

网络出版日期:2018-01-12
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20180112.0934.004.html>

chi-miR-4110 对奶山羊 *Smad2* 基因的靶向调控作用

侯金星^{1,2},雷颖楠²,梁玉发³,安小鹏²,
宋宇轩²,曹斌云²,李云甫¹,张周¹
(1. 杨凌职业技术学院 动物工程分院,陕西杨凌 712100;2. 西北农林科技大学 动物科技学院,
陕西杨凌 712100;3. 新野县动物疾病预防控制中心,河南新野 473500)

摘 要 为揭示 chi-miR-4110 对奶山羊繁殖机能的调控作用,在前期构建的多羔(1 胎 3~5 羔)和单羔(1 胎 1 羔)关中奶山羊发情期卵巢差异表达 miRNA 文库的基础上,利用生物信息学、qRT-PCR 和 Western blot 等技术验证 chi-miR-4110 的靶基因及其对靶基因的调控作用。荧光素酶检测结果表明,chi-miR-4110 通过与 *Smad2* 基因的 3'UTR 相互作用导致荧光素酶活性降低,初步鉴定 *Smad2* 为 chi-miR-4110 的靶基因。将 chi-miR-4110 mimics 和阴性对照分别转染到奶山羊卵巢颗粒细胞中,qRT-PCR 和 Western blotting 结果表明,在奶山羊卵巢颗粒细胞中,过表达 chi-miR-4110 使 *Smad2* mRNA 以及 *Smad2* 蛋白的表达量均显著降低,表明 chi-miR-4110 在转录后水平对 *Smad2* 起负调控作用。表明 *Smad2* 是 chi-miR-4110 的靶基因,在奶山羊卵巢颗粒细胞中,chi-miR-4110 靶向调控 *Smad2* 的表达。

关键词 chi-miR-4110; *Smad2*; 双荧光素酶; 颗粒细胞

中图分类号 S814.8 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2018)01-0010-06

繁殖性状是奶山羊的重要经济性状。研究发现繁殖性状不仅受神经内分泌系统和卵巢的细胞因子所调控,而且也受到 microRNAs(miRNAs)的调控作用。miRNA 的生物合成由 RNA 聚合酶 II 启动转录,由核内核糖核酸酶 III Drosha 和其辅酶 DGCR8 将初始模板(pri-miRNA)转化为发夹样复合物(pre-miRNA)。pre-miRNA 随后被出核蛋白 5(Exportin 5)转运入细胞质内,由第二种核糖核酸酶 III Dicer 转化为约 22 nt 的成熟 miRNA^[1-3],广泛存在于动植物基因组中,与基因表达调控相关^[4-6]。它通常与靶基因 mRNA 完全或不完全匹配结合,诱导靶 mRNA 降解或阻遏其转录后翻译,影响细胞增殖、分化和凋亡,在动物繁殖过程中起至关重要的作用^[7-9]。目前在牛和羊的卵巢中发现多个 miRNA,例如 miR-204、miR-29a 和 miR-199 等^[10-12]。测序技术的发展极大地提高了 miRNA 的发现速度,多个物种的 miRNA 序列已被测定并公布^[13-14]。迄今为止,miRNA 数据库(Release 21.0,[http://www.mir-](http://www.mir-base.org/index.shtml)

[base.org/index.shtml](http://www.mir-base.org/index.shtml))中牛的成熟 miRNA 有 793 个,山羊有 436 个,猪有 411 个,绵羊有 153 个。miRNA 的表达具有发育阶段性和组织特异性,通过序列特异性的碱基配对抑制 mRNA 的翻译,在转录后水平调控基因的表达。研究发现,miRNA 在卵巢发育颗粒细胞、排卵期功能调节、性腺激素合成以及黄体化过程中发挥重要作用。研究表明,miR-93 可以促进卵巢颗粒细胞的增殖^[15];miR-378 通过调节卵丘细胞中的芳香酶基因表达,调节卵母细胞的成熟^[16]。研究人员通过基因芯片技术发现 51 个 miRNA 能抑制颗粒细胞产生雌二醇^[17]。miR-21、miR-132 和 miR-212 通过调控促黄体素的分泌影响小鼠卵母细胞的成熟和排卵^[18]。对体外培养的颗粒细胞的研究表明,miR-378 以性激素环化酶为靶点直接降低雌激素分泌^[19]。这些研究表明 miRNA 在卵泡生长发育成熟等生理过程中起重要作用。

