

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.17.021

miR-20b 在肥胖小鼠脂肪组织中的表达及对前脂肪细胞增殖和分化的影响

王晓伟¹, 张志远², 王晓经³

(1. 温州医科大学附属新昌医院内分泌科, 浙江温州 325000; 2. 温州医科大学附属新昌医院感染科, 浙江温州 325000; 3. 日本信州大学, 日本松本 3908621)

[摘要] **目的** 探究 miR-20b 在肥胖小鼠不同脂肪组织中的表达情况及对小鼠前体脂肪细胞(3T3-L1)增殖、分化的影响。**方法** 构建 C57BL/6 小鼠的肥胖模型, 实时荧光定量 PCR 检测性腺脂肪(g-Fat)、腹股沟脂肪(i-Fat)及肾周脂肪(p-Fat)组织中 miR-20b 表达水平。培养并诱导 3T3-L1 细胞, 脂质体法将 miR-20b mimic(miR-20b mimic 组)、miR-20b inhibitor(miR-20b inhibitor 组)和阴性对照(NC 组)转染至 3T3-L1 细胞, CCK-8 法和 EdU 法检测 miR-20b 对 3T3-L1 细胞增殖的影响; 油红 O 染色与三酰甘油测定评估 miR-20b 对 3T3-L1 细胞分化的影响; 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 分别检测 miR-20b 对 3T3-L1 细胞中增殖、分化标志物 mRNA 和蛋白表达的影响; 双荧光素酶报告基因检测法验证 miR-20b 靶向调控 3T3-L1 细胞分化的基因。**结果** 与正常对照组小鼠比较, 肥胖造模组小鼠 g-Fat、i-Fat、p-Fat 中 miR-20b 均显著高表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 NC 组比较, miR-20b mimic 组 3T3-L1 细胞增殖受抑制, miR-20b inhibitor 组 3T3-L1 细胞增殖明显提高(均 $P < 0.05$); 与 NC 组比较, miR-20b mimic 组积累了大量油红着色的脂滴, 三酰甘油水平增加, 而 miR-20b inhibitor 组效果相反; 与 NC 组比较, miR-20b mimic 组增殖标志物细胞周期蛋白质(Cyclin D1、Cyclin E)与细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK2、CDK4)mRNA 和蛋白的表达水平受抑制, 分化标志物过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR γ)、CCAAT-增强子结合蛋白(C/EBP α)、脂肪酸结合蛋白(FABP4)、脂蛋白酯酶(LPL)和超长链脂肪酸延伸酶(ELOVL6)mRNA 和蛋白的表达水平明显升高, 而 miR-20b inhibitor 组则表现出相反现象; 过表达 miR-20b 可抑制野生型 T 细胞因子 4(Tcf4)基因荧光素酶活性, 而突变绑定位点可废除该抑制效应。**结论** miR-20b 不仅在脂肪组织中高表达, 还可抑制前脂肪细胞 3T3-L1 增殖, 促进其诱导分化、沉积脂滴, 并可能通过靶向调节 Tcf4 来介导 3T3-L1 分化。

[关键词] 微 RNA-20b; 3T3-L1 前脂肪细胞; 脂肪组织; 增殖; 细胞分化**[中图分类号]** R589**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)17-2870-07

Expression of miR-20b in adipose tissue of obese mice and its effect on proliferation and differentiation of preadipocytes

WANG Xiaowei¹, ZHANG Zhiyuan², WANG Xiaojing³

(1. Department of Endocrinology, Xinchang Hospital Affiliated to Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China; 2. Department of Infection, Xinchang Hospital Affiliated to Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China; 3. Shinshu University, Matsumoto 3908621, Japan)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of miR-20b in different adipose tissue of obese mice and its effect on the proliferation and differentiation of mouse 3T3-L1 cells. **Methods** The obese model of C57BL/6 mice was constructed. Real-time PCR (RT-PCR) was used to detect the expression of miR-20b in gonadal fat (g-Fat), inguinal fat (i-Fat) and perirenal adipose (p-Fat); 3T3-L1 cells were cultured and induced, and liposome method was used to transfect the miR-20b mimic (miR-20b mimic group), the miR-20b inhibitor (miR-20b inhibitor group) and the negative control sequence (NC group) into 3T3-L1 cells. The effect of miR-20b on the proliferation of 3T3-L1 cells was detected by CCK-8 method and EdU method; Oil red O staining and triglyceride determination were done to evaluate the effect of miR-20b on differentiation of 3T3-L1 cells; RT-PCR and Western blot were used to detect the effect of miR-20b on the expression level of mRNAs and proteins of proliferation and differentiation markers; The dual luciferase reporter assay was used to

