

研究论文

miR-184靶向Hoxa5下调mTOR通路活性抑制脂肪细胞聚酯

范雨薇^{1,2} 沈瑞莉^{1,2} 徐珂³ 施绮雯¹ 张瑾^{2,4*} 毋文静^{2*}(浙江工业大学, 杭州 310000; ²嘉兴大学生物与化学工程学院, 嘉兴 314001; ³嘉兴大学附属第二医院, 儿童医学中心, 嘉兴 314000; ⁴嘉兴爱博生物科技有限公司, 嘉兴 314050)

摘要 脂肪细胞的分化聚酯过程受到精细的调控, 其中miRNA所发挥的作用正在被逐步揭示。该文基于miRNA-seq筛选以及细胞功能验证, 旨在明确调控聚酯关键分子miR-184的作用及机制。首先, 以体外培养的猪肌内脂肪(intramuscular fat, IM)细胞和皮下脂肪(subcutaneous fat, SC)细胞为材料, miRNA-seq分析发现相比于聚酯能力较强的SC细胞, miR-184在聚酯能力较弱的猪IM细胞中表达水平更高; 进一步分析小鼠前脂肪细胞系3T3-L1, 发现miR-184的表达水平在细胞分化过程中持续降低, 推断其为脂肪细胞聚酯的负调控因子; 然后, 利用miR-184-mimics转染3T3-L1细胞, 发现胞内甘油三酯的积累减少, 脂合成标志基因脂肪酸合成酶(*FAS*)和脂肪酸结合蛋白4(*aP2*)的表达水平降低, 脂分解关键基因脂肪组织甘油三酯酯酶(*ATGL*)和脂蛋白酯酶(*LPL*)的表达水平升高; 随后, 用miR-184-inhibitor验证了上述miR-184的作用。最后利用双荧光素酶报告分析等方法确定miR-184可直接靶向*Hoxa5*基因, 抑制mTOR信号通路的活性。综上, miR-184可能通过靶向*Hoxa5*下调mTOR信号通路活性, 进而抑制脂肪细胞的聚酯。

关键词 microRNA; 脂肪细胞; 聚酯; miR-184

miR-184 Suppresses Adipocyte Lipogenesis by Targeting Hoxa5 and Downregulating the mTOR Pathway

FAN Yuwei^{1,2}, SHEN Ruili^{1,2}, XU Ke³, SHI Qiwen¹, ZHANG Jin^{2,4*}, WU Wenjing^{2*}(College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310000, China; ²College of Biological Chemical Sciences and Engineering, Jiaxing University, Jiaxing 314001, China; ³Children's Medical Center, the Second Affiliated Hospital of Jiaxing University, Jiaxing 314000, China; ⁴Jiaxing i-Bio Biotechnology Co., Ltd, Jiaxing 314050, China)

Abstract Adipocyte differentiation and lipid accumulation are tightly regulated processes, with miRNAs (microRNAs) playing a crucial role. This study investigates the function and mechanisms of miR-184 in lipid metabolism using miRNA-seq (miRNA sequencing) and functional cellular assays. miRNA-seq analysis of porcine IM (intramuscular) and SC (subcutaneous) adipocytes revealed significantly higher miR-184 expression in IM cells, which exhibit lower lipid accumulation, compared to SC cells with greater lipid storage capacity. Further analysis

收稿日期: 2025-02-06

接受日期: 2025-04-30

浙江省自然科学基金重点项目(批准号: LZ23C170002)、浙江省农业(畜禽)新品种选育重大科技专项(批准号: 2021C02068-5)和嘉兴市儿童疾病诊断与研究重点实验室开放基金(批准号: JXER-KJK-2025-1-0069)资助的课题

*通信作者。Tel: 0573-83643695, E-mail: zhangjin7688@163.com; wuwenjing19851020@163.com

Received: February 6, 2025

Accepted: April 30, 2025

This work was supported by Key Project of Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LZ23C170002), the Zhejiang Major Scientific and Technological Projects for the Breeding of New Agricultural (Livestock and Poultry) Varieties (Grant No.2021C02068-5), and the Jiaxing Key Laboratory of Children's Disease Diagnosis & Research Laboratory Open Fund (Grant No.JXER-KJK-2025-1-0069)

*Corresponding authors. Tel: +86-573-83643695, E-mail: zhangjin7688@163.com; wuwenjing19851020@163.com

in 3T3-L1 mouse preadipocytes demonstrated a consistent decrease in miR-184 expression during differentiation, suggesting its role as a negative regulator of lipid accumulation. Overexpression of miR-184 via transfection with miR-184 mimics reduced intracellular triglyceride accumulation, suppressed the expression of lipogenic markers *FAS* (fatty acid synthase) and *aP2* (fatty acid binding protein 4), and upregulated the lipolytic genes *ATGL* (adipose triglyceride lipase) and *LPL* (lipoprotein lipase). These effects were further confirmed using miR-184 inhibitors. Dual-luciferase reporter assays identified *Hoxa5* as a direct target of miR-184, leading to suppression of mTOR signaling. In summary, miR-184 inhibits lipid accumulation in adipocytes by targeting *Hoxa5* and downregulating the mTOR signaling pathway.

Keywords microRNA; adipocyte; adipogenesis; miR-184

脂肪细胞(adipocyte)是构成脂肪组织的主要细胞类型,其分化聚酯过程受到胞外、胞内的信号网络的精细调控。解析脂肪细胞分化聚酯的调控网络,将为人类肥胖症及相关代谢类疾病的诊断与治疗提供理论依据,为农业动物的脂肪性状改良育种提供新策略^[1]。比如在猪育种工作中,脂肪细胞的分化聚酯与脂肪沉积性状密切相关,其中皮下(subcutaneous, SC)脂肪沉积与瘦肉率呈负相关,肌内(intramuscular, IM)脂肪含量与肉品质呈正相关^[2]。因此,为了培育优质瘦肉猪,减少皮下脂肪沉积并增加肌内脂肪含量成为重要的育种目标^[3]。虽然IM脂肪细胞和SC脂肪细胞都属于白色脂肪细胞,且分化路径与代谢调控机制十分相似,但研究者还是发现了它们之间存在的差异,在能量来源方面,IM细胞主要依赖葡萄糖和醋酸盐,而SC细胞则以醋酸盐为主^[4-5]。此外,我们发现猪IM细胞的聚酯能力均弱于SC细胞^[6]。研究发现生脂关键基因过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , *PPAR γ*)和脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, *FAS*)等在IM中的表达水平显著低于SC脂肪细胞^[7],也印证了IM聚酯能力弱的观点。学者们认为在IM细胞内存在抑制其分化聚酯的因子。

