

· 论著 ·

microRNA-200c 对 3T3-L1 前体脂肪细胞向脂肪细胞分化的调控作用

李吉隆 周杰 王宝利

【摘要】 目的 探讨 microRNA (miRNA)-200c 对 3T3-L1 前体脂肪细胞分化的影响。**方法** 利用实时 PCR 检测 miRNA-200c 在小鼠骨髓间充质干细胞 (MSCs) 向脂肪细胞分化过程及向骨细胞分化过程中的表达。通过将 miRNA-200c 类似物、miRNA-200c 抑制剂转染至 3T3-L1 前体脂肪细胞, 从而在细胞中增强或抑制 miRNA-200c 的表达, 油红 O 染色检测转染后 3T3-L1 前体脂肪细胞诱导成熟后的脂滴形成情况。实时 PCR 检测转染后脂肪细胞特异性转录因子过氧化物酶体增殖物活化受体 γ (PPAR γ) 和表征基因 aP2 在成脂过程中的表达变化。**结果** 实时 PCR 结果显示, 在小鼠骨髓 MSCs 诱导成脂后 miRNA-200c 表达升高 ($t=24.709$, $P<0.01$), 而诱导成骨后, miRNA-200c 表达下降 ($t=8.783$, $P<0.01$)。转染 miRNA-200c 类似物后, 3T3-L1 前体脂肪细胞中脂滴明显增多, PPAR γ 和 aP2 表达显著升高 ($t=7.674, 9.657$, P 均 <0.01); 转染 miRNA-200c 抑制剂后, 3T3-L1 前体脂肪细胞中脂滴明显减少, PPAR γ 、aP2 表达显著降低 ($t=9.483, 6.419$, P 均 <0.01)。**结论** miRNA-200c 能够促进 3T3-L1 前体脂肪细胞向脂肪细胞分化。

【关键词】 微小 RNA; 脂肪细胞; 细胞分化; microRNA-200c

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81271977, 81472040)

The regulatory effects of microRNA-200c on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes

Li Jilong, Zhou Jie, Wang Baoli. Key Laboratory of Hormones and Development (Ministry of Health), The Metabolic Diseases Hospital & Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Corresponding author: Wang Baoli, Email: bliwang72@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of microRNA (miRNA)-200c on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. **Methods** Real-time PCR was used to examine the expression of miRNA-200c in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) during adipogenic differentiation and osteogenic differentiation. Oil-red O staining was used to measure the formation of oil droplets in 3T3-L1 preadipocytes cells after the transfection of miRNA-200c mimics or inhibitor. Real-time PCR was used to analyze the expression of adipocyte-specific transcription factors peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and aP2 mRNA in adipogenic differentiation. **Results** Results from the real-time PCR revealed that the expression of miRNA-200c was increased after the adipogenic differentiation in mouse bone marrow-derived MSCs ($t=24.709$, $P<0.01$), and was decreased after the osteogenic differentiation ($t=8.783$, $P<0.01$). Transfection of miRNA-200c mimics promoted the accumulation of lipid droplets and up-regulated the expression of PPAR γ and aP2 mRNA in 3T3-L1 preadipocytes ($t=7.674, 9.657$, all $P<0.01$). Inversely, miRNA-200c inhibitor suppressed the lipid droplets accumulation and down-regulated the expression of PPAR γ and aP2 mRNA in 3T3-L1 preadipocytes ($t=9.483, 6.419$, all $P<0.01$). **Conclusion** miRNA-200c promotes adipogenic differentiation of 3T3-L1 preadipocytes.

