



circPRKAA2通过调控 miR-22-3p/SLC27A1 轴对 奶牛乳脂合成的影响

王川川^{1,2}, 陈亚飞^{1,2}, 田佳³, 冯小芳⁴, 佟丽佳^{1,2}, 王华^{1,2}, 雪林^{1,2}, 顾亚玲^{1,2},
张娟^{1,2*}

(1. 宁夏大学动物科技学院, 银川 750021; 2. 宁夏回族自治区反刍动物分子细胞育种重点实验室, 银川 750021;
3. 宁夏回族自治区畜牧工作站, 银川 750021; 4. 西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730030)

摘要: 旨在通过对影响乳脂合成相关的 DE-circ RNAs 进行深入分析, 探究其构建的分子网络对奶牛乳脂合成的影响。本研究利用前期构建的高、低乳脂率荷斯坦奶牛 circRNA 的文库和转录组测序数据, 筛选并鉴定出的与乳脂合成相关的 DE-circ RNAs (circPRKAA2), 进一步使用 Targetscan 和 miRanda 软件预测其 ceRNA 调控网络, 并利用实时荧光定量、RNA pull down 和双荧光素酶报告试验等分子实验技术进行靶向关系验证, 结合油红 O 和 BODIPY 染色探索靶 miRNA 对奶牛乳腺上皮细胞 (bovine mammary epithelial cells, BMECs) 脂滴分泌的影响。结果表明, 成功预测并验证了 ceRNA (circPRKAA2/miR-22-3p/SLC27A1) 网络的调控关系, 预测得到 9 个 miRNA 及 10 个候选 mRNA, 验证了 miR-22-3p 为其关键枢纽, 并探明了 circPRKAA2 和 miR-22-3p 主要分布于 BMECs 的细胞质中。circPRKAA2 在 BMECs 内参与乳脂合成的过程中对 miR-22-3p 进行负调控。miR-22-3p 抑制 BMECs 中脂滴的分泌、甘油三酯和胆固醇的生成, 并对 SLC27A1 进行负调控。综上所述, 本研究分析验证了 circPRKAA2/miR-22-3p/SLC27A1 的靶向关系及对乳脂合成的调控作用, 以期改善牛奶品质提供新的见解。

关键词: 荷斯坦奶牛; SLC27A1; miR-22-3p; circPRKAA2; 乳脂

中图分类号: S823.8

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-0740-13

Effect of circPRKAA2 on Milk Fat Synthesis in Dairy Cows via the miR-22-3p/ SLC27A1 Axis

WANG Chuanchuan^{1,2}, CHEN Yafei^{1,2}, TIAN Jia³, FENG Xiaofang⁴, TONG Lijia^{1,2}, WANG Hua^{1,2},
XUE Lin^{1,2}, GU Yaling^{1,2}, ZHANG Juan^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;
2. Ningxia Hui Autonomous Region Key Laboratory of Molecular Cell Breeding, Yinchuan 750021, China;
3. Ningxia Hui Autonomous Region Animal Husbandry Workstation, Yinchuan 750021, China;
4. College of Life Sciences and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730030, China)

Abstract: The aim of this study was to explore the impact of molecular networks constructed by DE-circRNAs related to milk fat synthesis on milk fat synthesis in dairy cows through in-depth analysis. In this study, we used the circRNA library and transcriptome sequencing data of Holstein dairy cows

收稿日期: 2025-07-04

基金项目: 宁夏地区奶牛分子育种液相芯片研发及基因组大数据分析平台构建(2023BCF01004); 宁夏自治区青年拔尖人才培养工程项目

作者简介: 王川川, 博士生, 主要从事动物遗传育种研究, E-mail: abc2667234769@163.com

* 通信作者: 张娟, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: zhangjuannxy@nxu.edu.cn

with high and low milk fat percentage constructed previously to screen and identify DE-circ RNAs (circPRKAA2) related to milk fat synthesis, and further predicted their ceRNA regulatory network using Targetscan and miRanda software. Real-time fluorescence quantitative PCR, RNA pull down assay and dual luciferase reporter assay were used to verify the targeting relationship. Oil red O and BODIPY staining were used to investigate the effect of target miRNA on lipid droplet secretion in BMECs. The results indicated that the regulatory relationship of the ceRNA (circPRKAA2/miR-22-3p/*SLC27A1*) network was successfully predicted and verified, and 9 miRNAs and 10 candidate mRNAs were predicted, and it was clarified that circPRKAA2 and miR-22-3p were mainly distributed in the cytoplasm of BMECs. circPRKAA2 negatively regulated miR-22-3p during the process of milk fat synthesis in BMECs. miR-22-3p inhibited the secretion of lipid droplets, the production of triglycerides and cholesterol in BMECs, and negatively regulated *SLC27A1*. In conclusion, this study analyzed and verified the targeting relationship of circPRKAA2/miR-22-3p/*SLC27A1* and its regulatory effect on milk fat synthesis, with the hope of providing new insights for improving milk quality.

Keywords: Holstein cow; *SLC27A1*; miR-22-3p; circPRKAA2; milk fat

* **Corresponding author:** ZHANG Juan, E-mail: zhangjuannxy@nxu.edu.cn

乳脂是一种高质量的天然脂肪,不仅是影响牛奶品质的关键因素,也是反刍动物育种的主要目标性状^[1]。牛奶中的乳脂富含各类有益脂肪酸,并主要以乳脂球(milk fat globule, MFG)形式存在,而包裹在乳脂球外的乳脂球膜(milk fat globule membrane, MFGM)是牛奶中最重要的生物活性成分之一^[2-3],在机体免疫^[3-4]和新陈代谢^[5]等方面发挥重要作用,而低乳脂率意味着牛奶中的MFG和MFGM含量较少,这也会影响消费者对乳制品的消费。

乳脂的调控涉及多个基因、网络调控和信号转导^[6]。有研究表明, circRNA通过与竞争性内源RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)网络中的miRNA间接作用于乳脂合成相关基因,从而对转录产生积极影响^[6]。circRNA也可以调节乳腺上皮细胞的增殖、分化和凋亡等重要过程,也被认为是调控脂肪酸合成的重要转录调节因子^[7]。在山羊乳腺组织中, circRNA8220海绵吸附miR-8516增加糖蛋白激素水平,激活Ras/MEK/ERK通路,从而促进乳腺上皮细胞的增殖并抑制细胞凋亡,也可以通过 β CTC2上调STC2激活PI3K/AKT/mTOR通路并增强 β -酪蛋白和甘油三酯的合成^[8]。Ding等^[9]通过全转录组测序,发现并确定了与猪肌肉脂肪生成有关的基因,构建了在猪肌肉脂肪(intramuscular fat, IMF)沉积调控中发挥关键作用的ceRNA调控网络。Wu等^[10]研究发现, circPPAR γ 通过海绵miR-92a-3p调节成脂分化。Liu等^[11]研究发现,

circ-016910海绵吸附miR-574-5p通过MAPK和PI3K/KT-mTOR信号通路调控并促进山羊乳腺上皮细胞 β -酪蛋白和甘油三酯的分泌,同时对山羊乳腺上皮细胞具有增殖和抗凋亡的作用。

miRNA是一类内源性非编码RNA^[12],通过碱基互补配对来控制靶标的表达,并被认为在转录后进行调节靶标^[13]。近年来,大多研究发现miRNA都调节关键的细胞过程,包括增殖、分化和凋亡等^[14-15]。牛奶的产量在很大程度上取决于上皮细胞的数量及其分泌活性。因此,miRNA对乳腺上皮细胞的影响非常重要。研究表明, *LATS2*的另一个上游调节因子是miR-497,它能抑制牛乳腺上皮细胞中甘油三酯和不饱和脂肪酸的产生^[16]。根据Chen等^[17]的研究,将miR-16a模拟物引入牛乳腺上皮细胞,能够通过靶向*LATS1*破坏脂肪代谢。然而,目前需要全面鉴定参与乳脂合成的关键circRNA和miRNA,为揭示荷斯坦奶牛乳脂作用的调控机制奠定基础。

