

3T3-L1前脂肪细胞分化过程中miRNAs基因的表达变化^Δ

张星星*,李 杨,周见至,贾 乙,刘 雅,李晓辉[#](第三军医大学药学院药物研究所,重庆 400038)

中图分类号 R965;R723.14 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)05-0401-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.05.07

摘要 目的:探讨3T3-L1前脂肪细胞诱导分化过程中miRNAs基因的表达变化。方法:运用经典的“激素鸡尾酒”法建立3T3-L1前脂肪细胞分化模型。采用实时定量聚合酶链式反应方法检测不同时相点(0 d、2 h、2 d、4 d)细胞分化相关标志物的表达和20种miRNAs的表达变化,采用生物信息学方法对变化显著的miRNAs进行靶基因预测。结果:成功建立3T3-L1前脂肪细胞分化模型。不同时相点细胞分化相关标志物基因水平提示3T3-L1前脂肪细胞分化为脂肪细胞。20种miRNAs中以miR-126、miR-214、miR-320、miR-351的表达最为显著。靶基因预测结果显示,miR-126靶基因有影响细胞增殖的转录因子Crk、代谢相关基因Irs1等;miR-214靶基因有转录因子Zbtb20、Kpna1等;miR-320靶基因有影响代谢相关基因Igf2bp3、Gxylt1等;miR-351靶基因有Myt1、Mcl1、Bmf等。结论:miR-126、miR-214、miR-320、miR-351可通过影响基因转录及细胞代谢水平,从而对3T3-L1前脂肪细胞分化发挥作用,为开发治疗肥胖等疾病的新药提供了新的研究思路。

关键词 miRNAs;3T3-L1;脂肪细胞;分化

Expression Changes of miRNAs in the Differentiation of 3T3-L1 Pre-adipocytes

ZHANG Xing-xing, LI Yang, ZHOU Jian-zhi, JIA Yi, LIU Ya, LI Xiao-hui (Institute of Materia Medica, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To explore the expression change of miRNAs in the differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes. METHODS: The model of 3T3-L1 pre-adipocytes differentiation was established by the classic “hormone cocktail” method. Changes of markers and 20 kinds of miRNAs were detected by Real-time PCR at different time points (0 d, 2 h, 2 d, 4 d). Target genes of significantly changed miRNAs were predicted by bioinformatics. RESULTS: 3T3-L1 pre-adipocytes differentiation was established successfully. The expression of marks suggested 3T3-L1 pre-adipocytes differentiated into adipocytes. Among 20 kinds of miRNAs, the expressions of miR-126, miR-214, miR-320, miR-351 in these miRNAs were the most significant. The predicting results showed that the target genes of miR-126 included transcription factor Crk which affected cell proliferation, and Irs1 related to metabolism. miR-214 target genes contained transcription factor Zbtb20, Kpna1; miR-320 target genes contained Igf2bp3 and Gxylt1 which affected metabolism; miR-351 target genes included Myt1, Mcl1, Bmf, etc. CONCLUSIONS: miR-126, miR-214, miR-320, miR-351 may play an important role on the differentiation of 3T3-L1 pre-adipocytes by affecting gene transcription and metabolic changes. It provides a new idea for drug research on obesity.

KEY WORDS miRNAs; 3T3-L1; Adipocytes; Differentiation

近年来,肥胖的发病率越来越高,以及由其引起的各种代谢性疾病包括胰岛素抵抗、2型糖尿病、脂肪肝、动脉粥样硬化和高血压等已经成为威胁人类健康的重要因素。传统的治疗药物一般通过抑制患者食欲和脂肪酶来控制体质量,而且只能短期使用,至今暂无药物能减少代谢综合征的患病率和并发症死亡率^[1]。从细胞水平来说,肥胖是由于脂肪细胞数目增多及体积增大所致的一种临床综合征,因此通过对脂肪细胞分化、调控的研究对新药的开发也具有重要意义。miRNA是一类由20~25个核苷酸组成的高度保守的非编码小RNA^[2],