随着对miRNA(microRNA)研究的深入,科研人员发现miRNA通过参与基因表达的转录后调控影响各种细胞的活动,包括细胞生长、分化、发育和凋亡等^[8]。在脂肪细胞中,miRNA通过对生脂转录因子的调控,影响其分化聚酯过程^[9-10],或通过阻止有丝分裂克隆扩增调控脂肪细胞发育^[11],以及参与调控脂肪细胞的其他功能(如胰岛素应答、脂肪因子的分泌等)^[12-13]。以猪脂肪细胞为研究对象,科研人员已经发现多个miRNA分子(如miR-196b、miR-450b和miR-206等)在分化聚酯过程中发挥重要的调控作用^[14-15]。

mTOR信号通路与miR-184有着密切的联系,miR-184能够抑制mTOR信号通路的关键上游调节因子

AKT2的表达,进而抑制mTOR信号通路相关蛋白的活性,从而影响细胞的增殖、生长和代谢^[16]。miR-184还可通过调控富含脯氨酸的AKT底物(proline-rich Akt substrate of 40 kDa, *PRAS40*)和糖原合成酶激酶3 α (glycogen synthase kinase 3 α , *GSK3 α*)等基因的表达进而影响mTORC1的活性^[17]。mTOR是PI3K/AKT/mTOR信号通路的关键组成部分,该通路在脂肪细胞的分化和功能中起重要作用。mTOR信号通路的激活能够促进脂肪合成相关基因[如*PPAR γ* 、CCAAT/增强子结合蛋白 α (CCAAT/enhancer binding protein α , *C/EBP- α*)、甾醇调节元件结合蛋白1c(sterol regulatory element-binding protein 1c, *SREBP-1c*)、*FAS*、乙酰辅酶A羧化酶1(acetyl-CoA carboxylase 1, *ACC-1*)、脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, *LPL*)等]的表达,例如,mTOR信号通路的激活可以增加SREBP-1c的水平,而SREBP-1c是一种促进脂肪合成的转录因子,能够上调脂肪合成酶(如*FAS*和*ACC-1*)的表达,从而促进脂肪的从头合成^[18]。因此,miR-184可能通过mTOR信号通路影响脂质沉积,但目前还未见报道。

本研究通过对猪IM与SC脂肪细胞的miRNA表达谱进行转录组测序和生物信息学分析,发现miR-184在聚酯能力较弱的IM细胞内高表达,然后利用小鼠前脂肪细胞系3T3-L1对此进行验证,证明miR-184可能通过调控mTOR信号通路抑制聚酯作用。本研究通过预测和验证,确定了miR-184的靶基因为同源框A5(homeobox A5, *Hoxa5*),这为解析IM和SC细胞聚酯能力的差异提供了新证据。

1 材料与方法

1.1 材料

三只3日龄雄性嘉兴黑猪的仔猪由浙江省嘉兴青莲食品有限公司提供。对仔猪实施安乐死后,在无菌状态下,采集皮下脂肪组织(颈部和肩胛处)和

背最长肌组织(背部), 分别用于分离原代皮下前体脂肪细胞和肌内前体脂肪细胞。实验所用3T3-L1细胞株购自浙江百迪生物科技有限公司(货号C5006)。动物实验均遵照《中华人民共和国实验动物管理条例》的相关规定, 并已通过嘉兴大学生物与化学工

程学院动物实验及实验动物伦理委员会审查批准(伦理批件号: JUMC2024-267)。

1.2 试剂及仪器

试剂及仪器情况详见表1。

miR-184-mimics与miR-184-inhibitor序列如表

表1 主要试剂与仪器
Table 1 Main reagents and equipment

试剂或仪器 Reagents or instruments	品牌 Brand
DMEM/F12 (Dulbecco's modified eagle medium/nutrient mixture F-12)	HyClone
Penicillin-streptomycin solution	HyClone
FBS (fetal bovine serum)	Baidi Biotechnology Co., Ltd
IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine)	Sigma
DXMS (dexamethasone)	Sigma
Insulin	Sigma
miR-184 mimics	Guangzhou RiboBio Co., Ltd
miR-184 inhibitor	Guangzhou RiboBio Co., Ltd
NC-mimics	Guangzhou RiboBio Co., Ltd
NC-inhibitor	Guangzhou RiboBio Co., Ltd
U6 primer	Guangzhou RiboBio Co., Ltd
riboFECT™ CP reagent	Guangzhou RiboBio Co., Ltd
Lipofectamine 2000	Invitrogen
TG (triglyceride) kit	Nanjing Jiancheng Bioengineering Institute
Oil red O staining kit	Beyotime Biotech Inc.
TRIzol	Invitrogen
BCA protein assay kit	Beijing Cowin Century Biotechnology Co., Ltd
2× plus SYBR Real-time PCR mixture	Beijing Cowin Century Biotechnology Co., Ltd
PrimeScript™ RT reagent kit	TaKaRa
Dual luciferase reporter gene assay kit	Promega
SuperSignal ECL chemiluminescent substrate kit	Millipore
β-tubulin (KM9003, 1:5 000) antibody	Tianjin Sungene Biotech Co., Ltd
aP2 (ab23693, 1:1 000) antibody	Abcam
FAS (ab22759, 1:1 000) antibody	Abcam
p-mTOR (#5536, 1:1 000) antibody	Cell Signaling Technology
mTOR (#2983, 1:1 000) antibody	Cell Signaling Technology
p-ERK1/2 (#9101, 1:1 000) antibody	Cell Signaling Technology
ERK1/2 (#9102, 1:1 000) antibody	Cell Signaling Technology
p-AMPKα (#4188, 1:1 000) antibody	Cell Signaling Technology
AMPKα (#5381, 1:1 000) antibody	Cell Signaling Technology
GAPDH (ab8245, 1:1 000) antibody	Abcam
HRP labeled sheep anti mouse antibody HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:1 000)	Shanghai Bio-Platform Technology Company
HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1 000)	Shanghai Bio-Platform Technology Company
Nucleic acid test device	ThermoFisher Scientific
Real-time PCR instrument	ThermoFisher Scientific
Polymerase chain reaction machine	Eppendorf
Gel imaging system	Bio-Rad
Cell culture plate	Corning
Carbon dioxide cell incubator	ThermoFisher Scientific
Inverted fluorescence microscope	Leica

2所示。miR-184-mimics是针对miR-184的成熟体设计并合成的小片段双链miRNA,能模拟细胞中内源性成熟miR-184的高水平表达,以增强内源性miRNA的调控作用;miR-184-inhibitor是一种特异性设计的核酸分子,是一段与miR-184完全互补的反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide),能够与miR-184结合形成双链,从而阻止miR-184与其靶标mRNA结合。NC-mimics是一种阴性对照(negative control)的miRNA模拟物。它是一种经过设计的非特异性核酸序列,通常与目标miRNA的序列不匹配,但具有类似的化学性质和结构。NC-inhibitor是一种经过设计的非特异性反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide),其序列与目标miRNA的成熟序列不互补,因此不会与目标miRNA结合。

1.3 细胞培养和诱导脂肪细胞成脂分化

原代脂肪细胞培养:将分离的猪皮下脂肪组织用PBS洗涤2~3次,常温下浸没于0.1% I型胶原酶消化液后剪碎,37 °C下振荡消化60 min后,过滤并收集滤液,常温下1 500 r/min离心10 min,收集得到的细胞沉淀,即为皮下前体脂肪细胞。用同样的方法将剪碎的背最长肌组织块浸没于0.1% I型胶原酶消化液中,于37 °C下振荡消化120 min后,过滤并收集滤液,常温下1 500 r/min离心10 min,收集沉淀,将细胞悬液接种于培养瓶中,37 °C培养1 h,收集贴壁的肌内前体脂肪细胞。细胞每两天换液扩繁一代后接种至12孔板,长满后以诱导液I(含1%青霉素/链霉素、10% FBS、0.5 mmol/L IBMX、1.0 μmol/L DXMS、10 μmol/L Insulin和DMEM/F12)诱导2天,再用诱导液II(含1%青霉素/链霉素、10% FBS、10 μmol/L Insulin和DMEM/F12)继续诱导8天,至第10天收集细胞。