【Key words】 microRNA; Adipocyte; Cell differentiation; microRNA-200c

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81271977, 81472040)

间充质干细胞(MSCs)是一种具有多向分化潜能的细胞,可以在不同的诱导条件下分化成成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞、肌细胞、神经细胞和心肌细胞等^[1]。MSCs 向脂肪细胞分化或向骨细胞分化是高度有序的过程,受多种转录因子和复杂信号通路的调控,但目前有证据表明,转录后基因表达的调控同样对这一过程起决定性作用^[2]。一些研究表明,microRNA(miRNA)在脂肪细胞分化及成骨细胞分化中发挥重要的调控作用^[3]。而miRNA-200c与细胞成脂分化关系的研究则很少报道。本研究采用实时 PCR 技术对MSCs成脂分化过程中miRNA表达量的变化进行分析,初步探讨miRNA-200c对3T3-L1前体脂肪细胞成脂分化的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料 C57 小鼠购于军事医学科学院实验动物中心[SCXK(京)2014-0004]。细胞株3T3-L1为本实验室保存。胎牛血清及细胞培养基均购自GIBCO公司,总RNA及miRNA提取试剂盒购自OMEGA公司,高效逆转录试剂盒购自Thermo公司,All-in-One miRNA qRT-PCR试剂盒及miRNA特异性引物购自GeneCopoeia公司,SYBR Green qPCR试剂盒购自上海生工生物工程有限公司,转染试剂 Lipofectamine RNAimax购自美国Invitrogen公司。miRNA-200c类似物及其阴性对照片段(NC mimics),miRNA-200c抑制剂及其阴性对照片段(NC inhibitor)均购自上海吉玛生物科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 检测miRNA-200c在MSCs向脂肪细胞和骨细胞分化过程中的表达

1.2.1.1 小鼠骨髓 MSCs 的诱导分化 按文献方法分离小鼠骨髓 MSCs。将小鼠骨髓 MSCs 以 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 密度接种于 25 cm^2 培养瓶,待细胞汇合度分别到达80%和100%时进行成骨诱导和成脂诱导^[4]。成骨诱导培养基为含有10%胎牛血清、50 mg/L抗坏血酸和 5 mmol/L β -磷酸甘油的 α -MEM培养基。成脂诱导培养基为含10%胎牛血清、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、0.25 mmol/L IBMX、5 mg/L 胰岛素和 50 $\mu\text{mol/L}$ 吡哆美辛的 α -MEM培养基。诱导培养3 d后提取 miRNA。

1.2.1.2 miRNA-200c 在 MSCs 成脂、成骨过程中表达变化的检测 采用OMEGA miRNA提取试剂盒提取MSCs miRNA并进行逆转录。用 SYBR Green qPCR 试剂分别进行miRNA-200c和 U6 的实时 PCR 扩增,其中以 U6 为内参,对各组的miRNA-200c表达进行校准。实时 PCR 反应体系总体积为20 μl ,具体为3 μl cDNA,终浓度为200 nmol/L的上、下游引物,10 μl SYBR Green qPCR试剂,去离子水补足至20 μl 。反应条件为:95℃预变性10 min;95℃变性

15 s,60℃退火/延伸15 s,进行40个循环。采用融解曲线法分析 PCR 产物,以排除引物二聚体的干扰。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各实验组目的基因相对于未诱导 MSCs 组的表达量。

1.2.2 检测 miRNA-200c 类似物、miRNA-200c抑制剂对于3T3-L1前体脂肪细胞的作用

1.2.2.1 miRNA-200c 类似物、miRNA-200c抑制剂转染3T3-L1前体脂肪细胞 3T3-L1前体脂肪细胞用含10%胎牛血清的 α -MEM培养基于37℃、5%CO₂培养箱内培养,待3T3-L1前体脂肪细胞汇合度达到40%~50%时进行转染。miRNA-200c类似物及NC mimics转染终浓度为50 nmol/L,miRNA-200c抑制剂及NC inhibitor转染终浓度为75 nmol/L。转染试剂采用 Lipofectamine RNAimax。转染后20 h更换新鲜 α -MEM完全培养基。