本研究在前期构建的多羔(1 胎 3~5 羔)和单羔(1 胎 1 羔)关中奶山羊发情期卵巢差异表达

收稿日期:2017-04-10 修回日期:2017-06-16
基金项目:中国博士后科学基金(2014M560808)。
第一作者:侯金星,女,博士,讲师,从事动物遗传育种与繁殖研究。Email:houjinxingdky@163.com
通信作者:张周,男,教授,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。Email:358646697@qq.com

miRNA 文库的基础上,筛选在单羔奶山羊中显著高表达的 chi-miR-4110 并推测其参与奶山羊的繁殖过程,利用生物信息学、qRT-PCR 和 Western blot 等技术验证 chi-miR-4110 的靶基因及其对靶基因的调控作用,揭示 chi-miR-4110 对奶山羊繁殖机能的调控作用,为提高奶山羊繁殖性能提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

卵巢组织样采自杨陵上洛手村的奶山羊屠宰厂。采集时,将新鲜卵巢浸泡在灭菌后的 PBS 溶液中,放入冰盒,立即带回细胞间处理,卵巢颗粒细胞的分离参照 Peng 等^[20]的方法。

1.2 试剂及仪器

Opti-MEM I、胰蛋白酶、胎牛血清、DMEM 培养基购自 Gibco 公司,DMSO(二甲基亚砷)、TRIzol 试剂、Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司,反转录试剂盒购自 Fermentas 公司,RT-qPCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,双荧光素酶检测试剂盒购自美国 ABI 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,PCR 扩增仪购自美

国 ABI 公司,实时定量仪器购自美国 Bio-rad 公司。

1.3 细胞培养和 RNAs 提取

奶山羊卵巢颗粒细胞和人肾上皮细胞 293T 使用含 $\varphi=10\%$ 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi=0.5\%$ CO_2 的条件下培养^[21]。用 TRIzol 法提取奶山羊卵巢颗粒细胞总 RNA。用核酸定量仪检测 RNA 的质量和浓度。

1.4 *Smad2* 基因 3'UTR 片段的克隆

利用 Targetscan、miRBase、RNAhybrid 2.1 数据库预测 chi-miR-4110 的靶基因是 *Smad2*。根据 GenBank 中山羊 *Smad2* 基因 3'UTR 序列,利用 Primer 5.0 软件设计上、下游引物(表 1),在上、下游引物的 5'端加上 *Xho* I 和 *Not* I 内切酶的酶切位点,并在酶切位点前加 2~3 个保护碱基。引物由上海生物技术工程公司合成。根据引物的退火温度设置范围($56\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 63\text{ }^{\circ}\text{C}$),进行梯度 PCR 试验,筛选最适退火温度进行 PCR 扩增,并纯化回收 PCR 凝胶产物,将纯化回收的目的片段连接到 pMD19-T 连接载体上,将重组载体转入到感受态细胞(大肠杆菌 DH5 α)中涂板培养,将阳性单克隆扩大培养后,吸取 1 mL 送至上海生物技术工程有限公司测序,测序结果用 Blast 对比分析,筛选含有目的基因的阳性载体。

表 1 *Smad2* -3'UTR 的引物序列

Table 1 Primer sequence of *Smad2* -3'UTR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	PCR 产物/bp PCR production	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature
<i>Smad2</i>	F: 5'-CCGCTCGAGGATGTCTTGTTGGGCATAA-3'	207	58
	R: 5'-TTGCGGCCGCGTGGGAATAACAGATTAGGT-3'		

注:下划线的碱基为酶切位点,斜体的碱基为保护碱基。
Note:Underlined bases are cleavage site,and protective bases are italic.