其主要通过特异性识别靶基因 mRNA 3' UTR 上相应靶点并通过碱基互补配对的方式与之结合,调控 mRNA 降解和翻译抑制,从而参与一系列生物过程,包括心脏形成、肿瘤形成、应激反应和病毒感染等^[3-4]。大约超过30%的人类蛋白质编码基因能潜在地被 miRNA 调节^[5]。有研究^[6-7]证明,脂肪细胞的分化也受 miRNA 的调控,提示 miRNA 在脂肪细胞的分化过程中起重要作用。最近研究^[8-9]表明,miRNA 的失常和人类疾病的病理过程相关,已经发现基于 miRNA 的靶向药物——肝脏表达的 miR-122 的反义寡核苷酸,目前处于治疗肝炎 C 病毒感染的 II 期临床试验^[10]。如果能够找到调控脂肪细胞分化的 miRNA,将为相关疾病的治疗提供一个新的药物靶点。因此,本研究探讨了 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化过程中 miRNAs 基因的表达变化,并对变化显著的 miRNAs 进行靶基因预测,以期 miRNA 作为调控脂肪细胞分化从而治疗肥胖等疾病的新药提供新的研究思路。

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81072630、30973523);重庆市自然科学基金资助项目(No.CSTC2010BB5169)

* 硕士研究生。研究方向:免疫与心血管疾病。电话:023-68753397。E-mail: xingxing0216@126.com

[#] 通信作者:教授,博士。研究方向:免疫与心血管疾病。电话:023-68753397。E-mail: lpsh008@yahoo.com.cn

1 材料

实时定量聚合酶链式反应(RT-PCR)仪(德国 Appendorf 公司);低温高速离心机(美国 Sigma 公司)。

3T3-L1 前脂肪细胞系购自中国科学院上海细胞库。

地塞米松原料药[生工生物工程(上海)有限公司,批号:DN1187,纯度: $>98\%$];3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx,美国 Sigma 公司,批号:101098727,纯度: $\geq 99\%$);精蛋白生物合成人胰岛素注射液[INS,诺和诺德(中国)制药有限公司,批号:AVG0310,规格:300 u:3 ml];总 RNA 提取试剂盒(批号:DP419)、miRNA 提取试剂盒(批号:DP501)购自天根生化科技(北京)有限公司;总 RNA 反转录试剂盒(批号:DRR047A)、miRNA 反转录试剂盒(批号:D350A)、总 RNA RT-PCR 试剂盒(批号:DRR820A)、miRNA RT-PCR 试剂盒(批号:D351A)购自日本 TaKaRa 公司;引物由美国 Invitrogen 公司合成。

2 方法

2.1 3T3-L1 前脂肪细胞分化模型的建立^[11]

运用经典的“激素鸡尾酒”法建立 3T3-L1 前脂肪细胞分化模型。将 3T3-L1 前脂肪细胞接种于培养板,用含 10% 胎牛血清的高糖达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)培养液在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。细胞完全融合时设为第 2 天,待细胞融合 2 d 后,换用含 0.5 mmol/L IBMx、10 μg/ml INS、1.0 μmol/L 地塞米松的 10% 胎牛血清高糖 DMEM 培养液培养(设为第 0 天)。2 d 后,换以含 10 μg/ml INS 的 10% 胎牛血清高糖 DMEM 培养液再培养 2 d(设为第 4 天)。最后以 10% 胎牛血清高糖 DMEM 培养液继续培养,每 2 d 换培养液 1 次,直到诱导分化第 8 天(设为第 8 天),90% 的 3T3-L1 前脂肪细胞呈脂肪细胞表型。观察细胞诱导分化过程,并用倒置显微镜拍照,记录第 2、4、8 天细胞分化情况。重复培养 6 株细胞。