1.2.2.2 油红 O 染色 转染后的3T3-L1前体脂肪细胞100%汇合后诱导脂肪细胞分化,更换成脂诱导培养基(含10%胎牛血清、0.25 mmol/L IBMX、5 mg/L胰岛素、50 $\mu\text{mol/L}$ 吡哆美辛、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松),3 d后更换为只含有5 mg/L胰岛素的 α -MEM完全培养基培养2 d。待脂滴成熟后弃细胞培养基,PBS洗2次,依次用4%多聚甲醛固定10 min;PBS洗1次;60%异丙醇室温静置孵育1~2 min;60%油红 O 工作液染色5 min;蒸馏水漂洗干净。于倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.2.3 检测成脂标志基因过氧化物酶体增殖物活化受体(PPAR) γ 及 aP2 的表达 miRNA-200c类似物或miRNA-200c抑制剂及各自阴性对照转染3T3-L1前体脂肪细胞后,待细胞生长至完全融合,更换为成脂诱导培养基。于诱导后48 h收集细胞并按照 OMEGA total RNA isolation 试剂盒说明书提取总RNA并进行逆转录。检测内参基因 β -actin、成脂标志基因PPAR γ 及 aP2 的表达,引物序列见表1。PCR反应体系总体积为20 μl ,具体为3 μl 的cDNA,终浓度为200 nmol/L的上、下游引物,10 μl 的SYBR Green qPCR试剂,去离子水补足至20 μl 。反应条件及计算方法同上。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件分析,正态分布的计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均

表1 各引物序列

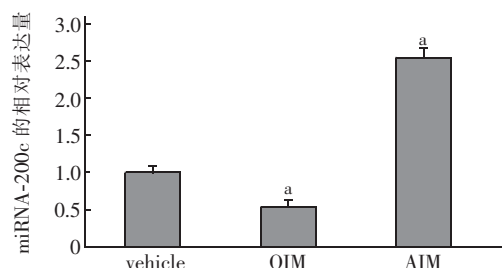
基因	引物序列(5'→3')	产物大小(bp)
β -actin	上游引物 GTCCCTCACCTCCCAAAAG	266
	下游引物 GCTGCCTCAAC ACCTCAACC	
aP2	上游引物 AAATCACCAGCAGACGACAGG	185
	下游引物 GGCTCATGCCCTTTCATAAAC	
PPAR γ	上游引物 CTTGACAGGAAAGACAACGG	168
	下游引物 GCTTCTACGGATCGAAACTG	

注: β -actin: β -肌动蛋白;aP2:表征基因 aP2;PPAR γ :过氧化物酶体增殖物活化受体 γ

数比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-200c 在 MSCs 成脂与成骨分化过程中的表达变化 miRNA-200c 在 MSCs 成脂分化培养基中表达上调, 是对照组的 2.54 倍 ($t = 24.709$, $P < 0.01$); 而其在成骨分化培养基中表达下降, 是对照组的 53% ($t = 8.783$, $P < 0.01$), 见图 1。



注: vehicle: 对照组; OIM: 成骨分化培养基组; AIM: 成脂分化培养基组; MSCs: 间充质干细胞; 与对照组相比, $^a P < 0.01$

图 1 miRNA-200c 在 MSCs 成脂、成骨分化过程中的表达变化

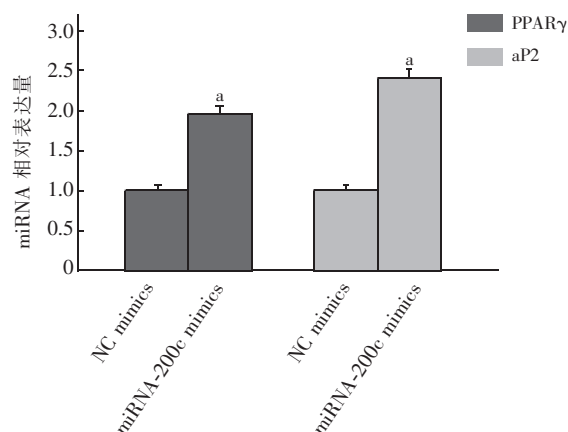
2.2 miRNA-200c 类似物及 miRNA-200c 抑制剂对 3T3-L1 前体脂肪细胞成脂分化的影响