1.5 双荧光素酶活性检测

将 PCR 扩增的 *Smad2* 基因 3'UTR 片段和 psiCHECK-2 载体分别进行双酶切(*Xho* I 和 *Not* I),然后将纯化回收得到的 *Smad2* -3'UTR 片段和载体 psiCHECK-2 用 T_4 连接酶连接,将重组载体转入到感受态细胞(DH5 α)中涂板培养,将阳性单克隆扩大培养后,吸取 1 mL 送至上海生物技术工程有限公司测序,测序结果用 Blast 对比分析,筛选含有目的基因的阳性载体。

取对数生长期 293T 细胞接种于 24 孔板,将 chi-miR-4110 mimics (序列 UAGCAGCA-CAGAAUGUUGGUA)或阴性对照(Negative control, NC)与构建的 psiCHECK2- *Smad2* -3'

UTR 质粒共转染 293T 细胞,转染分为 3 组,试验组 1: *Smad2* -3'UTR + chi-miR-4110 mimics (SRM);对照组 1: *Smad2* -3'UTR (SR);对照组 2: *Smad2* -3'UTR + NC(SNC)。转染步骤参照 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书进行。转染 36 h 后,用裂解缓冲液 PLB 裂解细胞并检测其荧光强度。使用多功能酶标仪测定荧光素酶的活性,每次检测试验分别进行独立的 3 次重复,用萤火虫荧光素酶活性校正海参荧光素酶活性。

1.6 *Smad2* 基因 mRNA 表达量的检测

根据 GenBank 中山羊 *Smad2* 基因的 mRNA 序列,用 Primer 5.0 设计实时定量 PCR 引物(RT-qPCR),引物信息见表 2。以 *GAPDH* 为内

参基因,用 SYBR Primer Ex Taq II (TaKaRa) 试剂盒检测 mRNA 的相对表达量。每个样品 3 个重复,反应体系为 20 μ L: 12.5 μ L Platinum RTS SYBR Super Mix, 1 μ L Forward Primer,

1 μ L Reverse Primer, 1 μ L cDNA 模板, 4.5 μ L DNAase-free dH₂O。用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法分析 *Smad2* 基因的 mRNA 相对表达量。

表 2 RT-qPCR 引物信息
Table 2 Primer sequence of RT-qPCR

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	PCR 产物/bp PCR production	退火温度/℃ Annealing temperature
<i>Smad2</i>	F: 5'- ATGTCGTCCATCTTGCCATT -3' R: 5'- TCCATTCTGCTCTCCTCCAC -3'	102	58
<i>GAPDH</i>	F: 5'-TTCCGCGGCACAGTCAAG-3' R: 5'-TACTCAGCACCAGCATCACC-3'	116	58

1.7 Western blot 检测

将 Lipofectamine 2000 分别与 chi-miR-4110 mimics、NC 和 chi-miR-4110 抑制剂 (nhibitor) 及抑制剂阳性对照物 (inhibitor NC) 混匀后,转染奶山羊卵巢颗粒细胞,转染步骤参照 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书进行,培养 48 h 后,收集细胞提取蛋白。用 SDS-PAGE 凝胶电泳对提取的蛋白进行 Western blot 检测。用凝胶图像处理系统分析目标条带,用 ImageJ2X 对其成像结果进行灰度分析。

1.8 数据分析

使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,数据以“平均值±标准差”表示,组间差异显著性标准为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 chi-miR-4110 靶基因的预测

利用生物信息学分析 chi-miR-4110 的靶基因,结果发现 chi-miR-4110 与 *Smad2* mRNA 1 706~1 727 bp 位点结合,初步确定 *Smad2* 为 chi-miR-4110 的靶基因(图 1)。

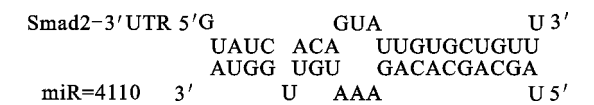


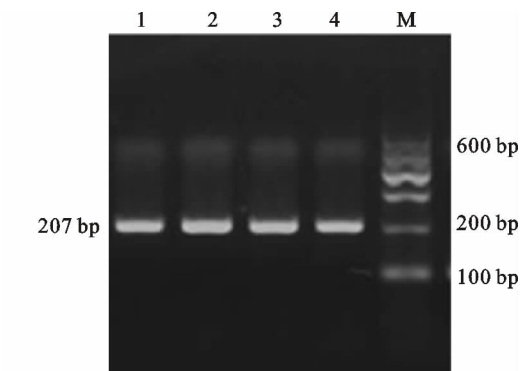
图 1 chi-miR-4110 与 *Smad2*
mRNA 1 706~1 727 bp 位点结合