基于此,本研究利用前期构建的高、低乳脂率荷斯坦奶牛circRNA的文库和转录组测序数据,筛选并鉴定出的与乳脂合成相关的DE-circ RNAs (circPRKAA2),预测ceRNA调控网络,并利用分子试验技术进行靶向关系验证,探索靶miRNA对奶牛乳腺上皮细胞(bovine mammary epithelial cells, BMECs)脂滴分泌的影响,借此揭示circPRKAA2对荷斯坦奶牛乳脂的作用调控机制,从而为提高荷斯坦奶牛乳脂率的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 预测 circPRKAA2 靶向的 miRNA 及其靶基因预测

本研究前期构建了高、低乳脂率荷斯坦奶牛 circRNAs 的文库,经过转录组测序筛选并鉴定出了与乳脂合成相关的 DE-circRNAs (circPRKAA2),并已进行了 circPRKAA2 真实性验证^[18-19]。进一步通过 Targetscan 和 miRanda 预测 circRNA 的靶向 miRNAs,以 Targetscan 软件中的 Context+ 和 miranda 软件中 Free Energy 值为标准,以 Context+ ≤ -0.20 和 Free Energy ≤ -20 为标准筛选高分靶 miRNAs。接着通过 Targetscan 和 miRanda 预测 miR-22-3p 的靶基因,分别以 Context+ ≤ -0.30 和 Free Energy ≤ -30 为标准筛选高分靶基因,筛选评分前 10 个与乳脂合成相关的靶基因。

1.2 细胞的培养

BMECs 来自课题组前期分离、培养并冻存。本研究在 20% 的完全培养基中进行培养,主要包括 DMEM/F12 (BI, Jerusalem, 以色列)、20% 胎牛血清 (Gibco, 美国) 和 1% 青霉素/链霉素 (索莱宝, 北京)。诱导培养基在 20% 完全培养基的基础上添加

5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胰岛素 (MCE, 美国), 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氢化可的松 (MCE, 美国) 和 20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 催乳素 (ProSpec, 以色列)。HEK-293T 细胞来自课题组前期购买,其在含有 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的高糖 DMEM (Gibco, 美国) 中培养。细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及湿度适宜的培养箱中进行培养。每 48 h 更换一次培养基。根据试剂说明,使用 Lipofectamine 3000 (Invitrogen, 美国) 对质粒进行转染,48 h 后收集细胞用于进一步分析,每次处理采用 3 个生物学重复。

1.3 载体构建与细胞转染

构建双荧光素酶报告所需 circPRKAA2 的野生型和突变型载体,miR-22-3p 的模拟物, circPRKAA2 的野生型和突变型载体以及其他 miRNA 模拟物均交由西安擎科生物科技有限公司合成 (表 1)。将 HEK-293 T 复苏并稳定传至 3~4 代后接种至培养板,当细胞汇合度达到 70%~80% 时,将 circPRKAA2 的野生型和突变型载体分别与 miRNA 模拟物 (miR-22-3p mimic: AAGCUGCCAGUUGAAGAAGCUG; miR-22-3p inhibitor: CAGUUCUUCAACUGGCAGCUU) 共转染,转染 48 h 后,进行双荧光素酶报告试验 (Promega, 美国)。

表 1 野生型和突变型载体序列

Table 1 Wild-type and mutant vectors sequence

名称 Name	序列 (5'→3') Sequence
pmirGLO-circPRKAA2-WT	TTTGATTATCTAACATGATGTCAGATGGTGAATTTCTGCGAACTAGCTGCGG- ATCCCCAAATTATGCAGCACCTGAAGTCATCTCAGGCAGCTGTATGC AGGTC - CTGAAGTGGATATCTGGAGCTGCGGTGTTATTTTGTATGCTCTTCTTTGTGG - CACCTCCCATTTGATGATGAGCATGTGCCTACGCTGTTTAAGAAGATCC
pmirGLO-circPRKAA2-MUT	TTTGATTATCTAACATGATGTCAGATGGTGAATTTCTGCGAACTAGCTGCGG- ATCCCCAAATTATGCAGCACCTGAAGTCATCTCAGGCAGCTGTATGCT CCAG - GAGAAGTGGATATCTGGAGCTGCGGTGTTATTTTGTATGCTCTTCTTTGTG - GCACCTCCCATTTGATGATGAGCATGTGCCTACGCTGTTTAAGAAGATCC
SLC27A1-3'UTR-WT	ATCCCGAGACCACCCCGCCAGGACAGCCCGGACCTTCCCATCAGCTTCGTCGG- TGGCTCATCCCAGACACCCATCGGTGGGGCTGGCCACCGAGACTGCCCCCGT- CCCTCCCTCTGGCAGCACCGCCCG GCACT AGAACAGCAAGGCCAGTAGCAA- ATGACCCCGTGCTGTTTCGCATGGGCCTTTTCAAGCACTGAGGTTTTGTTTC- CTCGTTGAGTTTAAGAAATAAACCTGCAGAGCGTCTGGTGCCTG
SLC27A1-3'UTR-MUT	ATCCCGAGACCACCCCGCCAGGACAGCCCGGACCTTCCCATCAGCTTCGTCGG- TGGCTCATCCCAGACACCCATCGGTGGGGCTGGCCACCGAGACTGCCCCCG- TCCCTCCCTCTGGCAGCACCGCCCG TAGTAC AGAACAGCAAGGCCAGTAGCAA- AATGACCCCGTGCTGTTTCGCATGGGCCTTTTCAAGCACTGAGGTTTTGTT- TCCTCGTTGAGTTTAAGAAATAAACCTGCAGAGCGTCTGGTGCCTG

1.4 RNA的提取及实时荧光定量检测

当培养的BMECs融合度达到90%以上时,使用Cytoplasmic & Nuclear RNA Purification Kit试剂盒(NORGREN,加拿大)提取BMECs的细胞质和细胞核RNA。以*U6*为细胞核的内参,*GAPDH*为细胞质的内参,接着进行RT-qPCR检测。使用Trizol提取细胞中的总RNA,利用逆转录试剂盒(TaKaRa,中国)合成cDNA。miRNA采用茎环法设计逆转录和特异性引物,mRNA使用Primer

Premier 6设计。以*U6*和*GAPDH*分别作为miRNA和mRNA的内参,使用2×Universal SYBR Green Fast qPCR Mix试剂盒(ABclonal,中国)进行定量检测。利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对基因的相对表达水平进行分析,qPCR引物的详细信息见表2。qRT-PCR反应体系:ddH₂O 8 μL,2×Universal SYBR Green Fast qPCR Mix 10 μL,cDNA 1 μL,上、下游引物各0.5 μL。qRT-PCR反应程序:95℃预变性30 s;95℃变性5 s,退火30 s,60℃延伸5 s,40个循环。

表2 引物序列

Table 2 Primers sequence

基因 Gene	登录号 Accession number	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物长度/bp Products length
<i>GAPDH</i>	NM_001034034.2	F: TCGGAGTGAACGGATTCGG R: TGATGACGAGCTTCCCGTTC	192
<i>E2F2</i>	XM_024982675.2	F: AGTGAGTCTGAGGATGGGGTTCTG R: CCTTCTTGCGGATGAGCTGGATG	121
<i>NR3C1</i>	NM_001206634.1	F: AGTTCTCCTCCATCCAGTTCCTCAG R: TGCTGTCTTCCACTGCTCTTTTG	149
<i>ELOVL6</i>	NM_001102155.1	F: GCAAAGCACCCGAAGTAGGAGATC R: CCAGGAGTACAGAAGCACAGTGAG	104
<i>SLC27A1</i>	NM_001033625.2	F: CAGATGTGGCTGTGTATGGAGTGG R: CAGTTCCTCGTACAGTGCGTTGG	113
<i>KAT5</i>	NM_001192066.2	F: CGGAACCAGGACAACGAAGATGAG R: TCACCCATTCATCCAGGCGTTTG	124
<i>PIK3R6</i>	XM_024980100.2	F: CAGCCAACATCCAGATCCAGAGC R: GCAACCTCGAACCTGACCACATC	103
<i>MFGE8</i>	NM_176610.1	F: GCGAGTCACGGGCATCATCAC R: CAGTCCAGGTCACACCATCATCAC	104
<i>SYNE1</i>	XM_024997066.2	F: CTTCTGCTGACGAAGTGGACACC R: GGACCTGCTATGTGGACTGTTGAC	140
<i>TMEM43</i>	NM_001102480.1	F: GGGCAGGTGAAGACGGAGAGG R: GGCTGTTGCGGTGAACGACTC	133
<i>ADCY5</i>	NM_001192069.1	F: TGTCTGGTCTAACGATGTC R: CGATACTGTGCTCCTTGA	164
<i>U6</i>		F: CTCGCTTCGGCAGCAC R: AACGCTTCACGAATTTGCGT	
circPRKAA2		F: GTTCTGTTGCTACTCTCCT R: TCACCTGGTATCTTATGTC	
miR-22-3p		F: ACTCCGGAAAGCTGCCAGTTG RT: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACCAGTTC	
Universal reverse primer		ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG	