2.2.1 油红 O 染色结果 与 NC mimics 组相比, miRNA-200c 类似物处理组 3T3-L1 前体脂肪细胞内脂滴增加, 见图 2 (封 2)。而 miRNA-200c 抑制剂处理组, 3T3-L1 前体脂肪细胞内脂滴减少, 见图 3 (封 2)。

2.2.2 实时 PCR 检测脂肪细胞特异性转录因子和表征基因表达 与 NC mimics 组相比, 转染 miRNA-200c 类似物组中 PPAR γ 、aP2 mRNA 的表达均上调, 见图 4。PPAR γ 的表达量是 NC mimics 组的 1.96 倍; aP2 的表达量是 NC mimics 组的 2.4 倍 ($t = 7.674$, 9.657 , P 均 < 0.01)。与 NC inhibitor 组相比, 转染 miRNA-200c 抑制剂组中 PPAR γ 的表达下降 55%; aP2 的表达量下降 49% ($t = 9.483$, 6.419 , P 均 < 0.01), 见图 5。

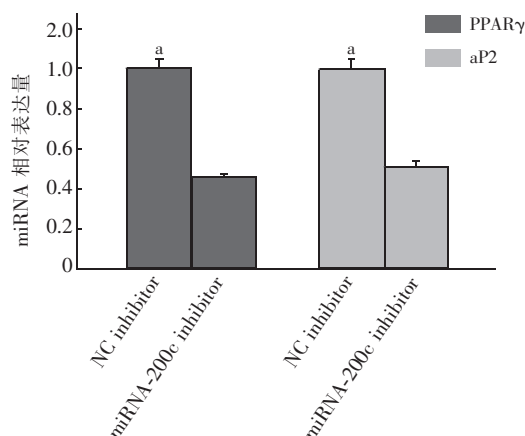
3 讨论

MSCs 在向成骨分化和向成脂分化过程中存在着相互制约的关系^[5]。一旦脂肪形成和骨生成的平衡被打乱, 将会引起一系列代谢相关疾病和发育异常疾病。如在骨质疏松等疾病中, 骨量减少常伴有明显的脂肪组织堆积^[6]。近年来一些研究发现, miRNA 在“成脂-成骨”分化平衡中发挥调控作用。miRNA 为长度约 20~25 nt 的内源性非编码小分子 RNA, 在转录后水平调节基因的表达, 且在进化中高度保守^[7]。miRNA 通过与靶基因的 mRNA 结合, 抑制靶基因蛋白翻译或导致 mRNA 降解, 其广泛存在于哺乳动物各种组织内, 参与多种生物学现象的调控, 如阶段性发育、细胞分化、信号转导和代谢等^[8-9]。



注: PPAR γ : 过氧化物酶体增殖物活化受体 γ ; aP2: 表征基因 aP2; miRNA-200c mimics: miRNA-200c 类似物; NC mimics: 阴性对照类似物; 与各自的 NC mimics 组相比, $^a P < 0.01$

图 4 转染 miRNA-200c 类似物后细胞中 aP2、PPAR γ 的 mRNA 相对表达量



注: PPAR γ : 过氧化物酶体增殖物活化受体 γ ; aP2: 表征基因 aP2; miRNA-200c inhibitor: miRNA-200c 抑制剂; NC inhibitor: 阴性对照抑制剂; 与各自的 NC inhibitor 组相比, $^a P < 0.01$