verify that miR-20b regulates the differentiation target gene of 3T3-L1 cells. **Results** Compared with the NC group, the expression level of miR-20b in g-Fat, i-Fat, p-Fat of the obese model group were increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the NC group, the proliferation of 3T3-L1 cells was significantly inhibited in the miR-20b mimic group, and was significantly improved in the miR-20b inhibitor group. Compared with the NC group, the miR-20b mimic group accumulated a large number of oil-red colored lipid droplets, and the triglyceride content increased, but the miR-20b inhibitor group had the opposite effect; Compared with the NC group, the mRNA and protein expression levels of proliferation markers, cell cycle proteins (Cyclin D1, Cyclin E) and cyclin-dependent kinases (CDK2, CDK4) in miR-20b mimic group were significantly suppressed, while the differentiation markers, such as peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ), CCAAT-enhancer binding protein (C/EBP α), fatty acid binding protein (FABP4), lipoprotein ester Enzyme (LPL) and ultra-long chain fatty acid elongase (ELOVL6) were significantly increased, the miR-20b inhibitor group showed the opposite phenomenon; miR-20b could significantly inhibit wild-type Tcf4 luciferase activity, and the mutation binding site could abolish the inhibitory effect. **Conclusion** miR-20b is not only highly expressed in adipose tissue, but also inhibits the proliferation of 3T3-L1 preadipocytes, promotes its differentiation and deposits lipid droplets. miR-20b may mediate 3T3-L1 preadipocyte differentiation by targeting Tcf4.

[Key words] miR-20b; 3T3-L1 preadipocytes; adipose tissue; proliferation; cell differentiation

随着全球经济的迅速发展,肥胖症的发生变得越来越普遍,其严重影响人类的健康^[1]。肥胖病症生理过程的核心是脂肪细胞的过度增殖和分化导致体内脂肪量的过度增加^[2],因此,对脂肪细胞的研究可为脂肪形成与脂质代谢分子机制的研究提供理论基础,也可对肥胖相关疾病的诊治提供新方案。研究表明,miRNAs在脂肪细胞的生物学过程中具有重要的调节功能^[3-5]。例如,KARBIENER等^[6]报道 miR-27b通过靶向调控过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)抑制人前脂肪细胞的分化;张丽华等^[7]发现 miR-92a-3p通过下调相关细胞周期标志基因和蛋白来抑制前脂肪细胞增殖、促进成脂分化相关基因和蛋白表达。miR-20b广泛参与生物学调控过程,如抑制膀胱癌细胞增殖与迁移,降低乳腺癌细胞血管内皮生长因子表达,调控肝癌相关蛋白的表达等^[8-9]。然而,miR-20b在脂肪细胞中相关作用的研究却相对较少,本文旨在探究 miR-20b在小鼠前脂肪细胞 3T3-L1 增殖、分化中的作用及相关分子机制,以期为进一步研究 miRNAs 调控脂肪细胞的发育提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与饲料

20只C57BL/6小鼠,雌雄均可,体重20~25g,清洁级,购自中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心,合格证号为SCXK(津)2016-0003。基础饲料购自南通特洛菲饲料科技有限公司,高脂肪高营养饲料的配方为:每100g基础饲料添加奶粉10g、猪油10g、鸡蛋1个、浓鱼肝油10滴(含维生素A 17 000 U、维生素D 1 700 U)、新鲜黄豆芽250g,配好后用塑料袋密封包装,保存于4℃。

1.2 主要材料与试剂

3T3-L1细胞购自中国科学院干细胞库,CCK-8试剂盒、RIPA裂解液、BCA蛋白试剂盒和ECL显色

液购自中国碧云天生物公司,TRizol试剂盒、Prime Script TM RT reagent试剂盒和SYBR Premix Ex Taq II试剂盒购自日本TaKaRa公司,TaqMan[®] miRNA Reverse Transcription试剂盒和TaqMan miRNA Assays试剂盒购自美国ABI公司,Dual-Luciferase Reporter Assay System试剂盒购自美国Promega公司,油红O染液、Lipofectamine 2000转染试剂、青霉素、链霉素、L-谷氨酰胺、胰岛素、地塞米松和3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)等购自美国Sigma公司。4%多聚甲醛和EdU试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司,抗体Cyclin D1、Cyclin E、CDK2、CDK4、PPAR γ 、CCAAT-增强子结合蛋白(C/EBP α)、脂肪酸结合蛋白(FABP4)、脂蛋白酯酶(LPL)、超长链脂肪酸延伸酶(ELOVL6)、 β -actin及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG购自美国Santa Cruz公司。