3T3-L1脂肪细胞培养:复苏细胞,扩繁一代后接种于细胞培养板中,细胞每两天换一次培养液,长满后诱导分化,诱导方法同猪前体脂肪细胞。在成脂分化后的第0天开始,每隔一天,收集一次细胞样品(各3孔),用于总RNA的提取。

1.4 细胞转染

培养3T3-L1脂肪细胞,待细胞融合达到80%~90%时,更换培养基。并依据riboFECT™ CP转染试剂盒的指导进行转染操作。以1孔为例,将5 μL浓度为20 μmol/L的NC-mimics、miR-184-mimics、NC-inhibitor和miR-184-inhibitor试剂

分别加入到60 μL的1× riboFECT™ CP缓冲液中,轻轻混合均匀。接着,向各混合物中加入6 μL的riboFECT™阳离子转染试剂(riboFECT™ CP reagent),并轻柔吹打以充分混匀,在室温下孵育15 min。最后将制备好的转染复合物均匀滴加到12孔板中^[19]。转染后的细胞在达到接触抑制状态后继续培养2天,随后开始按照1.3中的方法进行成脂诱导分化。在诱导分化的第10天,收集细胞并进行各项检测。以上每个处理均重复进行3次生物学实验。

1.5 油红O染色

对诱导分化至第10天的脂肪细胞进行油红O测定,根据试剂盒进行操作。用PBS清洗后,加入4%多聚甲醛常温固定20 min后去除固定液,PBS清洗,然后加入油红O染色。接着,去除染色液,清洗后先在明亮处用手机对孔板拍照,之后用荧光倒置显微镜对染色细胞进行拍照。

1.6 甘油三酯测定

将诱导分化至第10天的脂肪细胞用PBS清洗,向各孔中加入10%的TritonX-100裂解液,后收集细胞样品,0 °C避光下孵育30 min后,对照BCA试剂盒说明书检测蛋白浓度。根据甘油三酯(TG)测试盒上的方法,检测并计算甘油三酯的含量。

1.7 Real-time PCR检测

利用Trizol裂解法提取总RNA,使用核酸测定仪测定RNA浓度,参照TaKaRa反转录试剂盒说明书进行反转录。以反转录得到的cDNA溶液为模板,根据表3配制反应体系。使用Real-time PCR仪检测相关基因表达量,反应程序为:95 °C预变性30 s;PCR反应40个循环,每个循环为95 °C变性5 s,60 °C退火/延伸10 s;熔解曲线阶段为95 °C变性15 s,60 °C退火和采集荧光信号30 s,95 °C再次高温变性并采集信号15 s。Real-time PCR方法检测U6、miR-184、β-actin、FAS、aP2、ATGL和LPL mRNA相对表达量,miR-184以U6为内参基因,其余以β-actin为内参基因,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达丰度^[19-20]。引物序列见表4。

1.8 Western blot分析

收集成脂诱导第10天的3T3-L1脂肪细胞总蛋白,使用BCA蛋白质测定试剂盒测定蛋白的浓度,加入蛋白上样缓冲液后煮沸10 min变性;利用10% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白,先运行80 V恒压、时间30 min的程序,后将电压改为120 V、时

间90 min。条带分离后,使用PVDF膜进行转膜:在电泳槽中加入转模液,在200 mA的条件下转模2 h。在转膜之后;将膜在室温下用5%脱脂牛奶封闭2 h, TBST清洗后,按照蛋白分子量标准物(protein maker)裁剪出相应的条带,按照条带大小分别使用FAS、 α P2、 β -tubulin、p-mTOR、mTOR、p-ERK1/2、ERK1/2、p-AMPK α 、AMPK α 和GAPDH的一抗(稀释比例见表1) 4 °C孵育过夜;再次用TBST洗膜,加入稀释的对应二抗(稀释比例见表1),常温下摇床上孵育1.5 h,再用TBST洗膜,后加ECL发光液,接着用Bio-Rad成像系统曝光,并使用Image Lab软件测定分析灰度值,最后计算蛋白表达水平^[21-22]。

1.9 双荧光素酶报告分析

使用TargetScan 7.2数据库数据库查找miR-184与*Hoxa5*的结合位点,在结合位点两端设计含有酶切位点和保护碱基的引物,以3T3-L1细胞的cDNA为模版,进行PCR扩增片段,使用胶回收试剂盒对凝胶电泳分离的PCR产物胶回收,用限制性内切酶对载体和目标片段进行酶切,酶切产物进行电泳分离回收。通过连接酶对纯化后的酶切载体和目标片段进行酶连,将连接产物转化进入大肠杆菌DH5 α 中,挑选阳性菌落进行测序,对比序列完全一致后,就得到了*Hoxa5*基因3'端非翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)野生型重组psi-CHECK2荧光素酶报告载体

表2 miRNA激动剂和抑制剂序列
Table 2 The sequences of miRNA agonists and antagonists

miRNA	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
miR-184-mimics	CCU UAU CAC UUU UCC AGC CAG C
miR-184-inhibitor	GCU GGC UGG AAA AGU GAU AAG G

表3 Real-time PCR反应体系
Table 3 Real-time PCR reaction system

试剂 Reagents	体系(10 μ L) System (10 μ L)
2 $\times$ Magic SYBR mixture	5.0 μ L
Upstream primer (10 μ mol/L)	0.2 μ L
Downstream primer (10 μ mol/L)	0.2 μ L
cDNA template	1.0 μ L
ddH ₂ O	3.6 μ L

表4 引物序列信息
Table 4 Primer sequence information

基因名称 Gene name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
<i>FAS</i>	Forward: CTG CGA TTC TCC TGG CTG TGAA Reverse: CAA CAA CCA TAG GCG ATT TCT GG
<i>αP2</i>	Forward: TCA CAT TGC GGC AGC TCC GTA A Reverse: GTA GCA CTT GCA GTT CGG AGA G
<i>ATGL</i>	Forward: GGA ACC AAA GGA CCT GAT GAC C Reverse: ACA TCA GGC AGC CAC TCC AAC A
<i>LPL</i>	Forward: GCG TAG CAG GAA GTC TGA CCA A Reverse: AGC GTC ATC AGG AGA AAG GCG A
miR-184	Forward: CGC GCC TTA TCA CTT TTC CA Reverse: AGT GCA GGG TCC GAG GTA TT
<i>GAPDH</i>	Forward: CAT CAC TGC CAC CCA GAA GAC TG Reverse: ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC AG

(psi-CHECK-2-*Hoxa5* 3'UTR)。使用Lipofectamine 2000转染试剂将载体分别与NC-mimics或miR-184 mimics共转染至HEK293T细胞中,培养48 h后按照双荧光素酶检测试剂盒说明书检测荧光素酶活性,以海肾荧光素酶为内参^[19]。

1.10 数据统计

采用Graph Pad Prism 8进行统计学分析和制图,实验数据以“平均值±标准误”(mean±SEM)的形式表示,通过Student's *t*-test检验进行显著性差异分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义,其中,* $P<0.05$ 为结果具有显著性差异,** $P<0.01$ 为结果具有极显著性差异^[19]。