1.5 RNA pull down和双荧光素酶报告试验

设计一种生物素化探针特异性识别 circPRKAA2, Lacz 探针用作对照, 收集 4×10^7 个乳腺上皮细胞, 用冰冷的 PBS 洗涤, 在裂解缓冲液中裂解处理。将细胞提取物与生物素化探针混合, 并将洗涤好的磁珠添加至结合反应中杂交, 将生物素偶联的 RNA 复合物拉下来, 并用裂解缓冲液洗涤磁珠, 并纯化提取 RNA 混合物, 进一步通过 RT-qPCR 进行分析。合成 RNA pull down 试验所需 circPRKAA2 的生物素探针 (circPRKAA2 probe sequence: AATCTGTTGGAGTGCTGATCACC-TGGTATCTTATGTCTTTGATAGTTGCTCG-TTTCAG) 和 lacz probe 探针 (lacz probe sequence: TGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTC-GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGAT-GT), 通过 RT-qPCR 检测下拉的 miR-22-3p 表达水平。将 293T 细胞接种于 12 孔板, 当细胞密度达到 70%~80% 时, 转染 48 h 后用 PBS 清洗细胞, 加入 200 μ L 细胞裂解液, 室温条件下置于摇床 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下轻缓摇动培养板 15 min。使用离心机 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 s 后, 在 96 孔板中加入 20 μ L 细胞裂解液, 再将 50 μ L LAR II 加入混匀, 使用酶标仪检测萤火虫荧光素酶的活性, 记录为 X 值。最后每孔加入 50 μ L Stop&Glo, 检测海肾荧光素酶的活性, 记录为 Y 值, 计算 X/Y 的比值即 Luc 值。

1.6 BODIPY 染色

细胞转染 48 h 后, 用 PBS 清洗细胞, 加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 弃去固定液并清洗后, 每孔细胞添加 800 μ L 的 BODIPY (5 μ mol) 工作液 (Thermo Fisher Scientific, 美国), 室温避光染色 30 min 后弃去染色液, 并用 PBS 清洗 3 次, 用 DAPI 染核 15 min, 清洗后于荧光显微镜下进行成像观察, 并拍照记录。

1.7 油红 O 染色

油红 O 试剂购自索莱宝 (索莱宝, 中国), 将转染后的细胞用 PBS 清洗两次, 加入固定液固定 30 min, 弃去后用 60% 异丙醇浸润 5 min, 使用 ORO Stain 染色 15 min 后弃去加入清洗。加入苏木素染色液, 复染细胞核 3 min, 弃去染液并水洗 3 次。加入 ORO Buffer 1 min 弃去, 在显微镜下拍照。

1.8 甘油三酯和胆固醇含量测定

选择生长状况良好的 BMECs 接种在 6 孔细胞

培养板中进行培养, 待单层细胞融合度达 70% 时进行转染, 每个样本 3 个生物学重复。48 h 后用 PBS 进行清洗, 在 1.5 mL 离心管中使用裂解液对细胞沉淀进行裂解, 离心收集上清液。取 10 μ L 的上清液与工作液混合, 用酶标仪在 550 nm 测定各孔的 OD 值。另取 10 μ L 的上清液进行 BCA 蛋白浓度测定。最后, 以每 mg 标准品蛋白浓度校正甘油三酯或胆固醇的含量 (普利莱, 中国)。

1.9 数据分析

利用 SPSS 开展单因素方差分析 (ANOVA), 并对各组间进行差异分析, “*”表示 $P < 0.05$, “**”表示 $P < 0.01$, “***”表示 $P < 0.001$ 。采用 GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) 进行作图。

2 结果

2.1 ceRNA 网络构建

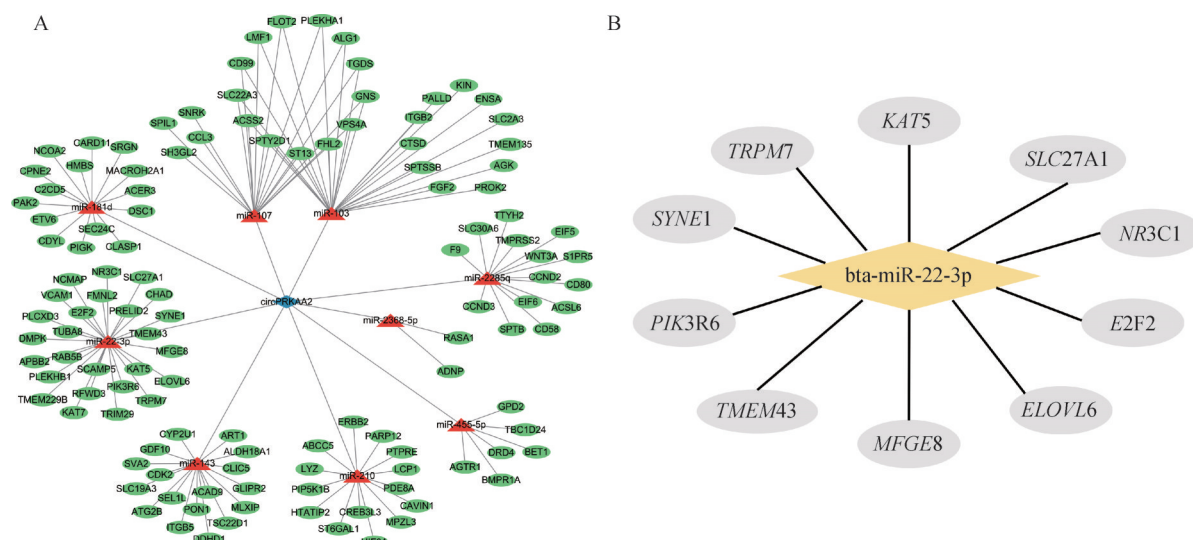
对前期研究得到的与乳脂合成相关的差异 circPRKAA2 进行 ceRNA 调控网络预测^[20]。利用 Targetscan 和 miRanda 软件预测与 circPRKAA2 具有相互作用的 miRNA (图 1A)。再以 $\text{Context}+ \leq -0.20$ 和 $\text{FreeEnergy} \leq -20$ 为标准筛选高分靶基因。最终构建了 circPRKAA2-miRNA-mRNA 互作调控网络 (图 1B)。结果表明, 该网络中共有 9 个 miRNA 被预测。其中 miR-22-3p 被预测的靶基因主要有: *KAT5*、*TRPM7*、*SYNE1*、*PIK3R6*、*TMEM43*、*ELOVL6*、*E2F2*、*NR3C1*、*SLC27A1* 和 *MFGE8*。其中有与调控脂代谢相关基因 *ELOVL6*、*E2F2* 和 *SLC27A1*。推测 circPRKAA2-miR-22-3p-mRNA 在乳脂合成中发挥重要的调控作用, 并用于进一步的研究。

2.2 circPRKAA2 的亚细胞定位

对 circPRKAA2 和 miR-22-3p 进行亚细胞定位, 如图 2 所示, *U6* 在细胞核中的表达量多于在细胞质中的表达量, 占核质表达量的 70% 以上。而 *GAPDH*、bta-miR-22-3p 和 circPRKAA2 在细胞质中的表达量均高于在细胞核中的表达量, 并分别超过占核质表达量的 60%、95% 和 60%。鉴于 circRNA 主要在细胞质中富集, 推测其可以作为高效的 miRNA 海绵, 从而抑制 miRNA 的表达。