1.3 方法

1.3.1 动物造模与脂肪组织采集

将20只C57BL/6小鼠随机分为正常对照组和肥胖造模组,正常对照组喂以基础饲料,肥胖造模组喂以高脂肪高营养饲料,小鼠可自由饮水,标准实验性饲养房温度设为(22±4)℃,相对湿度为40%~60%,昼夜比12:12。喂养12周后,脱颈处死小鼠,并迅速采集性腺脂肪(g-Fat)、腹股沟脂肪(i-Fat)及肾周脂肪(p-Fat)组织置于液氮,随后将样品转移至-80℃保存。

1.3.2 细胞培养与诱导分化

在3T3-L1细胞中加入含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素和2 mmol/L L-谷氨酰胺的DMEM高糖培养液,于37℃、5% CO₂培养箱中培养。诱导3T3-L1细胞分化的步骤为:待培养的细胞密度达到80%时,去除高糖培养液,换用诱导液(DMEM+10%胎牛血清+1.7 μ mol/L胰岛素+1

$\mu\text{mol/L}$ 地塞米松 + $0.5 \mu\text{mol/L}$ IBMX) 培养 3 d; 随后诱导液替换为维持液 (DMEM + 10% 胎牛血清 + $1.7 \mu\text{mol/L}$ 胰岛素) 培养 3 d; 最后继续用 DMEM 高糖培养液培养。

1.3.3 细胞转染

取生长状态良好的 3T3-L1 细胞接种于十二孔板内, 每孔细胞数约为 1×10^5 个, 细胞融合度达到 80% 左右时进行转染实验。将 Lipofectamine 2000 分别与 50 nmol/L miR-20b mimic(miR-20b mimic 组)、 100 nmol/L miR-20b inhibitor(miR-20b inhibitor 组) 和 50 nmol/L 阴性对照序列(NC 组) 混合后转染至 3T3-L1 细胞中。于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 6 h 后, 更换新鲜培养基, 继续培养 24 h。为保证转染效果, 转染每 2 天执行 1 次。

1.3.4 CCK-8 检测

根据 CCK-8 增殖检测试剂盒操作说明, 检测转染后各组 3T3-L1 细胞的增殖情况, 分别在转染后 0、12、24、48、72 h, 每孔被处理的细胞中加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液, 细胞培养箱中继续孵育 1.5 h 后, 用酶标仪测定在 450 nm 波长处的吸光度(A)值。

1.3.5 EdU 检测

各组 3T3-L1 细胞转染 24 h 后, 将培养液更换 $10 \mu\text{mol/L}$ EdU 溶液, 于 37°C 、5% CO_2 的培养箱继续孵育 12 h。随后用 4% 多聚甲醛固定液固定, 根据 EdU 试剂盒操作说明检测 EdU 标记的新生成细胞, 由 Olympus IX53 荧光显微镜采集图片。

1.3.6 油红 O 染色及胞内三酰甘油水平测定

将转染后的 3T3-L1 细胞进行诱导分化后, 在第 8 天用 PBS 冲洗 3 次, 然后 4% 多聚甲醛室温固定 2 h, PBS 洗涤 3 次, 再使用油红 O 工作液室温下染色 1 h, PBS 清洗 3 次, 每孔加入 PBS 将油红 O 着色后的细胞覆盖, 在显微镜下观察 3T3-L1 细胞的分化情况, 并拍照; 接着每孔加 $200 \mu\text{L}$ 异丙醇, 振荡 5 min, 萃取与脂滴结合的油红 O, 用酶标仪测定在 510 nm 波长处的 A 值。

1.3.7 实时荧光定量 PCR

使用 TRizol 试剂盒提取脂肪组织和各处理组 3T3-L1 细胞总 RNA, 根据 TaqMan[®] miRNA Reverse Transcription 试剂盒和 Prime Script[™] RT reagent 试剂盒进行反转录分别获取 miRNA、mRNA 对应的 cDNA。采用 qRT-PCR 分别检测脂肪组织中 miR-20b 和 3T3-L1 细胞增殖、分化标志基因的表达情况: (1) TaqMan miRNA Assays 试剂盒进行脂肪组织中 miR-20b 检测, 以 U6 作为内参。反应条件为: 95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 60 s, 扩增 40 次。(2) SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒检测 3T3-L1 细胞增殖、分化相关标志基因的表达情况, 以 β -actin 为内参。扩增条件为 95°C 3 min; 95°C 30 s, 58°C 30 s, 58°C 30 s, 40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法来计算 miRNA 与各基