Fig. 1 chi-miR-4110 binds at 1 706—1 727 bp
positions of *Smad2* mRNA

2.2 *Smad2* -3'UTR 的克隆和酶切鉴定

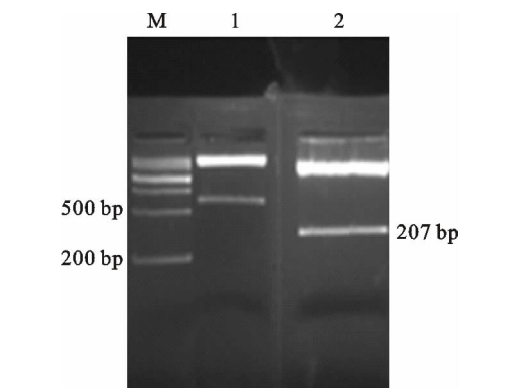
用 15 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,结果如图 2 所示,目的条带单一、清晰,且长度与目的片段一致,初步判定该 PCR 产物为目的片段,将测序结果进行 Blast 对比,结果显示,该片

段为 *Smad2* 基因的 3'UTR。将 psiCHECK-2 空载体和含有目的片段的重组载体同时进行酶切,分别可以得到大小不同的 2 个片段,其中重组载体的小片段为 207 bp,与目的片段的大小相同(图 3)。



1~4. PCR 产物 PCR products; M. DNA marker I

图 2 *Smad2* -3'UTR 的 PCR 产物
Fig. 2 PCR products of *Smad2* -3'UTR



1. Check2 载体 Check2 vector; 2. 重组载体 Recombination vector; M. DNA marker III

图 3 酶切凝胶电泳图

Fig. 3 Electrophoresis map of enzyme digestion analysis

2.3 双荧光素酶的活性

为验证 chi-miR-4110 是否能与 *Smad2* 的

3'UTR 区直接结合,试验组、对照组 1 和对照组 2 分别被转染到 293T 细胞,36 h 后收集并裂解细胞,检测其荧光素酶活性。结果显示,与对照组 1 和 2 相比,试验组的荧光素酶活性显著降低 ($P<0.05$,图 4)。表明 chi-miR-4110 可与 *Smad2* -3'UTR 作用位点相结合抑制其表达,从而导致荧光素酶的活性降低,由此可知,*Smad2* 是 chi-miR-4110 的靶基因。