2 结果

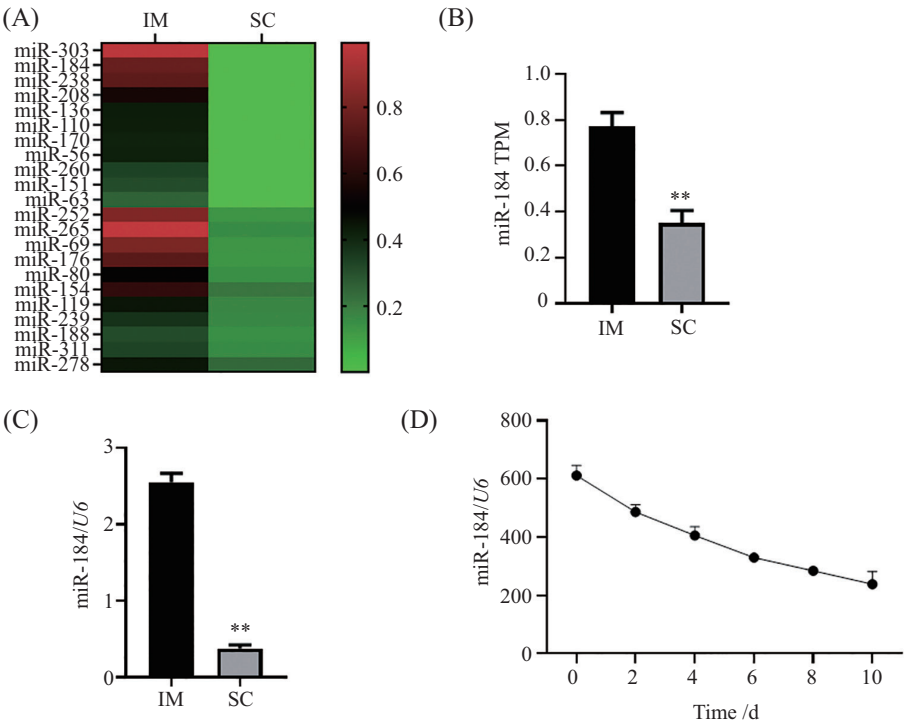
2.1 miR-184在猪肌内与皮下脂肪细胞中差异表达

猪IM细胞的聚酯能力显著弱于SC细胞,为了挖掘调控聚酯能力的关键分子,本研究利用转录组

技术对猪IM与SC细胞进行miRNA测序,发现miR-184在IM细胞中的表达水平显著高于SC细胞(图1A和图1B), Real-time PCR验证也得到了相同结论(图1C)。为了推测miR-184可能的功能,以前脂肪细胞系3T3-L1为材料,通过Real-time PCR技术分析,检测在分化聚酯过程中miR-184表达水平的变化,结果显示随着脂肪细胞的聚酯程度的增加,miR-184表达水平逐渐降低(图1D)。这推断其可能具有抑制聚酯的作用。

2.2 过表达miR-184可抑制脂肪细胞的聚酯作用

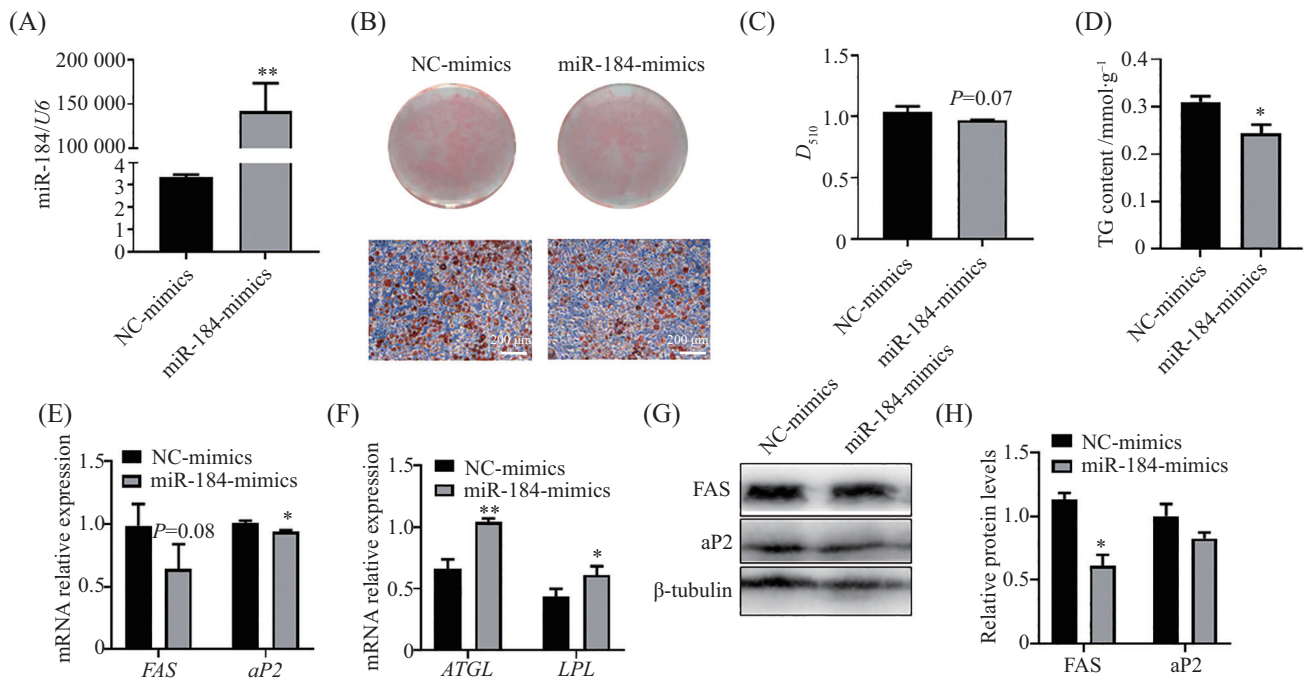
为了探究miR-184对脂肪细胞聚酯的具体影响,本研究利用小鼠前脂肪细胞系3T3-L1进行了功能验证实验。首先,通过转染miR-184-mimics和NC-mimics,成功建立了miR-184过表达的细胞模型。Real-time PCR结果显示,miR-184-mimics组的miR-184相对表达水平显著高于NC-mimics组(图2A),表明miR-184在细胞中的过表达效率较高。随后,我们采用



A: 猪皮下与肌内脂肪细胞中miRNA的差异表达分析; B: miR-184在猪皮下与肌内脂肪细胞的表达水平对比(转录组测序数据); C: miR-184在猪皮下与肌内脂肪细胞的表达水平对比(Real-time PCR数据); D: miR-184在3T3-L1细胞聚酯过程中的表达水平变化。IM: 肌内脂肪细胞; SC: 皮下脂肪细胞; TPM: 标准化后的表达量值。n=3, ** $P<0.01$, 皮下脂肪细胞与肌内脂肪细胞相比较。

A: analysis of differential miRNA expression in subcutaneous and intramuscular adipocytes of pigs; B: the comparison of miR-184 expression level in porcine SC and IM adipocytes (RNA-seq data); C: the comparison of miR-184 expression level in porcine SC and IM adipocytes (Real-time PCR data); D: changes of miR-184 expression lelves in 3T3-L1 adipogenesis process. IM: intramuscular adipocytes; SC: subcutaneous adipocytes; TPM: expression value after standardizations. n=3, ** $P<0.01$, comparison of SC with IM.