2.2 RT-PCR 法检测脂肪细胞分化相关标志物的表达

分别取“2.1”项下 0 d、2 h、2 d、4 d 的细胞,按照总 RNA 提取试剂盒步骤提取总 RNA 并反转录成为 cDNA,以 cDNA 为模板进行扩增。试验中对脂肪细胞形成的标志基因过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)、增强子结合蛋白 α (C/EBP- α)、增强子结合蛋白 β (C/EBP- β)、增强子结合蛋白 δ (C/EBP- δ),以磷酸甘油醛-3-脱氢酶(GAPDH)的表达量为内参,进行 RT-PCR 检测并观察其表达变化,判断 3T3-L1 前脂肪细胞分化情况。引物序列如下: GAPDH (F): ATGACTCCACTCACGGCAAAT, GAPDH (R): ACTCCACGACATACTCAGCACC; PPAR- γ (F): CCTGAAGCTCCAAGAATACCAAAG, PPAR- γ (R): CCCACAGACTCGGCACTCAAT; C/EBP- α (F): GGTTCGGGTCGCTGGAT, C/EBP- α (R): CGGCCTGACTCCTCATCT; C/EBP- β (F): CACCGGGTTTCGGGACTTG, C/EBP- β (R): CCCGCAGGAACATCTTTAAGTG; C/EBP- δ (F): GGAAGGAACACGGAAAGC, C/EBP- δ (R): GAAAGTAGAGGCAACGAGGAAT(注:F 为正义引物,R 为反义引物)。PCR 反应条件: 95 °C 25 s(1 个循环), 95 °C 5 s、60 °C 20 s、75 °C 10 s(40 个循环);溶解度曲线反应条件: 95 °C 15 s、60 °C 15 s、95 °C 15 s(1 个循环);总反应体积为 20 μl。扩增产物在 RT-PCR

仪上分析,细胞分化过程中各时相点基因的表达变化以相对表达量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)表示,其中 Ct 表示循环数。

2.3 RT-PCR 法检测脂肪细胞分化过程中 miRNAs 的表达变化

分别取“2.1”项下 0 d、2 h、1 d、4 d、8 d 的细胞,按照 miRNA 提取试剂盒步骤提取 miRNAs,使用 miRNA 反转录试剂盒逆转录成为 cDNA,以 cDNA 为模板进行扩增。笔者选取有文献^[11-12]报道过与前脂肪细胞分化可能存在关系的 20 种 miRNAs (miR-143、miR-375、miR-290、miR-199a、miR-236、miR-16、miR-30c、miR-30d、miR-30e、miR-126、miR-145、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-214、miR-320、miR-218、miR-224、miR-351、miR-423),以 5S-rRNA 为内参,采用 RT-PCR 检测 20 种 miRNAs 表达情况来分析其变化。引物序列如下: 5S(F): ACGGCCATACCACCCTGAAC, 5S(R): AGGCGGTCTCCCA-TCCAAG; miR-143: CGTGAGATGAAGCACTGTAGCTC; miR-375: TTTGTTTCGTTTCGGCTCGCGT; miR-290: AAAGT-GCCGCCTAGTTTAAAGCC; miR-199a: CCCAGTGTTCAGACTACCTGTTTC; miR-23b: ATCACATTGCCAGGGATTACC; miR-16: TAGCAGCACGTAAATATTGGCG; miR-30c: CGTG-TAAACATCTACACTCTCAGC; miR-30d: TGTAACATC-CCCAGCTGGAAG; miR-30e: CGTGTAACATCTTGACT-GGAAG; miR-126: CGCATTATTACTTTTGGTACGCG; miR-145: GTCCAGTTTCCAGGAATCCCT; miR-200a: CGTAA-CACTGTCTGGTAACGATGT; miR-200b: CGTAATACTGCC-TGGTAATGATGA; miR-200c: TAATACTGCCGGTAATGAT-GG; miR-214: ACAGCAGGCACAGACAGGCAGT; miR-320: AAAAGCTGGTTGAGAGGGC; miR-218: CGTTGTGCTT-GATCTAACCATGT; miR-224: CGGTAAGTCACTAGTGGTT-CCGTT; miR-351: TCCCTGAGGAGCCCTTTGAGC; miR-423: AGCTCGGTCTGAGGCCCTC。PCR 反应条件、溶解度曲线反应条件、总反应体积均同“2.2”项。扩增产物在 RT-PCR 仪上分析,细胞分化过程中各时相点基因的表达变化以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

2.4 miRNAs 靶基因预测

在“2.3”项下研究的基础上,筛选出变化显著的 miRNAs,使用国内外研究中常用的 3 个 miRNAs 靶基因预测网站 TargetScan、picTar、Miranda (<http://www.TargetScan.org>; <http://pictar.mdc-berlin.de>; <http://www.microrna.org>) 进行靶基因预测,取至少 2 个软件测得的基因结果为靶基因,并对预测结果进行讨论。

