспрессию *ATF3* в адипоцитах. В целом, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что bta-miR-1271 может способствовать метаболизму липидов у особей желтого крупного рогатого скота Яньбянь.

ATF3 представляет собой ген раннего ответа на стресс, который принадлежит к семейству факторов транскрипции ATF/CREB [30]. Было показано, что *ATF3* ингибирует адипогенную дифференцировку мышечных клеток линии 3T3-L1, снижая уровень экспрессии *PPAR γ* и *C/EBP α* [31, 32]. Кроме того, было показано, что *ATF3* ингибирует экспрессию гена адипонектина в клетках 3T3-L1 [33]. Далее было обнаружено, что *ATF3* участвует в активации Wnt/ β -катенин-зависимого сигнального пути [34], который принято рассматривать, как основной негативный регулятор процесса дифференцировки преадипоцитов. Считается, что передача сигнала через этот путь вызывает ингибирование процесса адипогенеза [35, 36]. Jang et al. [37] показали, что уровень экспрессии гена *ATF3* в белой жировой ткани у страдающих ожирением мышей, получавших обогащенную жирами пищу, был выше по сравнению с контрольными животными. Следовательно, экспрессия *ATF3* может быть связана с образованием липидных капель, что соответствовало увеличению уровня экспрессии *ATF3* после 5-го дня. Нами также была изучена относительная экспрессия *ATF3* во время дифференцировки преадипоцитов у особей желтого крупного рогатого скота Яньбянь. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что экспрессия *ATF3* во время на-

чальной стадии процесса дифференцировки преадипоцитов понижается и достигает минимального значения на 4-й день процесса дифференцировки. Затем уровень экспрессии постепенно возрастает до завершения процесса созревания адипоцитов. В целом ATF3 экспрессировался на низком уровне до образования липидных капель. После 4-х дней дифференцировки в адипоцитах образовывались липидные капли, и уровень экспрессии ATF3 также повышался. В настоящей работе с помощью метода репортерной двойной люциферазы мы показали, что bta-miR-1271 ингибирует экспрессию гена *ATF3*, связываясь с его 3'UTR участком. Далее нами были получены доказательства того, что повышенная экспрессия bta-miR-1271 вызывает ингибирование экспрессии mRNA и белка ATF3, в то время как нокдаун bta-miR-1271 способствует экспрессии гена *ATF3*, что подтверждает роль гена *ATF3* как гена-мишени bta-miR-1271.

Несмотря на то, что до сих пор не опубликованы исследования, посвященные роли miR-1271 в процессе дифференцировки преадипоцитов, есть сообщения, свидетельствующие о том, что miR-1271 может опосредованно ингибировать Wnt/ β -катенин-зависимый сигнальный путь и ингибировать TGF β -опосредованную передачу сигнала, целенаправленно воздействуя на другие гены [38, 39]. Мы предполагаем, что bta-miR-1271 способствует экспрессии PPAR γ и C/EBP α путем ингибирования экспрессии гена

ATF3, тем самым способствуя дифференцировке жировых клеток. Понимание молекулярных механизмов, регулирующих процесс адипогенеза у крупного рогатого скота, может дать необходимую информацию для разработки программ молекулярного разведения. Кроме того, miR-1271 и ее гены-мишени могут играть роль в патогенезе ожирения, открывая новое направление исследований для изучения биологических методов лечения заболеваний, связанных с ожирением.

Финансирование. Выполнение данной работы было поддержано Программой Развития Науки и Технологий провинции Цзилинь Китайской Народной Республики (грант № 20160204017NY).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в какой-либо сфере деятельности.