2.3 circPRKAA2 海绵吸附 miR-22-3p

本研究设计了特定生物素标记的 circRNA 探针和 Lacz 对照探针, 首先验证了在 BMECs 中



A. 预测并构建 circPRKAA2 的 ceRNA 网络; B. bta-miR-22-3p 的靶基因预测

A. Predict and construct the ceRNA network of circPRKAA2; B. Prediction of target genes of bta-miR-22-3p

图 1 circPRKAA2 的共表达网络分析

Fig. 1 Analysis of the co-expression network of circPRKAA

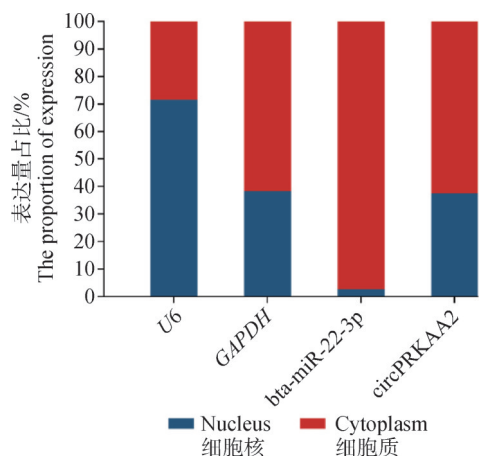


图 2 核质分离后的基因核质表达谱

Fig. 2 Gene nuclear-cytoplasmic expression profile after nuclear-cytoplasmic separation

circPRKAA2 探针的下拉效率。接着利用 RT-qPCR 检测 circPRKAA2 探针下拉海绵复合物中 miR-22-3p 的富集。结果发现, circPRKAA2 探针能够极显著下拉 miR-22-3p ($P < 0.01$) (图 3A 和 B)。进一步利用双荧光素酶报告试验确定 circPRKAA2 与 miR-22-3p 是否存在靶向结合关系, 结果显示, miR-22-3p mimic 和 circPRKAA2-WT 共转染组的双荧光素酶活性极显著低于 NC 和 circPRKAA2-WT 的共转染组 ($P < 0.001$), 而 miR-22-3p mimic 和 circPRKAA2-MUT、NC 和 circPRKAA2-MUT 这两对共转染组的双荧光素酶活性基本一致(图 3C

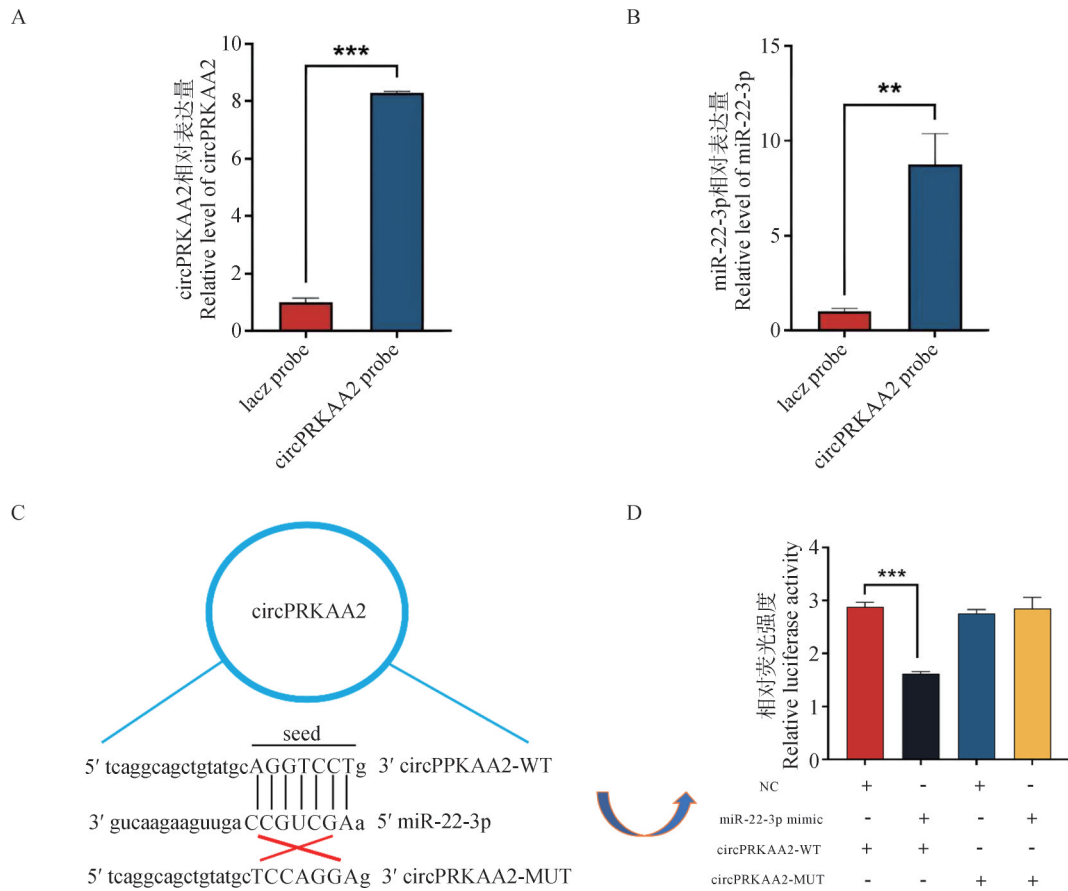
和 D)。表明 circPRKAA2 和 miR-22-3p 具有靶向结合关系。

2.4 miR-22-3p 抑制甘油三酯和胆固醇的合成

合成 miR-22-3p mimic、miR-22-3p inhibitor 及 NC 转染 BMECs 48 h 后。通过 qRT-PCR 对其相对表达量进行检测。结果显示, miR-22-3p mimic 的表达水平极显著高于 NC mimic 组 ($P < 0.001$), 而 miR-22-3p inhibitor 表达极显著被抑制 ($P < 0.001$) (图 4A 和 B)。表明通过转染 miR-22-3p mimic、inhibitor 可极显著影响 miR-22-3p 在 BMECs 中的表达水平 ($P < 0.001$)。甘油三酯在乳脂中的含量高达 98%, 通过测定转染后细胞内甘油三酯含量的变化来研究 miR-22-3p 对 BMECs 中甘油三酯的合成影响。结果显示, 转染 miR-22-3p mimic 的 BMECs 中甘油三酯的水平极显著降低 ($P < 0.001$), 而转染 miR-22-3p inhibitor 后 BMECs 中甘油三酯的水平极显著升高 ($P < 0.001$) (图 4C)。而 miR-22-3p 对胆固醇的影响和甘油三酯的变化趋势一致 (图 4D)。上述结果表明, miR-22-3p 能够抑制甘油三酯和胆固醇的生成。

2.5 miR-22-3p 抑制 BMECs 中脂滴的合成

为研究 miR-22-3p 在 BMECs 在脂质代谢中的作用, 本研究将 miR-22-3p 的 NC mimic、mimic、NC inhibitor 和 inhibitor 分别转染至 BMECs 中进行 BODIPY 和油红 O 检测。BODIPY 结果表明, miR-

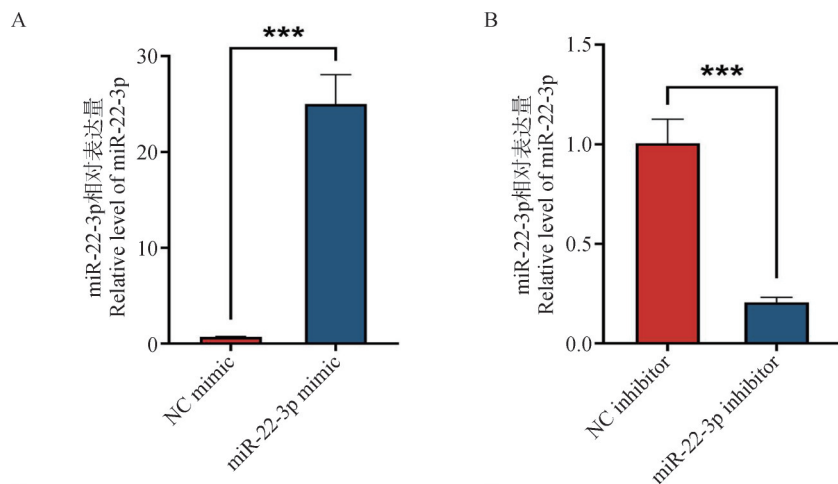


A. 使用特定生物素标记的 circPRKAA2 探针成功捕获相对于对照探针组 (Lacz) 的 circPRKAA2; B. circPRKAA2 探针对潜在候选靶 miR-22-3p 的下拉作用; C. circPRKAA2 靶向 miR-22-3p 的 WT 和 MUT 序列示意图; D. circPRKAA2 与 miR-22-3p 共转染双荧光素酶报告基因检测结果。*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, 下同