2.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.01$ 表示有统计学差异。

3 结果

3.1 建模与分化标志物检测

3T3-L1 前脂肪细胞的分化过程一般分为 3 个阶段:生长停止期、克隆增殖期和终末分化期。经过细胞复苏后,前脂肪细胞为梭形,与成纤维细胞相似,均匀分散于培养瓶底,形态、大

小一致,增殖迅速,胞浆内未观察到脂滴。潜伏期约1 d(生长停滞期),第2~4天呈指数生长快速增殖(克隆增殖期)。细胞完全融合后,进入生长停滞状态,多视野下未观察到处于分裂相的细胞。与第0天比较,在细胞分化早期(刺激分化2 h后),C/EBP- β 、C/EBP- δ 表达明显上调($P<0.01$),C/EBP- δ 表达上调20倍,C/EBP- β 表达上调40倍;相比之下C/EBP- α 和PPAR- γ 表达上调并不明显。使用IBMX+INS+地塞米松诱导分化后第3天,细胞开始向成熟脂肪细胞转变,细胞体积逐渐增大,细胞形态由梭形逐渐向椭圆、类圆及圆形转变,但未见有明显脂滴。分化第4天,细胞进一步变大、变圆,开始有小脂滴积聚,分布于细胞核周围。与第0天比较,C/EBP- α 和PPAR- γ 表达明显上调($P<0.01$)。分化第8天(终末分化期)时,胞浆中较小的脂滴融合为较大的脂滴,大部分细胞表现出典型的成熟脂肪细胞形态。3T3-L1前脂肪细胞的生长分化情况见图1,不同时相点各分化标志物mRNA的表达比较见图2。

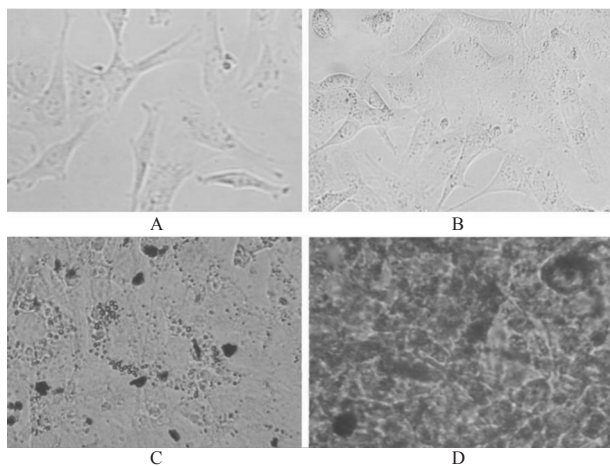


图1 3T3-L1前脂肪细胞的生长分化情况($\times 40$)

A. 第-2天; B. 第0天; C. 第4天(油红染色); D. 第8天(油红染色)

Fig 1 Growth and differentiation of 3T3-L1 pre-adipocyte ($\times 40$)

A. -2 nd day; B. 0 day; C. 4th day (oil red stained); D. 8th day (oil red stained)

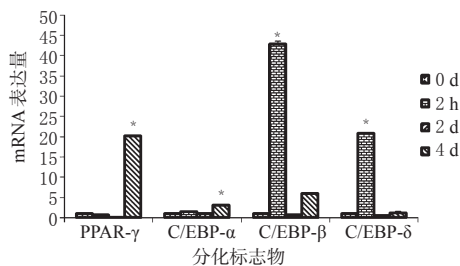


图2 不同时相点各分化标志物mRNA的表达比较($n=6$)
与0 d比较: $*P<0.01$

Fig 2 Comparison of mRNA expression of markers of differentiation at different time points ($n=6$)
vs. 0 day: $*P<0.01$

3.2 脂肪细胞分化过程中miRNAs的检测

由不同时相点miRNAs的Ct值及 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的结果发现,miR-200a、miR-290、miR-375表达量过低,分析其变化无意义。剩余的17个miRNAs中,表达上调2倍以上($P<0.01$)的在2 h时

有12种,1 d时有16种,4 d时有13种,8 d时有7种;上调5倍以上的($P<0.01$)的在2 h时有2种,1 d时有3种,4 d时有1种,8 d时有1种。其中仅miR-423在1 d时的表达出现明显下调,其余均表达上调。值得注意的是,miR-126在4、8 d时表达出现明显上调($P<0.01$)。以上结果中,在各时相点上调最明显的基因共有4个,分别为miR-126、miR-214、miR-320、miR-351,其具体变化见图3。