Соблюдение этических норм. При выполнении настоящей работы были соблюдены все требования международных, национальных и/или ведомственных руководств по работе с лабораторными животными.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 7, 2020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yun, J., Jin, H., Cao, Y., Zhang, L., Zhao, Y., Jin, X., and Yu, Y. (2018) RNA-Seq analysis reveals a positive role of HTR2A in adipogenesis in yan yellow cattle, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1760, doi: 10.3390/ijms19061760.
2. Han, J., Lee, J. E., Jin, J., Lim, J. S., Oh, N., Kim, K., Chang, S., Shibuya, M., Kim, H., and Koh, G. Y. (2011) The spatiotemporal development of adipose tissue, *Development*, **138**, 5027-5037, doi: 10.1242/dev.067686.
3. Tang, W., Zeve, D., Suh, J. M., Bosnakovski, D., Kyba, M., Hammer, R. E., Tallquist, M. D., and Graff, J. M. (2008) White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature, *Science*, **322**, 583-586, doi: 10.1126/science.1156232.
4. Dani, C., Smith, A., Dessolin, S., Leroy, P., Staccini, L., Villageois, P., Darimont, C., and Ailhaud, G. (1997) Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes *in vitro*, *J. Cell Sci.*, **110**, 1279-1285, doi: 10.1159/000244147.
5. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, **284**, 143-147, doi: 10.1126/science.284.5411.143.
6. Gregoire, F. M., Smas, C. M., and Sul, H. S. (1998) Understanding adipocyte differentiation, *Physiol. Rev.*, **78**, 783-809, doi: 10.1152/physrev.1998.78.3.783.
7. Otto, T. C., and Lane, M. D. (2005) Adipose development: from stem cell to adipocyte, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **40**, 229-242, doi: 10.1080/10409230591008189.
8. Gregoire, F. M. (2001) Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell, *Exp. Biol. Med.*, **226**, 997-1002, doi: 10.1177/153537020122601106.
9. Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, **116**, 281-297, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
10. Bartel, D. P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions, *Cell*, **136**, 215-233, doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
11. Vishnoi, A., and Rani, S. (2017) MiRNA biogenesis and regulation of diseases: an overview, *Methods Mol. Biol.*, **1509**, 1-10, doi: 10.1007/978-1-4939-6524-3_1.
12. Xu, J., Zhang, L., Shu, G., and Wang, B. (2019) MicroRNA-16-5p promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through regulating EPT1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **514**, 1251-1256, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.04.179.
13. Li, G., Ning, C., Ma, Y., Jin, L., Tang, Q., Li, X., Li, M., and Liu, H. (2017) miR-26b Promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through targeting *P TEN*, *DNA Cell Biol.*, **36**, 672-681, doi: 10.1089/dna.2017.3712.