A. Successfully captured circPRKAA2 relative to the control probe group (Lacz) using a specific biotin-labeled circPRKAA2 probe; B. The pull-down effect of circPRKAA2 probe on the potential candidate target miR-22-3p; C. Schematic diagram of WT and MUT sequences of circPRKAA2 targeting miR-22-3p; D. Results of the dual-luciferase reporter gene assay for co-transfection of circPRKAA2 and miR-22-3p. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, the same as below

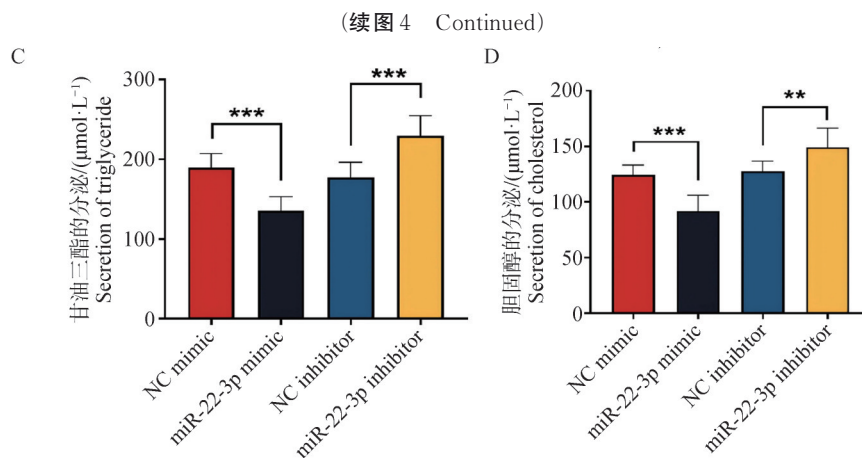
图3 circPRKAA2与miR-22-3p的靶向关系验证

Fig. 3 Targeting relationship between circPRKAA2 and miR-22-3p



(图4 Fig.4)

(转下页 Carried forward)



A. miR-22-3p mimic 转染效率检测; B. miR-22-3p inhibitor 转染效率检测; C. 转染 miR-22-3p mimic 和 miR-22-3p inhibitor 对 BMECs 甘油三酯分泌的影响; D. 转染 miR-22-3p mimic 和 miR-22-3p inhibitor 对 BMECs 胆固醇分泌的影响

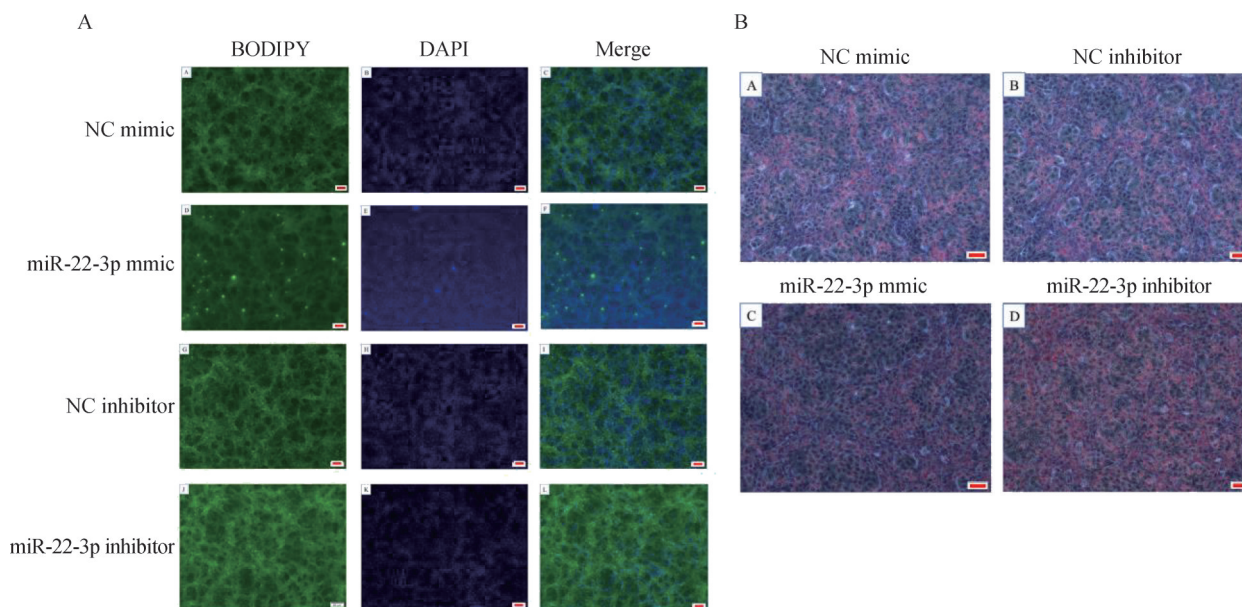
A. Detection of transfection efficiency of miR-22-3p mimic; B. Detection of transfection efficiency of miR-22-3p inhibitor; C. The effect of transfection of miR-22-3p mimic and miR-22-3p inhibitor on triglyceride secretion in BMECs; D. The effect of transfection of miR-22-3p mimic and miR-22-3p inhibitor on cholesterol secretion in BMECs

图4 miR-22-3p 抑制甘油三酯和胆固醇的合成

Fig. 4 miR-22-3p inhibits the synthesis of triglycerides and cholesterol

22-3p mimic 较于 NC mimic 组抑制脂滴积累; 与 NC inhibitor 组相比, miR-22-3p inhibitor 促进脂滴的合成与沉积(图 5A)。油红 O 染色发现, miR-22-3p

mimic 抑制 BMECs 脂滴的生成, 而 miR-22-3p inhibitor 促进 BMECs 脂滴的生成(图 5B)。综上, miR-22-3p 对 BMECs 中脂滴的积累具有抑制作用。



A. BODIPY 染色检测 miR-22-3p 对脂滴分泌的影响; B. 油红 O 染色检测 miR-22-3p 对脂滴分泌的影响

A. BODIPY staining was used to detect the effect of miR-22-3p on lipid droplet secretion; B. Oil red O staining was used to detect the effect of miR-22-3p on lipid droplet secretion