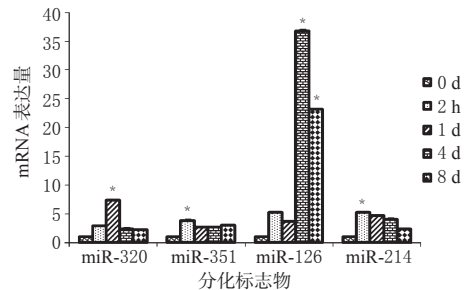


图3 4种miRNAs不同时相点mRNA的表达比较($n=6$)
与0 d比较: $*P<0.01$

Fig 3 Comparison of mRNA expression of 4 kinds of miRNAs at different time points ($n=6$)
vs. 0 day: $*P<0.01$

3.3 miRNAs靶基因预测

根据“3.2”项下结果,笔者选取了诱导后各时相点表达上调明显的miR-126、miR-214、miR-320、miR-351进行靶基因预测,并查找相关靶基因的作用。其中与转录及其代谢相关的靶基因如表1所示。

表1 4种miRNAs的靶基因预测结果

Tab 1 Prediction of target genes of 4 kinds of miRNAs

miRNA	靶基因	基因编号	描述
miR-126	Crk	NM_133656	Mus musculus v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog
miR-126	Irs1	NM_010570	Mus musculus insulin receptor substrate 1
miR-214	Zbtb20	NM_181058	zinc finger and BTB domain containing 20
miR-214	Kpna1	NM_008465	karyopherin (importin) alpha 1
miR-320	Igf2bp3	NM_023670	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3
miR-320	Gxylt1	NM_001033275	glucoside xylosyltransferase 1
miR-351	Myt1	NM_001171616	myelin transcription factor 1
miR-351	Mcl1	NM_008562	myeloid cell leukemia sequence 1
miR-351	Bmf	NM_138313	BCL2 modifying factor

由表1可知,miR-126靶基因有影响细胞增殖的转录因子Crk、代谢相关基因Irs1等;miR-214的靶基因有转录因子Zbtb20、Kpna1等;miR-320的靶基因影响代谢相关基因Igf2bp3、Gxylt1等;miR-351的靶基因Myt1、Mcl1、Bmf等。

4 讨论

随着人类生活水平地提高,肥胖及其代谢性疾病已成为威胁人类健康的杀手,有关肥胖的药物治疗越来越受到社会的关注。目前只有1种药物奥利司他(Orlistat)符合“安全、有效”这个要求,但是此药持续减肥效果的时间太短,无法满足临床要求,而且在美国已有临床报道13例服用者发生了重度肝损伤,因此研发新的治疗肥胖的药物迫在眉睫。本实验对脂肪细胞分化过程中miRNA的变化进行研究,从全新的角度来认识肥胖及其相关性疾病的发病机制,从而为肥胖治疗的miRNA靶向药物的设计提供依据。

本研究中应用“激素鸡尾酒”法顺利诱导3T3-L1前脂肪细胞分化为成熟的脂肪细胞。据文献^[13]报道,C/EBP-β和C/EBP-γ在脂肪细胞分化的早期高表达,随后诱导C/EBP-α和PPAR-γ,后二者协同诱导下游的各种调节基因,促进前脂肪细胞的分化过程。本试验中C/EBP-β和C/EBP-γ在分化2h时表达上调;在分化4h C/EBP-α和PPAR-γ表达上调,细胞形态也随着脂滴的增大从梭形纤维细胞状变成圆形,充分证明了3T3-L1前脂肪细胞已分化成为成熟的脂肪细胞。