图1 miR-184表达丰度分析
Fig.1 The expression level of miR-184



A: miR-184的过表达水平; B: 胞内甘油三酯的油红O染色; C: 油红O的 D_{510} 值; D: 细胞内甘油三酯含量; E: 脂合成基因 FAS 和 $aP2$ 的相对表达情况; F: 脂分解基因 $ATGL$ 和 LPL 的相对表达水平; G: Western blot分析NC-mimics组和miR-184组的 FAS 和 $aP2$ 的蛋白质水平; H: ImageJ软件对NC-mimics组和miR-184组的 FAS 和 $aP2$ 蛋白质水平的定量分析。 $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与NC-mimics组相比较。

A: overexpression level of miR-184; B: oil red O staining of intracellular triglycerides; C: D values of oil red O; D: triglyceride content; E: relative expression of FAS and $aP2$; F: relative expression of $ATGL$ and LPL ; G: Western blot analysis of FAS and $aP2$ protein levels in NC-mimics and miR-184-mimics groups; H: quantification analysis of FAS and $aP2$ protein levels in NC-mimics and miR-184-mimics groups with ImageJ. $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the NC-mimics group.

图2 过表达miR-184对3T3-L1脂肪细胞聚酯的影响

Fig.2 Effects of miR-184 over-expression on adipogenesis

油红O染色法对细胞内的脂滴含量进行了检测。结果显示, miR-184-mimics组的细胞内脂滴含量降低(图2B和图2C)。通过甘油三酯(TG)含量测定试剂盒定量分析发现, miR-184-mimics组的TG含量较NC-mimics组也显著降低(图2D), 这些结果表明miR-184过表达显著抑制了脂肪细胞的脂质积累。进一步的分子机制研究显示, miR-184过表达显著降低了脂合成标志基因 $aP2$ 的mRNA表达水平, 而 FAS 的表达水平也呈现出下降趋势($P=0.08$, 图2E)。与此同时, 脂分解标志基因 $ATGL$ 和 LPL 的表达水平显著升高(图2F)。Western blot分析进一步验证了 FAS 和 $aP2$ 蛋白表达水平的变化, 与Real-time PCR结果一致(图2G和图2H)。这些结果表明, miR-184-mimics通过抑制脂合成基因的表达, 同时促进脂分解基因的表达, 从而抑制脂肪细胞的聚酯过程。

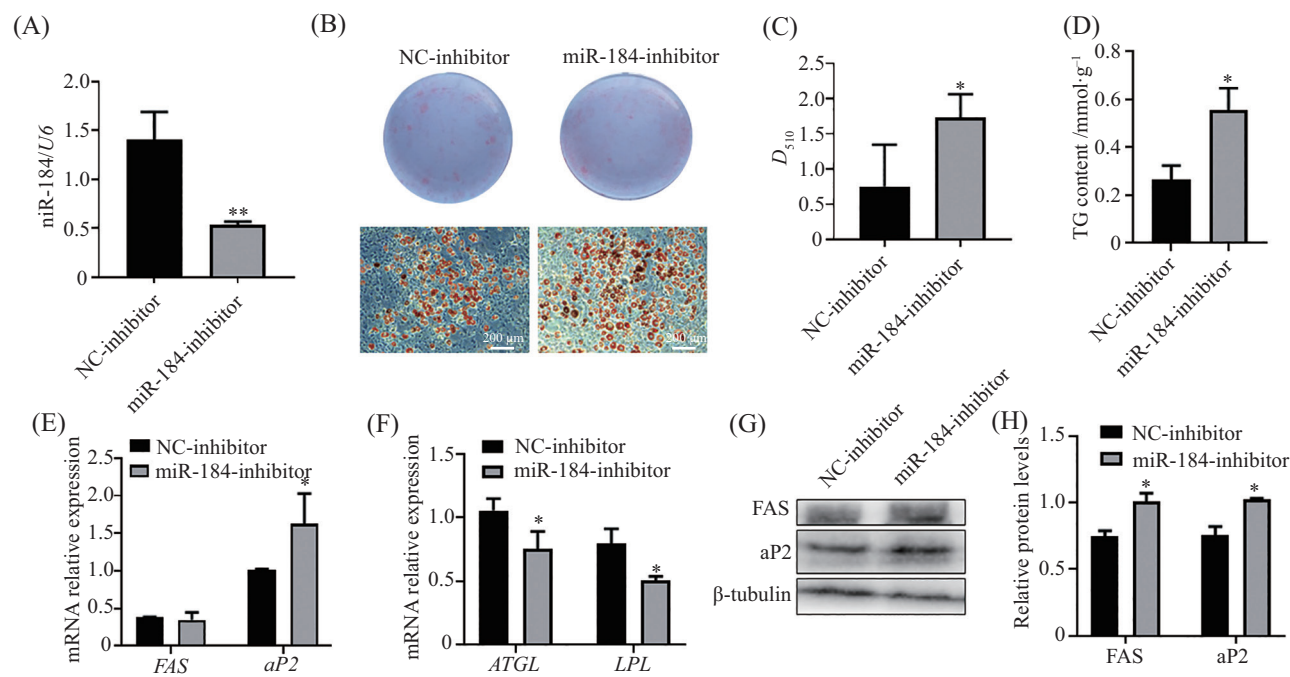
2.3 敲减miR-184可促进脂肪细胞的聚酯作用

为深入探究miR-184在脂肪细胞脂质代谢中的调控作用, 本研究通过向3T3-L1前脂肪细胞转染

miR-184-inhibitor和NC-inhibitor, 成功构建了miR-184敲减的细胞模型。经Real-time PCR检测证实, 与对照组(NC-inhibitor组)相比, miR-184-inhibitor组中miR-184的表达受到显著抑制(图3A), 敲低效率约为60%, 表明模型构建成功且敲减效率理想。油红O染色和甘油三酯(TG)含量测定结果显示, miR-184敲减显著增加了细胞内脂滴的形成和甘油三酯的积累(图3B~图3D)。接着, 本研究检测了脂代谢相关基因的表达情况。结果显示, miR-184敲减显著上调了脂合成标志基因 $aP2$ 的表达(图3E), 同时显著下调了脂分解标志基因 $ATGL$ 和 LPL 的表达(图3F)。Western blot分析进一步验证了脂代谢相关蛋白的表达变化, 与Real-time PCR结果一致(图3G和图3H)。综上, 本研究证实miR-184的敲减通过上调脂合成基因(如 $aP2$ 和 FAS)的表达, 同时下调脂分解基因(如 $ATGL$ 和 LPL)的表达, 从而促进脂肪细胞的脂质积累。

2.4 miR-184抑制mTOR信号通路活性

为了探究miR-184是否通过mTOR信号通路调



A: miR-184的干扰效率; B: 胞内甘油三酯的油红O染色; C: 油红O的 D 值; D: 胞内甘油三酯含量; E: 脂合成基因*FAS*和*aP2*的相对表达情况; F: 脂分解基因*ATGL*和*LPL*的相对表达; G: Western blot分析NC-inhibitor组和miR-184-inhibitor组的*FAS*和*aP2*的蛋白质水平; H: ImageJ软件对NC-inhibitor组和miR-184-inhibitor组的*FAS*、*aP2*的蛋白质水平进行定量分析。 $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与NC-inhibitor组相比较。

A: interference efficiency of miR-184; B: oil red O staining of intracellular triglycerides; C: D value of oil red O; D: triglyceride content; E: relative expression of *FAS* and *aP2*; F: relative expression of *ATGL* and *LPL*; G: Western blot analysis of *FAS*, *aP2* protein levels in NC-inhibitor and miR-184-inhibitor groups; H: quantification analysis of *FAS* and *aP2* protein levels in NC-mimics and miR-184-mimics groups with the software of ImageJ. $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with the NC-inhibitor group.