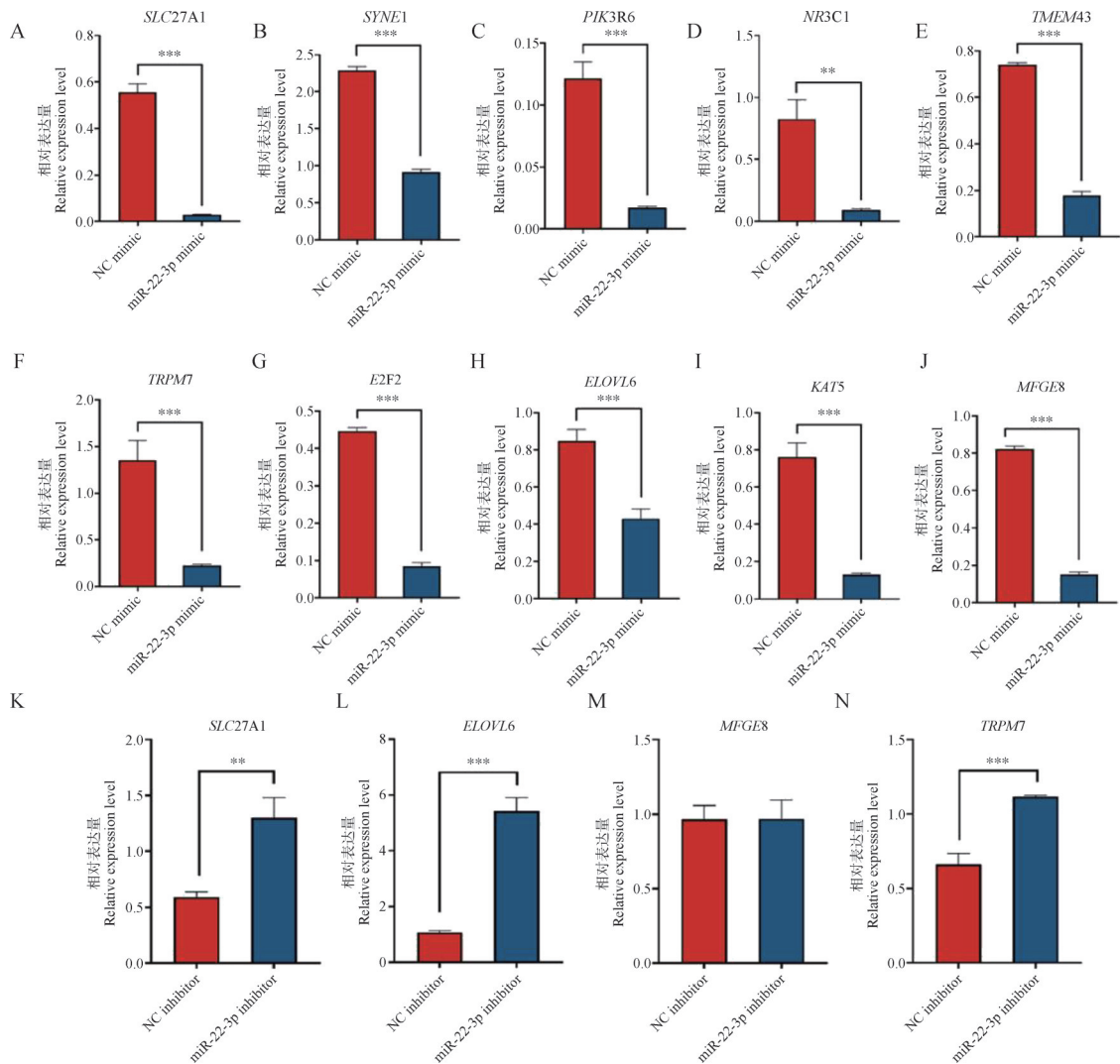
图5 miR-22-3p 对 BMECs 乳脂分泌的影响 (标尺=250 μm)

Fig. 5 The effect of miR-22-3p on milk fat secretion in BMECs (scale=250 μm)

2.6 miR-22-3p 靶基因的筛选

通过 Targetscan 和 miRanda 预测并选择了评分前 10 的与乳脂合成相关的 miR-22-3p 的高分候选靶基因做进一步的研究。将 miR-22-3p mimic 和其阴性对照 (NC) 分别转染到 BMECs 中, 48 h 后通过 RT-qPCR 检测这些靶基因的表达情况。结果显示 (图 6), 转染 miR-22-3p mimic 后,

KAT5、*TRPM7*、*SYNE1*、*PIK3R6*、*TMEM43*、*ELOVL6*、*E2F2*、*NR3C1*、*SLC27A1* 和 *MFGE8* 这 10 个靶基因表达水平均极显著低于 NC 组 ($P < 0.01$)。转染 miR-22-3p inhibitor 后, *TRPM7*、*ELOVL6* 和 *SLC27A1* 这 3 个基因表达水平均极显著高于 NC 组 ($P < 0.01$), 而 *MFGE8* 表达水平与 NC 组差异不显著。



A-J. 转染 miR-22-3p mimic 后对 *SLC27A1*、*SYNE1*、*PIK3R6*、*NR3C1*、*TMEM43*、*TRPM7*、*E2F2*、*ELOVL6*、*KAT5* 和 *MFGE8* 进行表达量检测; K-N. 转染 miR-22-3p inhibitor 后对 *SLC27A1*、*ELOVL6*、*MFGE8* 和 *TRPM7* 进行表达量检测

A-J. The expression levels of candidate gene *SLC27A1*, *SYNE1*, *PIK3R6*, *NR3C1*, *TMEM43*, *TRPM7*, *E2F2*, *ELOVL6*, *KAT5* and *MFGE8* were detected after transfecting miR-22-3p mimic; K-N. The expression levels of candidate gene *SLC27A1*, *ELOVL6*, *MFGE8* and *TRPM7* were detected after transfecting miR-22-3p inhibitor

图 6 miR-22-3p 对候选靶基因表达水平的影响

Fig. 6 The influence of miR-22-3p on the expression levels of candidate target genes

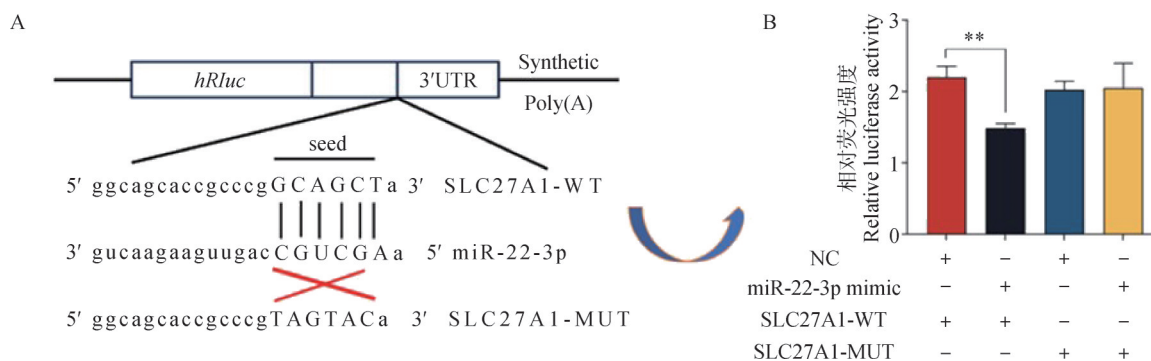
2.7 miR-22-3p 与 *SLC27A1* 的靶向关系鉴定

选择 *SLC27A1* 并对其进行双荧光素酶报告试

验, 进一步验证 miR-22-3p 与 *SLC27A1* 之间的靶向关系。本研究构建了 *SLC27A1* 的野生型 (pmirGLO-

SLC27A1-3'UTR-WT) 和突变型载体 (pmirGLO-*SLC27A1*-3'UTR-MUT)。将其分别与 miR-22-3p mimic/NC 共转染到 HEK-293T 细胞中, 36 h 后检测荧光素酶的相对活性。结果表明, miR-22-3p mimic 和 *SLC27A1*-WT 共转染组的双荧光素酶活

性极显著低于 NC 和 *SLC27A1*-WT 的共转染组 ($P < 0.01$), 而 miR-22-3p mimic 和 *SLC27A1*-MUT、NC 和 *SLC27A1*-MUT 这两对共转染组的双荧光素酶活性差异不显著 (图 7)。表明 miR-22-3p 与 *SLC27A1* 存在靶向关系。



A. miR-22-3p 靶向 *SLC27A1* 的 WT 和 MUT 序列示意图; B. miR-22-3p 和 *SLC27A1* 共转染双荧光素酶报告基因检测结果
A. Schematic representation of WT and MUT sequences of *SLC27A1* targeted by miR-22-3p; B. Results of dual-luciferase reporter gene assay for co-transfection of miR-22-3p and *SLC27A1*

图 7 双荧光素酶报告基因检测鉴定 miR-22-3p 的靶基因

Fig. 7 Identification of the target genes of miR-22-3p by dual-luciferase reporter gene assay

3 讨论

Targetscan 和 miRanda 是预测 mRNA 或 circRNA 与 miRNA 靶向关系的两个常用工具。Targetscan 是根据 mRNA 与 miRNA 的表达谱数据进行拟合, 找到一些具有生物学意义的位点序列特征和相对保守性的打分模型^[21, 22]。miRanda 是基于 RNA 二级结构和自由能的动态规划算法^[23]。因此, 本研究利用前期测序得到的与乳脂合成相关的 circPRKAA2 为基础, 利用两者成功预测得到 circPRKAA2 的靶向 miRNA (miR-22-3p), 以及 miR-22-3p 的预测靶 mRNA (*KAT5*、*TRPM7*、*SYNE1*、*PIK3R6*、*TMEM43*、*ELOVL6*、*E2F2*、*NR3C1*、*SLC27A1* 和 *MFGE8*)。这与 Li 等^[24]预测的 miR-22-3p 靶向 *ELOVL6* 在内的一些脂质代谢相关靶基因结果一致。以上信息提示, circPRKAA2 可能通过 ceRNA 网络在泌乳方面发挥潜在的调控功能。