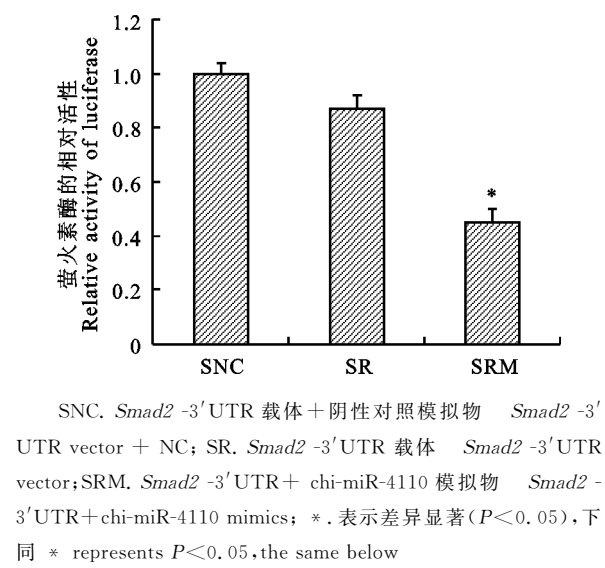


图 4 荧光素酶的相对活性
Fig. 4 Relative activity of luciferase

2.4 *Smad2* 基因 mRNA 及蛋白的表达量

将 chi-miR-4410 模拟物、NC 和 inhibitor、inhibitor NC 转染到卵巢颗粒细胞中后,提取 RNA 及蛋白。以 *GAPDH* 为内参,通过实时定量 PCR 检测 *Smad2* mRNA 在奶山羊卵巢颗粒细胞中的相对表达量。qRT-PCR 结果表明,转染 chi-miR-4110 后 *Smad2* mRNA 的表达量显著低于 NC 组 ($P<0.05$,图 5);转染 inhibitor 后 mRNA 表达水平上调,由此说明过表达 chi-miR-4110 使 *Smad2* mRNA 表达量降低。Western blot 检测 *Smad2* 蛋白的表达量,以 *GAPDH* 为内参做差异分析,结果发现转染 chi-miR-4110 后 *Smad2* 蛋白的表达量显著低于 NC 组 ($P<0.01$,图 6);转染 inhibitor 后蛋白水平显著高于 Inhibitor NC 组 ($P<0.05$),表明 chi-miR-4110 对 *Smad2* 蛋白的表达量起负调控作用。

3 讨论

卵泡在生长过程中受到多种细胞内分泌或旁分泌因子的调节,其中大部分属于转化生长因子-

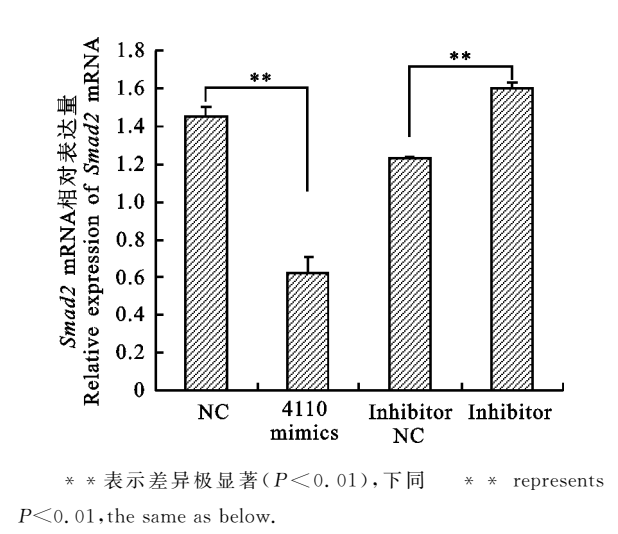
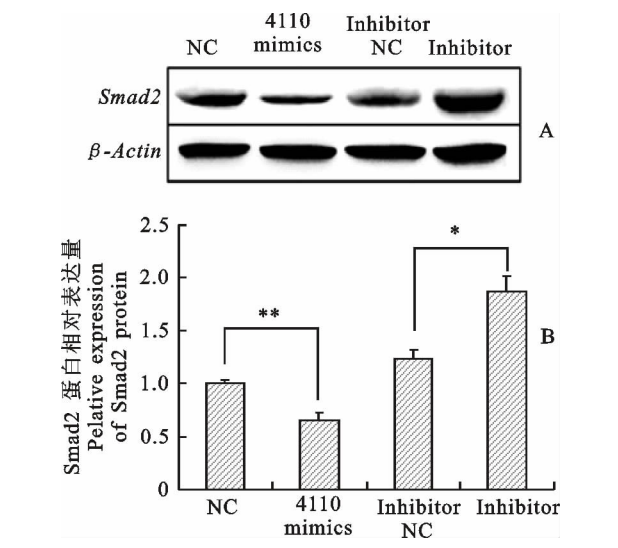


图 5 *Smad2* mRNA 的相对表达量
Fig. 5 Relative expression of *Smad2* mRNA



A. 蛋白免疫印迹杂交检测 *Smad2* 蛋白表达 *Smad2* protein were detected by western blot; B. *Smad2* 蛋白相对表达量 Relative expression of *Smad2* protein

图 6 chi-miR-4110 抑制 *Smad2* 蛋白表达
Fig. 6 chi-miR-4110 inhibits expression of *Smad2* protein