图3 敲减miR-184对3T3-L1脂肪细胞聚酯的影响

Fig.3 Effects of miR-184 knockdown on 3T3-L1 adipogenesis

控脂肪细胞的聚酯过程,本研究通过Western blot检测了信号通路相关蛋白的表达水平。结果显示,过表达miR-184后, mTOR的磷酸化水平显著降低(图4A和图4B),表明miR-184能够抑制mTOR信号通路的活性。这一结果提示miR-184可能通过抑制mTOR信号通路,进而抑制脂肪细胞的脂质积累。

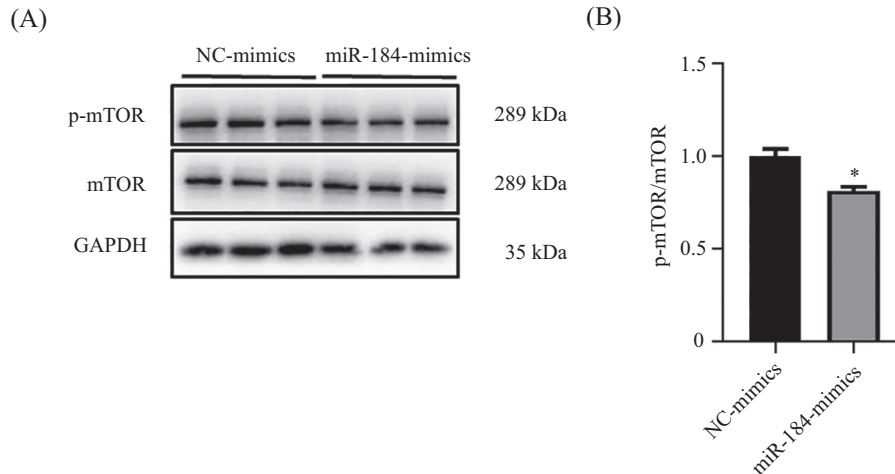
2.5 miR-184靶向抑制Hoxa5基因在小鼠胚胎成纤维细胞中的表达

为了进一步揭示miR-184的调控机制,本研究通过TargetScan数据库预测了miR-184的潜在靶基因,并发现Hoxa5是miR-184的潜在靶基因之一(图5A)。通过Real-time PCR检测发现,过表达miR-184后,3T3-L1细胞内Hoxa5的表达量显著降低(图5B)。为了验证miR-184是否直接靶向Hoxa5,我们构建了Hoxa5基因3'UTR的psi-CHECK2荧光素酶报告载体,并将其与miR-184-mimics或NC-mimics共转染至HEK293T细胞中。结果显示:与转染NC-mimics相比,psi-CHECK-2-Hoxa5 3'UTR载体和miR-184 mimics

共转染会明显降低海肾荧光强度与萤火虫荧光强度的比值(图5C),验证了miR-184直接靶向Hoxa5。

3 讨论

随着生物技术的发展,科学家们逐渐意识到miRNA在生物体各项生命过程中的重要调控作用^[23-24]。在脂肪细胞的分化聚酯过程中,miRNAs的重要作用也逐步被揭示。2003年,XU等^[25]利用果蝇证明miR-14具有抑制甘油三酯积累的作用,这是首次报道miRNA参与脂类代谢。次年,ESAU等^[26]报道了miR-143通过调控其靶基因*ERK5*促进成脂分化。随后,大量参与脂类代谢调控的miRNAs分子被发现,所涉及到的信号通路和作用机制也被解析^[27]。本研究对比聚酯能力差异显著的猪IM细胞和SC细胞中miR-184的表达水平,发现在聚酯能力较弱的猪IM细胞中的表达水平显著高于聚酯能力较强的SC细胞,并通过对3T3-L1聚酯过程的研究,发现miR-184的表达水平呈现持续降低的趋势,推断其为脂肪

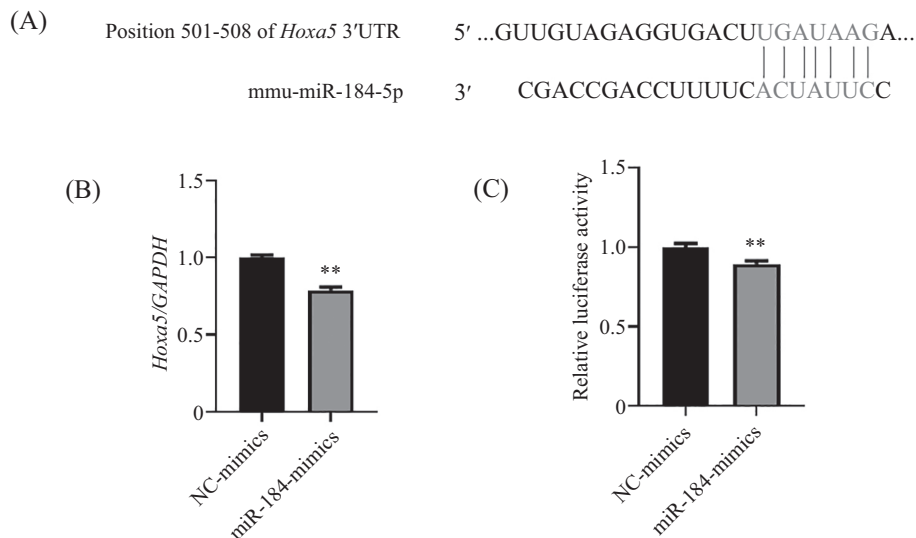


A: 过表达miR-184后Western blot检测mTOR信号通路蛋白表达水平; B: 对图A的灰度值分析。n=3, * P <0.05, 与NC-mimics组相比较。

A: Western blot detected the protein expression level of mTOR signaling pathway after over-expression of miR-184. B: analysis of gray values for panel A. n=3, * P <0.05 compared with NC-mimics group.

图4 过表达miR-184抑制mTOR信号通路活性

Fig.4 Over-expression of miR-184 inhibits the activity of mTOR signaling pathway



A: 通过TargetScan网站检测Hoxa5 3'UTR与miR-184的结合位点; B: Real-time PCR检测过表达miR-184后Hoxa5的表达量; C: 报告载体与miR-NC或miR-184共转染后的双荧光素酶活性检测。n=3, ** P <0.01, 与NC-mimics组相比较。

A: the binding site of Hoxa5 3'UTR and miR-184 was detected by TargetScan; B: the expression of Hoxa5 after miR-184 over-expression was detected by Real-time PCR; C: the dual-luciferase activity assay after co-transfection of the reporter vector with miR-NC or miR-184. n=3, ** P <0.01 compared with NC-mimics group.

图5 miR-184对Hoxa5的靶向调控

Fig.5 miR-184 targets and regulates Hoxa5

细胞聚酯的负调控因子。

miR-184最早由ABOBAKER团队^[28]在果蝇胚胎中发现, 定位在9号染色体上。2006年, 首次在哺乳动物细胞中发现miR-184^[29]。有研究发现miR-184在多种肿瘤的发生发展过程发挥重要的调控作用。例如, miR-184在舌鳞状细胞癌中呈高表达, 能够促进舌鳞状癌细胞的增殖^[30]; 可以通过抑制 β -catenin

和Wnt信号通路, 抑制表皮干细胞的过度增殖和皮肤癌的发生发展^[31]; 能通过MAPK信号通路促进多卵巢综合征的发生^[31]; 可作为一种潜在的前列腺癌分子标记物^[33]; miR-184还能通过靶向AKR1C3 mRNA的3'UTR在体外促进膀胱癌细胞增殖并促进小鼠肿瘤生长^[34]。此外, miR-184在局部缺血性疾病中对血管新生具有显著的调节作用, 通过与其