有研究表明 circRNAs 的亚细胞定位存在差异, 且在不同亚细胞区室中的 circRNA 可以与不同的靶基因相互作用, 以执行其不同的调节功能^[25]。大多研究表明, circRNA 在细胞核中产生, 主要在细胞质中富集, 通过与细胞质中的 miRNA 相互作用而发

挥重要的调节作用^[26-28], 主要作用机制为 circRNA 作为 miRNA 的“海绵”通过与相应的 miRNA 竞争性结合从而进一步降低其对其靶标的抑制作用^[29-32]。研究发现, circEIF3J 和 circPAIP2 在细胞核中与 U1 snRNP 结合, 然后将 RNA 聚合酶 II 募集到亲本基因的启动子位点, 从而增强 circRNA 及其同源 mRNA 的表达^[33]。circANRIL 在细胞核中竞争性抑制 pre-rRNA 和 PES1 蛋白之间的相互作用, 从而抑制 rRNA 的加工和成熟^[34]。本研究对 circPRKAA2 和 miR-22-3p 做了亚细胞定位的结果显示, U6 在细胞核中高表达, *GAPDH* 在细胞质中高表达。本研究将 BMECs 的细胞核与细胞质成功的分离开, 且 miR-22-3p 和 circPRKAA2 在细胞质中的表达量均是多于在细胞核中的表达量, 这表明二者主要存在于细胞质内参与调控奶牛的乳脂合成。

验证 circRNA 与 miRNA 互作关系最常规的方法是双荧光素酶基因报告试验, 除此之外, RNA Pull down 和 AGO2 RIP 也是筛选和验证 circRNA-miRNA 最经典的方法之一。Chen 等^[35]利用 RIP 和 RNA Pull down 研究了 circNTRK2 与 miR-140-3p 结合的 ceRNA 调控机制。Zhang 等^[36]使用同样的方法鉴定 circNRIP1 的下游 miR-149-5p。Lu 等^[37]

也通过以上两种方法证明 miR-1193 是 circSEC24A 的直接靶标。本研究使用带有标记核酸探针作为诱饵来富集 circPRKAA2 的靶向结合物,直接捕获 circPRKAA2 与 miR-22-3p 靶向关系。也通过荧光素酶活性的高低来判断 circPRKAA2 与 miR-22-3p 的调控关系。最终通过 RNA pull down 和双荧光素酶报告双重验证了 circPRKAA2 与 miR-22-3p 的靶向关系,证明 circPRKAA2 对 miR-22-3p 进行负调控。

牛奶中的乳脂主要是 BMECs 分泌的脂滴,而脂滴在细胞中主要由甘油三酯和甾醇酯组成^[38-39]。因此,本研究检测了 miR-22-3p 对甘油三酯和胆固醇的生成的影响。结果发现,miR-22-3p 会抑制甘油三酯和胆固醇的生成,同时也发现,miR-22-3p 会抑制脂滴的生成。Deng 等^[40]的研究发现 miR-22-3p 在鸡的多级卵泡中高表达,通过抑制 *PTEN* 激活 PI3K/AKT/mTOR 通路,促进鸡颗粒细胞增殖、类固醇生成和脂质代谢。miR-22-3p 还通过影响 *ELOVL6* 基因的表达参与控制产蛋鸡肝脏脂质代谢^[41]。之后,对 miR-22-3p 过表达和干扰后,针对 Targetscan 和 miRanda 预测 miR-22-3p 的高分候选靶基因进行检测。结果发现,过表达 miR-22-3p 后,10 个靶向基因表达水平均被下调。当对 miR-22-3p 干扰后,检测感兴趣的 4 个基因后,发现仅有 *TRPM7*、*ELOVL6* 和 *SLC27A1* 的表达水平被上调,进而挑选了最感兴趣的 *SLC27A1*。最后,通过双荧光素酶报告验证 miR-22-3p 与 *SLC27A1* 的靶

向调控关系,结果表明,miR-22-3p 与 *SLC27A1* 具有靶向关系且对其进行负调控。研究表明,*SLC27A1* 是一种进化上保守的蛋白质,能够参与细胞中长链脂肪酸的摄取,已被证明在脂肪酸代谢快的组织(心脏、骨骼肌和脂肪组织等)中表达^[41]。*SLC27A1* 通过负调控 *CPT1A* 影响鸡脂质积累^[42]。在骨骼肌细胞中过表达 *SLC27A1* 会促进脂肪酸的氧化^[43]。推测 *SLC27A1* 对脂质生成起着重要的调控作用,在后续的研究中需要进一步去验证。

综上,本研究成功构建了 circPRKAA2、miR-22-3p 和 *SLC27A1* 的 ceRNA 网络,探明了其靶向调控关系,也验证了 miR-22-3p 对乳脂生成的负调控作用。为探究荷斯坦奶牛乳脂合成的分子调控机制提供了理论基础。

4 结 论

本研究成功构建了 circPRKAA2/miR-22-3p/*SLC27A1* 这一 ceRNA 调控轴。研究发现, circPRKAA2 与 miR-22-3p 均主要定位于 BMECs 的细胞质中,且 circPRKAA2 可作为 miRNA 海绵负调控 miR-22-3p 的表达。功能试验表明,miR-22-3p 通过靶向抑制 *SLC27A1* 的表达,进而显著抑制 BMECs 中脂滴的分泌以及甘油三酯和胆固醇的合成。这些发现揭示了 circPRKAA2 通过调控 miR-22-3p/*SLC27A1* 对奶牛乳脂合成的影响,为深入理解奶牛乳脂代谢的调控网络提供了新的理论依据(图 8)。

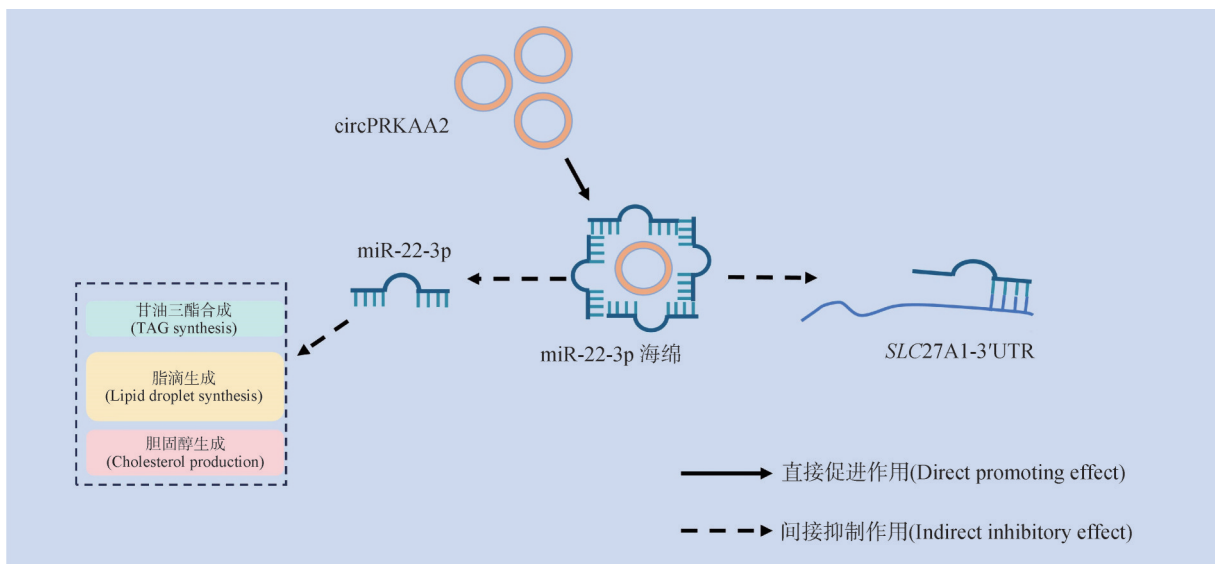


图 8 circPRKAA2 在 BMECs 内对乳脂合成的调控过程

Fig. 8 The regulatory process of circPRKAA2 on milk fat metabolism in BMECs

参考文献(References):