14. Zhang, Z., Gao, Y., Xu, M., Wang, C., Fu, X., Liu, J., Han, D., Jiang, H., Yuan, B., and Zhang, J. (2019) miR-181a regulate porcine preadipocyte differentiation by targeting TGFBR1, *Gene*, **681**, 45-51, doi: 10.1016/j.gene.2018.09.046.
15. Pan, Y., Jing, J., Qiao, L., Liu, J., An, L., Li, B., Ren, D., and Liu, W. (2018) MiRNA-seq reveals that miR-124-3p inhibits adipogenic differentiation of the stromal vascular fraction in sheep via targeting C/EBP α , *Domest. Anim. Endocrinol.*, **65**, 17-23, doi: 10.1016/j.domaniend.2018.05.002.
16. Liu, S., Sun, G., Yuan, B., Zhang, L., Gao, Y., Jiang, H., Dai, L., and Zhang, J. (2016) miR-375 Negatively regulates porcine preadipocyte differentiation by targeting BMPR2, *FEBS Lett.*, **590**, 1417-1427, doi: 10.1002/1873-3468.12169.
17. Gao, Y., Wang, Y., Chen, X., Peng, Y., Chen, F., He, Y., Pang, W., Yang, G., and Yu, T. (2019) MiR-127 attenuates adipogenesis by targeting MAPK4 and HOXC6 in porcine adipocytes, *J. Cell. Physiol.*, **234**, 21838-21850, doi: 10.1002/jcp.28660.
18. Xia, G. (2014) *Screening of Candidate Genes Associated to Meat Quality Traits of Yanbian Yellow Cattle by a Combination of miRNA and Functional Genes Transcriptome*, PhD Thesis, Yanji, Yanbian University [in Chinese].
19. Tran, K., Gealekman, O., Frontini, A., Zingaretti, M. C., Morroni, M., Giordano, A., Smorlesi, A., Perugini, J., De Matteis, R., and Sbarbati, A. (2012) The vascular endothelium of the adipose tissue gives rise to both white and brown fat cells, *Cell Metab.*, **15**, 222-229, doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.008.
20. Fernyhough, M. E., Vierck, J. L., Hausman, G. J., Mir, P. S., Okine, E. K., and Dodson, M. V. (2004) Primary adipocyte culture: adipocyte purification methods may lead to a new understanding of adipose tissue growth and development, *Cytotechnology*, **46**, 163-172, doi: 10.1007/s10616-005-2602-0.
21. Carnevalli, L. S., Masuda, K., Frigerio, F., Bacquer, O. L., Um, S. H., Gandin, V., Topisirovic, I., Sonenberg, N., Thomas, G., and Kozma, S. C. (2010) S6K1 plays a critical role in early adipocyte differentiation, *Dev. Cell*, **18**, 763-774, doi: 10.1016/j.devcel.2010.02.018.
22. Xi, F., Wei, C., Xu, Y., Ma, L., He, Y., Shi, X., Yang, G., and Yu, T. (2019) MicroRNA-214-3p targeting Ctnnb1 promotes 3T3-L1 preadipocyte differentiation by interfering with the Wnt/ β -catenin signaling pathway, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 1816, doi: 10.3390/ijms20081816.
23. Zhu, E., Zhang, J., Zhou, J., Yuan, H., Zhao, W., and Wang, B. (2018) miR-20a-5p promotes adipogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells via targeting Kruppel-like factor 3, *J. Mol. Endocrinol.*, **60**, 225-237, doi: 10.1530/JME-17-0183.
24. Shen, L., Li, Q., Wang, J., Zhao, Y., Niu, L., Bai, L., Shuai, S., Li, X., Zhang, S., and Zhu, L. (2018) miR-144-3p promotes adipogenesis through releasing C/EBP α from Klf3 and CtBP2, *Front. Genet.*, **9**, doi: 10.3389/fgene.2018.00677.
25. Sun, G., Li, F., Ma, X., Sun, J., Jiang, R., Tian, Y., Han, R., Li, G., Wang, Y., and Li, Z. (2019) gga-miRNA-18b-3p inhibits intramuscular adipocytes differentiation in chicken by targeting the *ACOT13* gene, *Cells*, **8**, 556, doi: 10.3390/cells8060556.
26. Jang, S. Y., Chae, M. K., Lee, J. H., Lee, E. J., and Yoon, J. S. (2019) MicroRNA-27 inhibits adipogenic differentiation in orbital fibroblasts from patients with Graves' orbitopathy, *PLoS One*, **14**, e0221077, doi: 10.1371/journal.pone.0221077.
27. Lin, M., Yang, Y., Peng, Z., Zhang, M., Liang, J., Chen, W., Liu, X., and Zheng, Y. (2017) FOXK2, regulated by miR-1271-5p, promotes cell growth and indicates unfavorable prognosis in hepatocellular carcinoma, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **88**, 155-161, doi: 10.1016/j.biocel.2017.05.019.
28. Liu, X., Ma, L., Rao, Q., Mao, Y., Xin, Y., Xu, H., Li, C., and Wang, X. (2015) MiR-1271 inhibits ovarian cancer growth by targeting cyclin G1, *Med. Sci. Monit.*, **21**, 3152-3158, doi: 10.12659/MSM.895562.
29. Jensen, K. P., and Covault, J. (2011) Human miR-1271 is a miR-96 paralog with distinct non-conserved brain expression pattern, *Nucleic Acids Res.*, **39**, 701-711, doi: 10.1093/nar/gkq798.
30. Hai, T., Wolfgang, C. D., Marsee, D. K., Allen, A. E., and Sivaprasad, U. (1999) ATF3 and stress responses, *Gene Express.*, **7**, 321-335, doi: 10.1248/bpb.29.2502.
31. Jang, M., and Jung, M. H. (2014) ATF3 represses PPAR γ expression and inhibits adipocyte differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **454**, 58-64, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.028.
32. Jang, M. K., Kim, C. H., Seong, J. K., and Jung, M. H. (2012) ATF3 inhibits adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **421**, 38-43, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.104.
33. Kim, H. B., Kong, M., Kim, T. M., Suh, Y. H., Kim, W. H., Lim, J. H., Song, J. H., and Jung, M. H. (2006) NFATc4 and ATF3 negatively regulate adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes, *Diabetes*, **55**, 1342-1352, doi: 10.2337/db05-1507.
34. Yan, L., Coletta, L. D., Powell, K. L., Shen, J., Thames, H. D., Aldaz, C. M., and Macleod, M. C. (2011) Activation of the canonical Wnt/ β -catenin pathway in ATF3-induced mammary tumors, *PLoS One*, **6**, e0016515, doi: 10.1371/journal.pone.0016515.
35. Laudes, M. (2011) Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes, *J. Mol. Endocrinol.*, **46**, R65-R72, doi: 10.1530/JME-10-0169.
36. Ross, S. E., Hemati, N., Longo, K. A., Bennett, C. N., Lucas, P. C., Erickson, R. L., and Macdougald, O. A. (2000) Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling, *Science*, **289**, 950-953, doi: 10.1126/science.289.5481.950.
37. Jang, M., Son, Y., and Jung, M. H. (2013). ATF3 plays a role in adipocyte hypoxia-mediated mitochondria dysfunction in obesity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **431**, 421-427, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.154.
38. Li, J., Xu, J., Yan, X., Jin, K., Li, W., and Zhang, R. (2018) Suppression of Capn4 by microRNA-1271 impedes the proliferation and invasion of colorectal cancer cells, *Biomed. Pharmacother.*, **99**, 162-168, doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.107.
39. Xiang, X., Deng, J., Liu, Y., Wan, L., Feng, M., Chen, J., and Xiong, J. (2015) MiR-1271 inhibits cell proliferation, invasion and EMT in gastric cancer by targeting FOXQ1, *Cell. Physiol. Biochem.*, **36**, 1382-1394, doi: 10.1159/000430304.