β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族。Smads 家族成员是 TGF- β 超家族的细胞内信号介质,在颗粒细胞中阶段特异性表达,能够调控颗粒细胞的增殖、凋亡以及分化,同时对正常卵母细胞的生长发育、排卵和黄体化起关键调节作用^[22]。*Smad2* 在 Smads 家族中属于受体调节型蛋白,通常情况下,*Smad2* 的表达与 TGF- β 密切相关,Smads 直接被 TGF- β I 型受体(TGF- β RI)磷酸化^[23]。*Smad2* 蛋白随着绵羊卵泡的发育,在卵泡的颗粒细胞持续表达,且腔前卵泡颗粒细胞中 *Smad2* 的表达量显著低于有腔卵泡的颗粒细

胞^[24]。研究发现,敲除雌鼠的 *Smad2* 和 *Smad3* 基因,小鼠会出现卵泡发育和排卵异常,生殖力显著下降^[25]。徐梦思等^[26]研究表明, *Smad2* 基因在梅山猪 M2 卵泡(5.0~6.9 mm)中的表达量极显著高于杜洛克, *Smad3* 和 *Smad4* 在梅山猪 M1 卵泡(1.0~3.0 mm)、M2 卵泡和 L 卵泡(7.0 mm)中的表达量分别显著和极显著高于杜洛克,揭示 TGF- β /Smad 信号通路基因在卵泡发育及成熟的过程中发挥重要作用。*Smad4* 是不同 TGF- β 信号通路配体信息传递的必需中心分子,抑制 *Smad4* 可促进猪卵泡颗粒细胞凋亡^[27],敲除 *Smad4* 基因后小鼠在胚胎期就会出现死亡^[28]。Yao 等^[29]研究发现 *Smad4* 是 miR-224 的靶基因,miR-224 的过表达能够显著降低小鼠卵巢颗粒细胞中 *Smad4* 的蛋白水平,但对 *Smad4* 基因 mRNA 水平无显著影响,表明 miR-224 是通过抑制 *Smad4* 翻译过程调控该基因的表达,此外,还揭示 miR-224/*Smad4* 可以介导 TGF- β 调控小鼠雌二醇分泌以及腔前颗粒细胞的增殖。本研究的荧光素酶检测结果表明,chi-miR-4110 通过与 *Smad2* -3'UTR 相互作用导致荧光素酶活性降低,初步鉴定 *Smad2* 为 chi-miR-4110 的靶基因。将 chi-miR-4110 mimics 和阴性对照分别转染到奶山羊卵巢颗粒细胞中,qRT-PCR 和 Western blotting 结果表明,在奶山羊卵巢颗粒细胞中,过表达 chi-miR-4110 导致 *Smad2* 基因的 mRNA 以及 *Smad2* 蛋白的表达量均显著降低,表明 chi-miR-4110 通过降解 *Smad2* 基因的 mRNA 和抑制其蛋白的翻译调控该基因的表达。

4 结论

Smad2 是 chi-miR-4110 的靶基因,在奶山羊卵巢颗粒细胞中 chi-miR-4110 靶向调控 *Smad2* 的表达。揭示 chi-miR-4110 通过 TGF- β /Smad 信号通路调控卵泡的生长发育和排卵。

参考文献 Reference:

- [1] MURCHISON E P,STEIN P,XUAN Z,*et al.* Critical roles for Dicer in the female germline [J]. *Genes & Development*, 2007,21(6):682-693.
- [2] YANG W J,YANG D D,NA S,*et al.* Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 (10): 9330-9335.
- [3] LUENSE L J,CARLETTI M Z,CHRISTENSON L K. Role of Dicer in female fertility [J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2009,20(6):265-272.
- [4] CARRINGTON J C,AMBROS V. Role of microRNAs in plant and animal development [J]. *Science*, 2003, 301(5631):336-338.
- [5] WIENHOLDS E,PLASTERK R H. MicroRNA function in animal development [J]. *FEBS Letters*, 2005, 579 (26): 5911-5922.
- [6] IMBAR T,EISENBERG I. Regulatory role of microRNAs in ovarian function [J]. *Fertility and Sterility*, 2014, 101(6):1524-1530.
- [7] AN X P,SONG Y X,HOU J X,*et al.* Identification and profiling of microRNAs in the ovaries of polytocous and monotocous goats during estrus [J]. *Theriogenology*, 2016, 85(4):769-780.
- [8] TESFAYE D,SALILEW-WONDIM D,GEBREMEDHN S,*et al.* Potential role of microRNAs in mammalian female fertility [J]. *Reproduction, Fertility and Development*, 2017,29(1):8-23.
- [9] YANG H,LIN SH,LEI X P,*et al.* Identification and profiling of microRNAs from ovary of estrous Kazakh sheep induced by nutritional status in the anestrus season [J]. *Animal Reproduction Science*, 2016,175:18-26.
- [10] NIU B,WU J,MU H,*et al.* MiR-204 regulates the proliferation of dairy goat spermatogonial stem cells via targeting to sirt1 [J]. *Rejuvenation Research*, 2016,19(2):120-130.
- [11] GEBREMEDHN S,SALILEW-WONDIM D,AHMAD I,*et al.* MicroRNA expression profile in bovine granulosa cells of preovulatory dominant and subordinate follicles during the late follicular phase of the estrous cycle [J]. *Plos One*, 2015,10(5):e0125912.
- [12] NAVAKANITWORAKUL R,HUNG W T,GUNEWAR-DENA S,*et al.* Characterization and small RNA content of extracellular vesicles in follicular fluid of developing bovine antral follicles [J]. *Scientific Reports*, 2016,6:25486.
- [13] 魏欢,李仲文,沈清武. 小鼠 miR-151-3p 靶基因筛选和鉴定[J]. 西北农业学报, 2014,23(5):23-31.
- [14] WEI H,LI ZH W,SHEN Q W. Screen and identify the target genes of mir-151-3p in mice [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2014,23(5):23-31.
- [15] WICK Z,GAJEWSKA M,MAJEWSKA A,*et al.* Characterization of microRNA profile in mammary tissue of dairy and beef breed heifers [J]. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2016,133(1):31-42.
- [16] JIANG L L,YANG D,HUANG J. MicroRNA-93 promotes ovarian granulosa cells proliferation through targeting CDKN1A in polycystic ovarian syndrome [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2015,100(5):E729-E738.
- [17] PAN B,TOMS D,SHEN W,*et al.* MicroRNA-378 regulates oocyte maturation via the suppression of aromatase in porcine cumulus cells [J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2015,308(6):E525-E534.
- [18] SIROTKIN AV,OVCHARENKO D,GROSSMANN R,*et al.* Identification of microRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2009,219(2):415-420.
- [19] CHRISTENSON L K. MicroRNA control of ovarian function [J]. *Animal Reproduction*, 2010,7(3):129-133.
- [20] XU S Y,LINHER-MELVILLE K,YANG B B,*et al.* MiR-378 regulates ovarian estradiol production by targeting aromatase [J]. *Endocrinology*, 2011,152(10):3941-3951.
- [21] PENG J Y,GAO K X,XIN H Y,*et al.* Molecular cloning, expression analysis, and function of decorin in goat ovarian

granulosa cells [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 2016,57:108-116.

[21] PENG J Y,XIN H Y,HAN P,*et al.* Expression and regu-
lative function of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in
the goat ovary and its role in cultured granulosa cells [J].
Molecular and Cellular Endocrinology, 2015, 412 (9):
104-115.

[22] XU J,OAKLEY J,MCGEE E A. Stage-specific expression
of *Smad2* and *Smad3* during folliculogenesis1 [J]. *Biology
of Reproduction*, 2001,66(6):1571-1578.

[23] WOTTON D,LO R S,LEE S,*et al.* A *Smad* transcription-
al corepressor [J]. *Cell*,1999,97(1):29-39.

[24] 常 迪,董晓晨,郭 勇,等. *TGF-βR I* 及 *Smad2* 表达情
况对绵羊腔前卵泡发育的影响[J]. 中国农学通报,2016,
32(32):7-14.
CHANG D,DONG X CH, GUO Y, *et al.* Expression of
TGF-β R I and *Smad2* affecting the development of sheep
preantral follicles [J]. *Chinese Agricultural Science Bulle-
tin*, 2016, 32(32):7-14.