靶基因 *VEGF*(vascular endothelial growth factor)和 *IGF-2*(insulin like growth factor 2)结合,抑制 *VEGF*和 *IGF-2*表达,从而减少新生血管的生成^[35]。关于miR-184对脂肪细胞的调控作用,迄今未见报道。

本研究为了确定miR-184对脂肪细胞聚酯的影响,采用前脂肪细胞系3T3-L1分化聚酯模型,通过miR-184-mimics和miR-184-inhibitor转染改变胞内miR-184的表达水平,对3T3-L1脂肪细胞甘油三酯积累进行染色和定量分析。油红O染色结果显示,miR-184-mimics转染后,3T3-L1脂肪细胞内的脂滴积累减少,而miR-184-inhibitor转染后,3T3-L1脂肪细胞内的脂质沉积增加,甘油三酯定量分析也得到了统一的结果,说明miR-184表达水平与脂肪细胞的聚酯能力呈负相关。

利用Real-time PCR和Western blot检测脂代谢标志基因(FAS、aP2、ATGL、LPL)的mRNA和蛋白表达水平。FAS负责催化乙酰辅酶A和丙二酰辅酶A合成脂肪酸,是脂肪酸合成的限速酶^[36],aP2主要作用是调节脂肪酸的摄取和胞内运输^[37],二者的编码基因是脂肪细胞脂合成标志基因,其表达水平代表细胞脂合成的能力;ATGL能够催化甘油三酯分解为甘油二酯和脂肪酸^[38],LPL是一种甘油三酯水解酶,主要水解血浆脂蛋白中的甘油三酯,为脂肪生成和储存提供游离脂肪酸^[39],二者编码基因是脂分解的标志基因,其表达水平代表细胞的脂解能力。转染miR-184-mimics增加3T3-L1脂肪细胞内miR-184的表达水平,导致FAS和aP2表达水平降低,ATGL和LPL表达水平升高,提示miR-184具有减弱脂合成能力、加强脂分解的作用;miR-184-inhibitor降低miR-184的表达水平的实验也印证了上述结论,可见miR-184能够同时影响脂合成与分解基因的表达,属于脂代谢调控的上游分子,但具体的调控机制还不清楚。

脂肪细胞的形成和脂质代谢涉及多种信号通路,包括ERK1/2通路、AMPK通路和mTOR通路等。ERK1/2是MAPK家族的关键成员,参与细胞代谢调控。其激活可促进脂肪细胞增殖,进而影响脂肪组织的体积和功能,同时还能调节脂肪分解相关酶(如激素敏感性脂肪酶)的活性,从而控制脂肪分解速率^[40]。AMPK作为一种关键的能量感应酶,通过抑制转录因子(如SREBP1)的活性,抑制脂肪合成相关基因的表达,在脂肪代谢和脂肪沉积中发挥重要作用^[41]。mTOR信号通路是细胞内外信号分

子激活的重要通路,调节脂质和蛋白质合成以及细胞代谢。该通路包含两个主要复合物:mTORC1和mTORC2^[42]。mTORC1通过激活关键转录因子(如SREBP、Lipin1和PPAR γ)促进脂质生成,并通过抑制激素敏感性脂解酶(hormone-sensitive triglyceride lipase, HSL)的磷酸化和ATGL的表达来抑制脂解^[43-44]。因此,mTOR信号通路的激活可促进前脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化,增加脂肪积累^[42]。有研究显示,miR-330通过靶向SESN3激活AKT-mTOR信号通路,促进肌内脂肪前细胞的脂肪生成^[44]。另外,也有研究表明miR-184可以抑制mTOR信号通路的上游AKT2和下游效应分子p70S6K的表达^[16]。在本研究中miR-184过表达后,p-mTOR水平显著降低,表明miR-184抑制了mTOR信号通路的活性,而ERK1/2信号通路、AMPK信号通路活性未见明显变化。因此,我们推测miR-184可能通过抑制mTOR信号通路来减少细胞内脂质积累。

通过网站预测,我们发现过表达miR-184下调了*Hoxa5*的表达。*Hoxa5*是Hox基因家族的重要成员,近年来研究发现其在脂肪组织发育、脂肪细胞分化及脂肪代谢中发挥着重要作用^[45-46]。例如,*Hoxa5*可以通过转录调控和阻断JAK2/STAT3信号通路抑制小鼠脂肪细胞增殖^[47];*Hoxa5*还可以促进山羊皮下前脂肪细胞的成脂分化并抑制其体外增殖^[48]。在高脂饮食诱导的肥胖小鼠脂肪组织中,*Hoxa5*表达水平显著降低^[49]。有研究发现,*Hoxa5*通过抑制PKA/HSL途径促进脂肪细胞分化^[49]。本研究通过双荧光素酶报告分析确定*Hoxa5*是miR-184的靶基因,由此推测miR-184可能通过靶向*Hoxa5*调控脂肪细胞的聚酯过程。

综上所述,本研究发现miR-184可下调mTOR信号通路活性,抑制脂肪细胞聚酯,同时确定*Hoxa5*是miR-184的靶基因。这为解析猪IM和SC细胞聚酯能力的差异提供了新证据。

参考文献 (References)

- [1] HAUSMAN G J, DODSON M V, AJUWON K, et al. Board-invited review: the biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals [J]. *J Anim Sci*, 2009, 87(4): 1218-46.
- [2] ZHANG Y, SUN Y, WU Z, et al. Subcutaneous and intramuscular fat transcriptomes show large differences in network organization and associations with adipose traits in pigs [J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(10): 1732-46.