**BOVINE bta-microRNA-1271 PROMOTES
PREADIPOCYTE DIFFERENTIATION BY TARGETING
ACTIVATION TRANSCRIPTION FACTOR 3*****H. Y. Xu^{1#}, J. Shao^{1#}, B. Z. Yin¹, L. M. Zhang¹, J. C. Fang², J. S. Zhang¹, and G. J. Xia^{1**}**¹ *Agriculture College, Yanbian University, 133002 Yanji, Jilin, China; E-mail: ybuac@ybu.edu.cn*² *Hirosaki University, Faculty of Agriculture and Life Science, 036-8560 Hirosaki, Japan*

Received March 4, 2020

Revised May 21, 2020

Accepted May 21, 2020

Yanbian yellow cattle are one of the top five largest breeds of cattle in China. We had previously found that bta-miR-1271 is differentially expressed in the longissimus dorsi muscles of Yanbian yellow bulls and steers. However, whether bta-miR-1271 affects bovine fat formation is unclear. In this study, we used target gene prediction, dual-luciferase reporter assay, and transfection-mediated overexpression and inhibition of bta-miR-1271 in a culture of Yanbian yellow cattle preadipocytes to investigate the role of bta-miR-1271 in adipogenesis. We showed that bta-miR-1271 directly targets the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the activating transcription factor 3 (ATF3) mRNA and down-regulates its expression. Overexpression of bta-miR-1271 enforced by the miRNA mimics promoted triglyceride accumulation and significantly upregulated expression of the adipogenic peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and CCAAT enhancer-binding protein α (C/EBP α) genes at both the protein and mRNA levels, as demonstrated by RT-qPCR and Western blot analyses. Conversely, inhibition of bta-miR-1271 expression produced the opposite effect. Our results show that bta-miR-1271 regulates differentiation of Yanbian yellow cattle preadipocytes by inhibiting *ATF3* expression, which highlights the importance of microRNA-mediated regulation of adipogenesis. miR-1271 and its target gene(s) may provide a new research direction for investigating biological agents affecting intramuscular fat deposition in cattle.

Keywords: ATF3, bta-miR-1271, preadipocyte differentiation, Yanbian yellow cattle