试验利用Poly(A)加尾法(在miRNA的3'端加上多聚A尾,5'端连接引物后进行反转录,这种方法尤其适用于低丰度的miRNAs检测)对20种可能与3T3-L1前脂肪细胞分化有关的miRNAs进行检测。本试验中miR-143的表达与文献^[11-12]报道结果一致。结果中同时还存在多种miRNAs表达上调,有些miRNAs的表达变化比miR-143更明显,如miR-126、miR-214、miR-320、miR-351等。这些miRNAs的变化与前脂肪细胞的分化过程密切相关。在机体中,miRNA调控着约30%的人类蛋白质编码基因,而miRNA又有着复杂的多样性,每个miRNA可能有多目的基因,同时同一个基因又可以受到多个miRNAs的调节^[14]。试验中对显著上调的miR-126、miR-214、miR-320、miR-351进行了靶基因预测,发现其靶基因多为一些影响基因转录及代谢水平的基因。其中与代谢相关的靶基因Irs1是胰岛素受体酪氨酸激酶活性的重要底物,Irs1的酪氨酸磷酸化是有关胰岛素抵抗的关键分子事件,人类脂肪组织中Irs1通过磷脂酰肌醇-3-激酶和蛋白激酶B(AKT)途径的表达下调会损害下游的胰岛素信号转导,导致胰岛素刺激的糖摄取减少。细胞进入终末分化期后,具有胰岛素敏感性,与脂质代谢相关的基因表达上调,如脂肪酸结合蛋白2(AP-2)等。有研究^[15]证明,AP-2基因的表达能够降低Irs1的活性,从而影响其功能。Igf2bp3属于胰岛素生长因子-2(IGF-2)家族成员,是一种重要的生长和胰岛素样因子,是细胞正常生长和发育所必需的^[16]。

综上,这些miRNAs可能是通过对相关的一些影响基因转录及代谢水平的基因来调控3T3-L1前脂肪细胞的分化,为进一步研究其机制与功能奠定了基础。相信随着对miRNA的深入研究,以miRNA为靶标应用于肥胖及其相关性疾病的治疗将成为可能,这也为新药的开发提供了全新的思路。

参考文献

- [1] 刘雅南,冯文焕.肥胖症的药物疗法进展[J].现代生物医学进展,2011,11(20):3997.
- [2] Buchan JR, Parker R. The two faces of miRNA[J]. *Science*, 2007, 318(21):1877.
- [3] Li J, Yao B, Huang H, *et al.* Real-time polymerase chain reaction microRNA detection based on enzymatic stem-loop probes ligation[J]. *Anal Chem*, 2009, 81(31):5446.
- [4] Chitwood DH, Timmermans MC. Small RNAs are on the move[J]. *Nature*, 2010, 467(7314):415.
- [5] Zaragosi LE, Wdziekonski B, Brigand KL, *et al.* Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis[J]. *Genome Biol*, 2011, 12(7):R64.
- [6] Yi C, Xie WD, Li F, *et al.* MiR-143 enhances adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells through targeting the coding region of mouse pleiotrophin[J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(20):3303.
- [7] Wang Q, Li YC, Wang J, *et al.* miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(8):2889.
- [8] Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease[J]. *Cell*, 2012, 148(6):1172.
- [9] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2):215.
- [10] Lindow M, Kauppinen S. Discovering the first microRNA-targeted drug[J]. *J Cell Biol*, 2012, 199(3):407.
- [11] Kajimoto K, Naraba H, Iwai N. MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation[J]. *RNA*, 2006, 12(9):1626.
- [12] 凌宏艳, 虞勤慧, 胡弼, 等. 3T3-L1前脂肪细胞分化过程中miRNAs表达谱的变化[J]. 南华大学学报:医学版, 2010, 38(1):21.
- [13] 张力翔, 缪维. 维生素D及其受体对3T3-L1前脂肪细胞分化影响的分子机制[J]. 医学综述, 2012, 18(3):336.
- [14] Grimson A, Farh KK, Johnston WK, *et al.* MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing[J]. *Mol Cell*, 2007, 27(1):91.
- [15] Meng X, Kondo M, Morino K, *et al.* Transcription factor Ap-2β: a negative regulator of IRS-1 gene expression[J]. *Biochem and Biophys Res Commun*, 2010, 392(4):526.
- [16] Rodriguez S, Eiriksdottir G, Gaunt TR, *et al.* IGF2BP1, IGF2BP2 and IGF2BP3 genotype, haplotype and genetic model studies in metabolic syndrome traits and diabetes[J]. *Growth Horm IGF Res*, 2010, 20(4):310.

(收稿日期:2012-11-05 修回日期:2012-11-28)