- [1] SMOCZYNSKI M. Role of phospholipid flux during milk secretion in the mammary gland[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2017, 22 (2):117-129.
- [2] CAVALETTO M, GIUFFRIDA M G, CONTI A. The proteomic approach to analysis of human milk fat globule membrane[J]. *Clin Chim Acta*, 2004, 347 (1-2):41-48.
- [3] BALLARD O, MORROW A L. Human milk composition: Nutrients and bioactive factors [J]. *Pediatr Clin North Am*, 2013, 60 (1):49-74.
- [4] CAVALETTO M, GIVONETTI A, CATTANEO C. The immunological role of milk fat globule membrane[J]. *Nutrients*, 2022, 14 (21):4574.
- [5] HE X, PARENTI M, GRIP T, et al. Metabolic phenotype of breast-fed infants, and infants fed standard formula or bovine MFGM supplemented formula: a randomized controlled trial [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1):339.
- [6] LU Q Y, CHEN Z, JI D J, et al. Progress on the regulation of ruminant milk fat by noncoding RNAs and ceRNAs[J]. *Front Genet*, 2021, 12:733925.
- [7] FENG X F, CAI Z Y, MU T, et al. CircRNA screening and ceRNA network construction for milk fat metabolism in dairy cows[J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9:995629.
- [8] ZHU C, JIANG Y, ZHU J, et al. CircRNA8220 sponges miR-8516 to regulate cell viability and milk synthesis via Ras/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways in goat mammary epithelial cells [J]. *Animals*, 2020, 10 (8):1347.
- [9] DING Y Y, HOU Y H, LING Z J, et al. Identification of candidate genes and regulatory competitive endogenous RNA (ceRNA) networks underlying intramuscular fat content in Yorkshire pigs with extreme fat deposition phenotypes[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (20):12596.
- [10] WU J, ZHANG S, YUE B, et al. circRNA profiling reveals circPPAR γ modulates adipogenic differentiation via sponging miR-92a-3p [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70 (22):6698-6708.
- [11] LIU Y, HOU J, ZHANG M, et al. circ-016910 sponges miR-574-5p to regulate cell physiology and milk synthesis via MAPK and PI3K/AKT-mTOR pathways in GMECs [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235 (5):4198-4216.
- [12] KUKREJA R C, YIN C, SALLOUM F N. MicroRNAs: New players in cardiac injury and protection [J]. *Mol Pharmacol*, 2011, 80 (4):558-564.
- [13] LAI E C. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation[J]. *Nat Genet*, 2002, 30 (4):363-364.
- [14] LU T X, ROTHENBERG M E. MicroRNA [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141 (4):1202-1207.
- [15] SUN X, ZHANG J. miRNA pattern discovery from sequence alignment [J]. *J Inf Process Syst*, 2017, 13 (6):1527-1543.
- [16] CHEN Z, CHU S, LIANG Y, et al. miR-497 regulates fatty acid synthesis via LATS2 in bovine mammary epithelial cells [J]. *Food Funct*, 2020, 11 (10):8625-8636.
- [17] CHEN Z, CHU S, WANG X, et al. MiR-16a regulates milk fat metabolism by targeting large tumor suppressor kinase 1 (LATS1) in bovine mammary epithelial cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67 (40):11167-11178.
- [18] FENG X, TONG L, MA L, et al. Mining key circRNA-associated-ceRNA networks for milk fat metabolism in cows with varying milk fat percentages [J]. *BMC Genomics*, 2024, 25 (1):323.
- [19] FENG X, CAI Z, GU Y, et al. Excavation and characterization of key circRNAs for milk fat percentage in Holstein cattle [J]. *J Anim Sci*, 2023, 101:skad157.
- [20] TANG T, ZHOU J, WANG M, et al. Transcriptomics reveals the regulatory mechanisms of circRNA in the muscle tissue of cows with ketosis postpartum [J]. *Genomics*, 2025, 117(2):111008.
- [21] GRIMSON A, FARH K K H, JOHNSTON W K, et al. MicroRNA targeting specificity in mammals: Determinants beyond seed pairing[J]. *Mol Cell*, 2007, 27 (1):91-105.
- [22] 谷 博, 王安琪, 于鑫淼, 等. 基于全转录组测序的 2 个不同品种绵羊卵巢 ceRNA 网络构建及关键 miRNA 的筛选 [J]. 畜牧兽医学报, 2025, 56 (6):2765-2777.
- GU B, WANG A Q, YU X M, et al. Construction of ovarian ceRNA networks and screening of key miRNA in two different breeds of sheep based on whole transcription sequencing [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2025, 56 (6):2765-2777. (in

- Chinese)
- [23] ENRIGHT A J, JOHN B, GAUL U, et al. MicroRNA targets in Drosophila [J]. *Genome Biol*, 2003, 5 (1): R1-R1.
- [24] LI H, MA Z, JIA L, et al. Systematic analysis of the regulatory functions of microRNAs in chicken hepatic lipid metabolism [J]. *Sci Rep*, 2016, 6 (1): 31766.
- [25] ZHANG J, ZHANG X, LI C, et al. Circular RNA profiling provides insights into their subcellular distribution and molecular characteristics in HepG2 cells [J]. *RNA Biol*, 2019, 16 (2): 220-232.
- [26] SALZMAN J, GAWAD C, WANG P L, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (2): e30733.
- [27] HSU M T, COCA-PRADOS M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells [J]. *Nature*, 1979, 280 (5720): 339-340.
- [28] JECK W R, SORRENTINO J A, WANG K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats [J]. *RNA*, 2013, 19 (2): 141-157.
- [29] YU L, GONG X, SUN L, et al. The Circular RNA Cdr1as act as an oncogene in hepatocellular carcinoma through targeting miR-7 expression [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (7): e0158347.
- [30] TANG W, JI M, HE G, et al. Silencing CDR1as inhibits colorectal cancer progression through regulating microRNA-7 [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 2045-2056.
- [31] HANSEN T B, JENSEN T I, CLAUSEN B H, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495 (7441): 384-388.
- [32] ZHENG Q, BAO C, GUO W, et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11215.
- [33] LI Z, HUANG C, BAO C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2015, 22 (3): 256-264.
- [34] HOLDT L M, STAHRINGER A, SASS K, et al. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12429.
- [35] CHEN X, JIANG J, ZHAO Y, et al. Circular RNA circNTRK2 facilitates the progression of esophageal squamous cell carcinoma through up-regulating NRIP1 expression via miR-140-3p [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39: 1-14.
- [36] ZHANG X, WANG S, WANG H, et al. Circular RNA circNRIP1 acts as a microRNA-149-5p sponge to promote gastric cancer progression via the AKT1/mTOR pathway [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18: 1-24.
- [37] LU X, GAN Q, GAN C, et al. Circular RNA circSEC24A promotes cutaneous squamous cell carcinoma progression by regulating miR-1193/MAP3K9 axis [J]. *Onco Targets Ther*, 2021: 653-666.
- [38] JACKSON C L. Lipid droplet biogenesis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2019, 59: 88-96.
- [39] OLZMANN J A, CARVALHO P. Dynamics and functions of lipid droplets [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20 (3): 137-155.
- [40] DENG X, NING Z, LI L, et al. High expression of miR-22-3p in chicken hierarchical follicles promotes granulosa cell proliferation, steroidogenesis, and lipid metabolism via PTEN/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 253: 127415.
- [41] MA Z, LI H, ZHENG H, et al. Hepatic ELOVL6 mRNA is regulated by the gga-miR-22-3p in egg-laying hen [J]. *Gene*, 2017, 623: 72-79.
- [42] QIU F, XIE L, MA J E, et al. Lower expression of SLC27A1 enhances intramuscular fat deposition in chicken via down-regulated fatty acid oxidation mediated by CPT1A [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 449.
- [43] GUITART M, OSORIO-CONLES O, PENTINAT T, et al. Fatty acid transport protein 1 (FATP1) localizes in mitochondria in mouse skeletal muscle and regulates lipid and ketone body disposal [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (5): e9810.

(编辑 郭云雁)