[25] LI Q,PANGAS S A,JORGEZ C J,*et al.* Redundant roles
of SMAD2 and SMAD3 in ovarian granulosa cells in vivo
[J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2008,28(23):7001.

[26] 徐梦思,黄 涛,刘丽娟,等. *TGFβ-SMAD* 信号通路基因
在梅山猪与杜洛克猪不同级别卵泡中的表达分析 [J].
家畜生态学报,2016,37(2):14-17.
XU M S,HUANG T,LIU L J, *et al.* Expression patterns
of genes *TGFβ-SMAD* signalling pathway in Meishan and
Duros follicle of different sizes [J]. *Journal of Domestic
Animal Ecology*, 2016,37(2):14-17.

[27] 刘吉英. *MiR-26b* 靶向 *Smad4* 调控猪卵泡颗粒细胞凋亡
的分子机制 [D]. 南京:南京农业大学,2013.
LIU J Y. The molecule mechanism of *miR-26b* regulates
apoptosis of porcine ovarian granulasa cells by targenting
Smad4 [D]. Nanjing:Nanjing University,2013.

[28] PANGAS S A. Bone morphogenetic protein signaling tran-
scription factor (SMAD) function in granulosa cells [J].
Molecular & Cellular Endocrinology, 2012,356(1/2):40-47.

[29] YAO G, YIN M, LIAN J, *et al.* MicroRNA-224 is involved
in transforming growth factor-beta-mediated mouse granu-
losa cell proliferation and granulosa cell function by targe-
ting *Smad4* [J]. *Molecular Endocrinology*, 2010, 24 (3):
540-551.

Regulation Function of chi-miR-4110 on *Smad2* Gene in Dairy Goats

HOU Jinxing¹, LEI Yingnan², LIANG Yufa³, AN Xiaopeng²,
SONG Yuxuan², CAO Binyun², LI Yunpu¹ and ZHANG Zhou¹

(1. Animal Engineering Branch, Yangling Vocational & Technical College, Yangling Shaanxi 712100, China;
2. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China;
3. Xinye County Animal Disease Prevention and Control Center, Xinye Henan 473500, China)

Abstract In order to explore regulation function of chi-miR-4110 in reproductive process of dairy goats, the bioinformatics analysis, qRT-PCR and western blot were used to predicate target gene of chi-miR-4110, and to verify the regulation function of chi-miR-4110 on targets based on deferentially expressed miRNA library of oestrual ovarian tissues from polytocous (3-5 kids/parity) and monoto-
cous (1 kids/parity) Guangzhong (GZ) dairy goats. The luciferase analysis showed that chi-miR-4110 bound to the 3' untranslated regions (UTR) of *Smad2* gene and inhibited the expression of luciferase. *Smad2* could be the target gene of chi-miR-4110. The chi-miR-4110 mimics and negative control were transfected into ovarian granulosa cells of dairy goat, respectively, and then the mRNA and protein ex-
pression of *Smad2* were detected by qRT-PCR and western blotting. The result showed that overex-
pressed chi-miR-4110 significantly decreased the expression of *Smad2* gene at mRNA and protein lev-
els. It showed that chi-miR-4110 was a negative regulation factor of *Smad2* gene at post transcriptional
level. These results suggested that *Smad2* is the target gene of chi-miR-4110 and inhibit the expression
of *Smad2* gene in ovarian granulosa cells of dairy goats.

Key words chi-miR-4110; *Smad2*; Luciferase; Granulosa cells

Received 2017-04-10 **Returned** 2017-06-16
Foundation item China Postdoctoral Science Foundation (No. 2014M560808).
First author HOU Jinxing, female, Ph. D, lecturer. Research area: animal genetics breeding and repro-
duction. E-mail: houjinxingdky@163.com
Corresponding author ZHANG Zhou, male, professor. Research area: animal genetics breeding and re-
production. E-mail: 358646697@qq.com

(责任编辑:顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)