- [3] WU W, YIN Y, HUANG J, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in pigs proves that LGALS12 deficiency suppresses the proliferation and differentiation of porcine adipocytes [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2024, 1869(3): 159424.
- [4] 徐珂. 调控猪脂肪细胞代谢的关键microRNAs的鉴定[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院(XU K. Identification of key microRNAs regulating the metabolism of porcine adipocytes [D]. Qinhuangdao: Hebei Normal University of Science & Technology), 2020.
- [5] RHOADES R D, SAWYER J E, CHUNG K Y, et al. Effect of dietary energy source on *in vitro* substrate utilization and insulin sensitivity of muscle and adipose tissues of Angus and Wagyu steers [J]. *J Anim Sci*, 2007, 85(7): 1719-26.
- [6] WU W J, ZHANG D W, YIN Y J, et al. Comprehensive transcriptomic view of the role of the LGALS12 gene in porcine subcutaneous and intramuscular adipocytes [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 509.
- [7] WU W, ZHANG J, ZHAO C, et al. CTRP6 Regulates porcine adipocyte proliferation and differentiation by the AdipoR1/MAPK signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(27): 5512-22.
- [8] SALIMINEJAD K, KHORRAM KHORSHID H R, SOLEYMANI F S, et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5451-65.
- [9] SUN J K, WANG Y S, LI Y B, et al. Downregulation of PPAR γ by miR-548d-5p suppresses the adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and enhances their osteogenic potential [J]. *J Transl Med*, 2014, 12(1): 168.
- [10] ENGIN A B, ENGIN A. MicroRNAs as epigenetic regulators of obesity [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2024, 1460: 595-627.
- [11] CHEN L, CUI J, HOU J, et al. A novel negative regulator of adipogenesis: microRNA-363 [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(2): 510-20.
- [12] KIM C, LEE H, CHO M Y, et al. TNF α -induced miR-130 resulted in adipocyte dysfunction during obesity-related inflammation [J]. *Febs Lett*, 2013, 587(23): 3853-8.
- [13] LIM S, DEEVER J W, ROSA-CALDWELL M E, et al. Muscle miR-16 deletion results in impaired insulin sensitivity and contractile function in a sex-dependent manner [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2022, 322(3): E278-92.
- [14] XU K, JI M, HUANG X, et al. Differential regulatory roles of microRNAs in porcine intramuscular and subcutaneous adipocytes [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(13): 3954-62.
- [15] WU W J, LIU K K, YOU Z Y, et al. MiR-196b-3p and miR-450b-3p are key regulators of adipogenesis in porcine intramuscular and subcutaneous adipocytes [J]. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 360.
- [16] JIANG C, QIN B, LIU G, et al. MicroRNA-184 promotes differentiation of the retinal pigment epithelium by targeting the AKT2/mTOR signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32): 52340-53.
- [17] PHUA Y W, NGUYEN A, RODEN D L, et al. MicroRNA profiling of the pubertal mouse mammary gland identifies miR-184 as a candidate breast tumour suppressor gene [J]. *Breast Cancer Res*, 2015, 17(1): 83.
- [18] SUN C, LI A, WANG H, et al. Positive regulation of acetate in adipocyte differentiation and lipid deposition in obese mice [J]. *Nutrients*, 2023, 15(17): 3736.
- [19] 郑诚, 东方阳, 程蕾, 等. miR-29家族通过AKT/mTOR信号通路抑制结肠癌MC38细胞的增殖、迁移和侵袭[J]. *中国细胞生物学学报*(ZHENG C, DONGFANG Y, CHENG L, et al. miR-29 family inhibits the proliferation, migration and invasion of colon cancer MC38 cells through the AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2022, 44(5): 798-806.
- [20] WU W, SUN Y, ZHAO C, et al. Lipogenesis in myoblasts and its regulation of CTRP6 by AdipoR1/Erk/PPAR γ signaling pathway [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2016, 48(6): 509-19.
- [21] WU W J, YIN Y J, XU K, et al. Knockdown of LGALS12 inhibits porcine adipocyte adipogenesis via PKA-Erk1/2 signaling pathway [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2018, 50(10): 960-7.
- [22] 周兵勇, 黄鑫, 徐珂, 等. 可乐代替饮用水对小鼠健康的影响[J]. *中国细胞生物学学报*(ZHOU B Y, HUANG X, XU K, et al. Effects of Cola as the only drinking liquid on mice health [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2020, 42(6): 988-96.
- [23] LI Y, CHEN S, RAO H, et al. MicroRNA gets a mighty award [J]. *Adv Sci*, 2025, 12(7): e2414625.
- [24] SZCZEPANEK J, SKORUPA M, TRETYN A. MicroRNA as a potential therapeutic molecule in cancer [J]. *Cells*, 2022, 11(6): 1008.
- [25] XU P, VERNOOY S Y, GUO M, et al. The *Drosophila* microRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(9): 790-5.
- [26] ESAU C, KANG X L, PERALTA E, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(50): 52361-5.
- [27] HILTON C, NEVILLE M J, KARPE F. MicroRNAs in adipose tissue: their role in adipogenesis and obesity [J]. *Int J Obesity*, 2013, 37(3): 325-32.
- [28] ABOOBAKER A A, TOMANCAK P, PATEL N, et al. *Drosophila* microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(50): 18017-22.
- [29] RYAN D G, LAVKER R M. MicroRNA-184 is a highly enriched corneal epithelial-specific microRNA: implications for corneal epithelial homeostasis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(13): 5436.
- [30] WONG T S, LIU X B, WONG B Y H, et al. Mature miR-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9): 2588-92.
- [31] TUROVSKY L, KHESHAIBOUN G, YASSEN G, et al. miR-184 represses β -catenin and behaves as a skin tumor suppressor [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(2): 174.
- [32] CHEN L, WANG M, LIU L P. MiR-184 promotes the proliferation of ovarian granulosa cells in polycystic ovary syndrome by MAPK signaling pathway [J]. *J Clin Path Res*, 2019, 39(1): 10-7.
- [33] SCARANO W R, BEDRAT A, ALONSO-COSTA L G, et al. Exposure to an environmentally relevant phthalate mixture during prostate development induces microRNA upregulation and transcriptome modulation in rats [J]. *Toxicol Sci*, 2019, 171(1): 84-97.
- [34] YING W, ZHAO Y, HE Y, et al. Exosomal miR-184 facilitates bladder cancer progression by targeting AKR1C3 and inducing immune escape via IRF2-CXCL10 axis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2025, 1871(3): 167627.
- [35] PARK J K, PENG H, YANG W, et al. miR-184 exhibits angio-

- static properties via regulation of Akt and VEGF signaling pathways [J]. *FASEB J*, 2016, 31(1): 256-65.
- [36] STUART S, ANDRZEJ W, ANIL K J. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase [J]. *Prog Lipid Res*, 2003, 42(4): 289-317.
- [37] CHMURZYNSKA A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism [J]. *J Appl Genet*, 2006, 47(1): 39-48.
- [38] PATEL R, SANTORO A, HOFER P, et al. ATGL is a biosynthetic enzyme for fatty acid esters of hydroxy fatty acids [J]. *Nature*, 2022, 606(7916): 968-75.
- [39] RUAN H, MILES P D, LADD C M, et al. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- α : implications for insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2002, 51(11): 3176-88.
- [40] PAPA S, CHOY P M, BUBICI C. The ERK and JNK pathways in the regulation of metabolic reprogramming [J]. *Oncogene*, 2019, 38(13): 2223-40.
- [41] GARCIA D, SHAW R J. AMPK: mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance [J]. *Mol Cell*, 2017, 66(6): 789-800.
- [42] CAI H, DONG L Q, LIU F. Recent advances in adipose mTOR signaling and function: therapeutic prospects [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2016, 37(4): 303-17.
- [43] 巢明坤, 伊旭东, 庞卫军. mTOR信号通路对脂肪生成的调控作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*(CAO M K, YI X D, PANG W J. The regulation of mTOR signaling pathway on adipogenesis [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2022, 38(11): 1477-85.
- [44] WANG Y, WANG X, WANG M, et al. Bta-miR-330 promotes bovine intramuscular pre-adipocytes adipogenesis via targeting SESN3 to activate the Akt-mTOR signaling pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 275(Pt 1): 133650.
- [45] PARRILLO L, SPINELLI R, COSTANZO M, et al. Epigenetic dysregulation of the homeobox A5 (HOXA5) gene associates with subcutaneous adipocyte hypertrophy in human obesity [J]. *Cells*, 2022, 23(10): 7029-42.
- [46] HOLZMAN M A, RYCKMAN A, FINKELSTEIN T M, et al. HOXA5 participates in brown adipose tissue and epaxial skeletal muscle patterning and in brown adipocyte differentiation [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 632303.
- [47] PAN M, SUN Q, LI C, et al. Hoxa5 inhibits adipocyte proliferation through transcriptional regulation of Ccne1 and blocking JAK2/STAT3 signaling pathway in mice [J]. *Biochem Cell Biol*, 2022, 100(4): 325-37.
- [48] CHEN D, LIN Y, ZHAO N, et al. Hoxa5 inhibits the proliferation and induces adipogenic differentiation of subcutaneous preadipocytes in goats [J]. *Animals*, 2022, 12(14): 1859.
- [49] CAO W N, XU Y T, LUO D, et al. Hoxa5 promotes adipose differentiation via increasing dna methylation level and inhibiting PKA/HSL signal pathway in mice [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(3): 1023-33.