图 5 转染 miRNA-200c 抑制剂后细胞中 aP2、PPAR γ mRNA 的相对表达量

近年来有研究证实, miRNA 在脂肪细胞分化过程中具有重要作用。Li 等^[10]研究发现, miRNA-17-5p 和 miRNA-106a 通过靶向作用于骨形态发生蛋白 2 调控人脂肪 MSCs 分化, 减少成骨标志基因转录共激活因子 TAZ、肌节同源盒基因 2 和 Runt 相关转录因子 2 的表达, 抑制成骨分化, 增加脂肪细胞特异性转录因子 CCAAT/增强子结合蛋白 α 和 PPAR γ 的表达, 促进脂肪生成。Huang 等^[11]发现 miRNA-22 在脂肪细胞分化时表达下降, 在成骨细胞分化时表达增加。miRNA-22 通过与组蛋白去乙酰化酶 6 mRNA 的 3'UTR 结合抑制其翻译, 从而平衡 MSCs 向脂肪细胞和成骨细胞分化。本实验室研究发现, miRNA-30e 通过靶向抑制脂肪分化的负性调控因子低密度脂蛋白受体相关蛋白 6 而促进脂肪细胞的分化^[12]。

miRNA-200c 是 miRNA-200 家族中的一员, miRNA-200 家族还包括其他 4 个成员, 分别为

miRNA-200a、miRNA-200b、miRNA-141 和 miRNA-429^[13]。Lynch 等^[14]证实, miRNA-200c 在前列腺癌细胞中受表观遗传学调控, 检测其表达水平和甲基化水平可作为潜在的新的生物标志物, 并可作为诊断和治疗干预的依据。Jiang 等^[15]发现, 甲基化药物可以导致肾细胞癌细胞中 miRNA-200c 表达水平的上调。Reddy 和 Natarajan^[16]发现, miRNA-200c 在缓解糖尿病导致的内分泌紊乱方面有重要作用。但 miRNA-200c 与脂肪细胞分化关系的研究鲜见文献报道, Guo 等^[17]报道, 在小鼠肝癌动物肿瘤细胞 (Hep1-6) 和小鼠正常肝细胞 (NCTC1469) 中降低 miRNA-200c 的表达可以通过刺激 c-Jun 的表达和激活固醇调节元件结合蛋白 1 的转录, 从而导致异常的肝脂肪堆积。这在一定程度上揭示了 miRNA-200c 与脂肪形成的关系, 但 miRNA-200c 在脂肪前体细胞中的作用机制还不清楚, 因此本研究采用了 3T3-L1 前体脂肪细胞来研究 miRNA-200c 与脂肪细胞的关系。本研究采用 miRNA 芯片技术检测 miRNA 在小鼠骨髓 MSCs 向脂肪细胞分化过程中的差异表达, 结果显示, miRNA-200c 的表达在 MSCs 成脂过程中显著升高, miRNA-200c 类似物促进 3T3-L1 前体脂肪细胞成脂过程中特异性基因的表达, 抑制内源性 miRNA-200c 的表达则抑制特异性基因的表达。为进一步研究 miRNA-200c 对脂肪分化的作用, 观察在体外转染人工合成的 miRNA-200c 类似物及抑制剂对于 3T3-L1 前体脂肪细胞的作用, 结果显示, 与对照组相比, 转染 miRNA-200c 类似物后脂滴明显增多, 脂肪细胞分化关键转录因子 PPAR γ 表达量显著增加, 脂肪细胞表征因子 aP2 也显著升高。而转染 miRNA-200c 抑制剂后, 则抑制细胞分化为成熟的脂肪细胞。对于 miRNA-200c 促进成脂的作用机制, 本课题组将筛选它的靶基因, 并在后续实验中进行相关机制的研究。

参 考 文 献

- [1] Qin Y, Guan J, Zhang C. Mesenchymal stem cells: mechanisms and role in bone regeneration [J]. Postgrad Med J, 2014, 90 (1069): 643-647. DOI: 10.1136/postgradmedj-2013-132387.
- [2] Lee EK, Lee MJ, Abdelmohsen K, et al. miR-130 suppresses adipogenesis by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression [J]. Mol Cell Biol, 2011, 31 (4): 626-638. DOI: 10.1128/MCB.00894-10.
- [3] Son YH, Ka S, Kim AY, et al. Regulation of adipocyte differentiation via microRNAs [J]. Endocrinol Metab (Seoul), 2014, 29 (2): 122-135. DOI: 10.3803/EnM.2014.29.2.122.
- [4] 柴三葆, 杨金奎. 骨髓间充质干细胞转化为胰岛样细胞的研究进展 [J]. 国际内分泌代谢杂志, 2005, 25 (z1): 52-54. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2005.z1.021.
- [5] Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program [J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66 (2): 236-253. DOI: 10.1007/s00018-008-8429-z.
- [6] Chen HT, Lee MJ, Chen CH, et al. Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures [J]. J Cell Mol Med, 2012, 16 (3): 582-593. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01335.x.
- [7] Tran N, Hutvagner G. Biogenesis and the regulation of the maturation of miRNAs [J]. Essays Biochem, 2013, 54: 17-28. DOI: 10.1042/bse0540017.
- [8] Ul Hussain M. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action [J]. Cell Tissue Res, 2012, 349 (2): 405-413. DOI: 10.1007/s00441-012-1438-0.
- [9] Chen D, Farwell MA, Zhang B. MicroRNA as a new player in the cell cycle [J]. J Cell Physiol, 2010, 225 (2): 296-301. DOI: 10.1002/jcp.22234.
- [10] Li H, Li T, Wang S, et al. miR-17-5p and miR-106a are involved in the balance between osteogenic and adipogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. Stem Cell Res, 2013, 10 (3): 313-324. DOI: 10.1016/j.scr.2012.11.007.
- [11] Huang S, Wang S, Bian C, et al. Upregulation of miR-22 promotes osteogenic differentiation and inhibits adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by repressing HDAC6 protein expression [J]. Stem Cells Dev, 2012, 21 (13): 2531-2540. DOI: 10.1089/scd.2012.0014.
- [12] Wang J, Guan X, Guo F, et al. miR-30e reciprocally regulates the differentiation of adipocytes and osteoblasts by directly targeting low-density lipoprotein receptor-related protein 6 [J]. Cell Death Dis, 2013, 4: e845. DOI: 10.1038/cddis.2013.356.
- [13] Pieraccioli M, Imbastari F, Antonov A, et al. Activation of miR200 by c-Myb depends on ZEB1 expression and miR200 promoter methylation [J]. Cell Cycle, 2013, 12 (14): 2309-2320. DOI: 10.4161/cc.25405.
- [14] Lynch SM, O'Neill KM, McKenna MM, et al. Regulation of miR-200c and miR-141 by methylation in prostate cancer [J]. Prostate, 2016, 76 (13): 1146-1159. DOI: 10.1002/pros.23201.
- [15] Jiang J, Yi BO, Ding S, et al. Demethylation drug 5-Aza-2'-deoxycytidine-induced upregulation of miR-200c inhibits the migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition of clear cell renal cell carcinoma *in vitro* [J]. Oncol Lett, 2016, 11 (5): 3167-3172. DOI: 10.3892/ol.2016.4364.
- [16] Reddy MA, Natarajan R. Targeting miR-200c to ameliorate diabetes-induced endothelial dysfunction [J]. Diabetes, 2016, 65 (5): 1152-1154. DOI: 10.2337/dbi16-0006.
- [17] Guo J, Fang W, Sun L, et al. Reduced miR-200b and miR-200c expression contributes to abnormal hepatic lipid accumulation by stimulating JUN expression and activating the transcription of srebp1 [J]. Oncotarget, 2016, 7 (24): 36207-36219. DOI: 10.18632/oncotarget.9183.

(收稿日期: 2016-04-18)