因 mRNA 的相对表达水平。引物序列均由上海生物工程技术有限公司合成, 见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因	方向	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
Cyclin D1	正向	GTTGCTGGAATTTTCGGGGT	168
	反向	AGCGTCCCTGTCTTCTTTCA	
Cyclin E	正向	AGCCTCGGAAAATCAGACCA	159
	反向	TCCTGTGCCAAGTAGAACGT	
CDK4	正向	GTCAGTTTCTAAGCGGCTG	181
	反向	CACGGGTGTTGCGTATGTAG	
CDK2	正向	CCCTTCCAAAAGCCCTTTTC	132
	反向	GAAGAGGGGAAGAAGCTGGT	
PPAR γ	正向	CTCCAAGAATACCAAAGTGC GA	142
	反向	GCCTGATGCTTTATCCCAACA	
C/EBP α	正向	CAAGAACAGCAACGAGTACCG	126
	反向	GTCACTGGTCAACTCCAGCAC	
FABP4	正向	TTTCCTTCAAACCTGGGCGTG	164
	反向	CATTCACCACCAGCTTGTC	
LPL	正向	TGGCGTAGCAGGAAGTCTGA	153
	反向	TGCCCTCATTTGGGATAAATGTC	
ELOVL6	正向	AAGCACGCTCTATCTCCTGTT	116
	反向	CTGCGTGTGTATGATCCCATGAA	
miR-20b	正向	TGTCAACGATACGCTACGA	52
	反向	GCTCATAGTGCAGGTAGA	
β -actin	正向	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC	128
	反向	TAAAACGCAGCTCAGTAAACAGTCCG	
U6	正向	GCTTCGGCAGCACATACTAAAAT	94
	反向	CGCTTCACGAATTTGCGTGTGCAT	

1.3.8 Western blot

使用蛋白提取试剂盒抽提各处理组 3T3-L1 细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离蛋白, 切胶并转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 4 h, 分别滴加 Cyclin D1(1 : 400)、Cyclin E(1 : 400)、CDK2(1 : 300)、CDK4(1 : 300)、PPAR γ (1 : 400)、C/EBP α (1 : 500)、FABP4(1 : 500)、LPL(1 : 400)、ELOVL6(1 : 500)和 β -actin(1 : 500) 一抗, 4°C 孵育过夜。滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1 : 1 000) 二抗, 室温孵育 2 h。采用 ECL 发光显影, 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析蛋白质灰度值。

1.3.9 双荧光素酶报告基因分析

野生型(WT-Tcf4)和突变型(MUT-Tcf4) Tcf4 的 3'-UTR 序列由上海生物工程技术有限公司设计与合成。将两种基因片段分别与 Pscheck2 载体进行连接, 构建 Tcf4-3'-UTR 双荧光素酶报告基因野生型载体与突变型载体。使用 Lipofactamine 2000 分别将

50 nmol/L miR-20b mimic 或阴性对照序列联合 0.1 μ g MUT-Tcf4-3'-UTR 质粒或 0.1 μ g WT-Tcf4-3'-UTR 质粒转染入密度为 80% 左右的 3T3-L1 细胞中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 24 h 后,根据双荧光素酶试剂盒操作说明检测各组细胞荧光素酶活性。

1.4 统计学处理

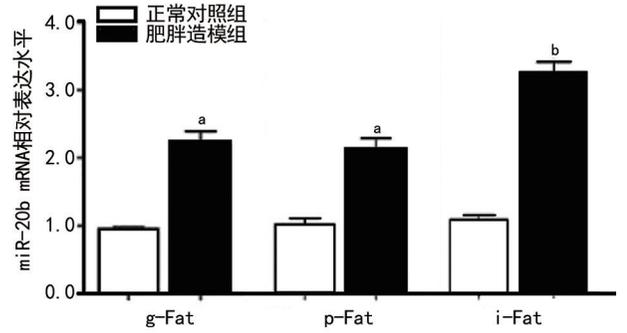
采用 SPSS20.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用独立标本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-20b 在肥胖小鼠脂肪组织中高表达

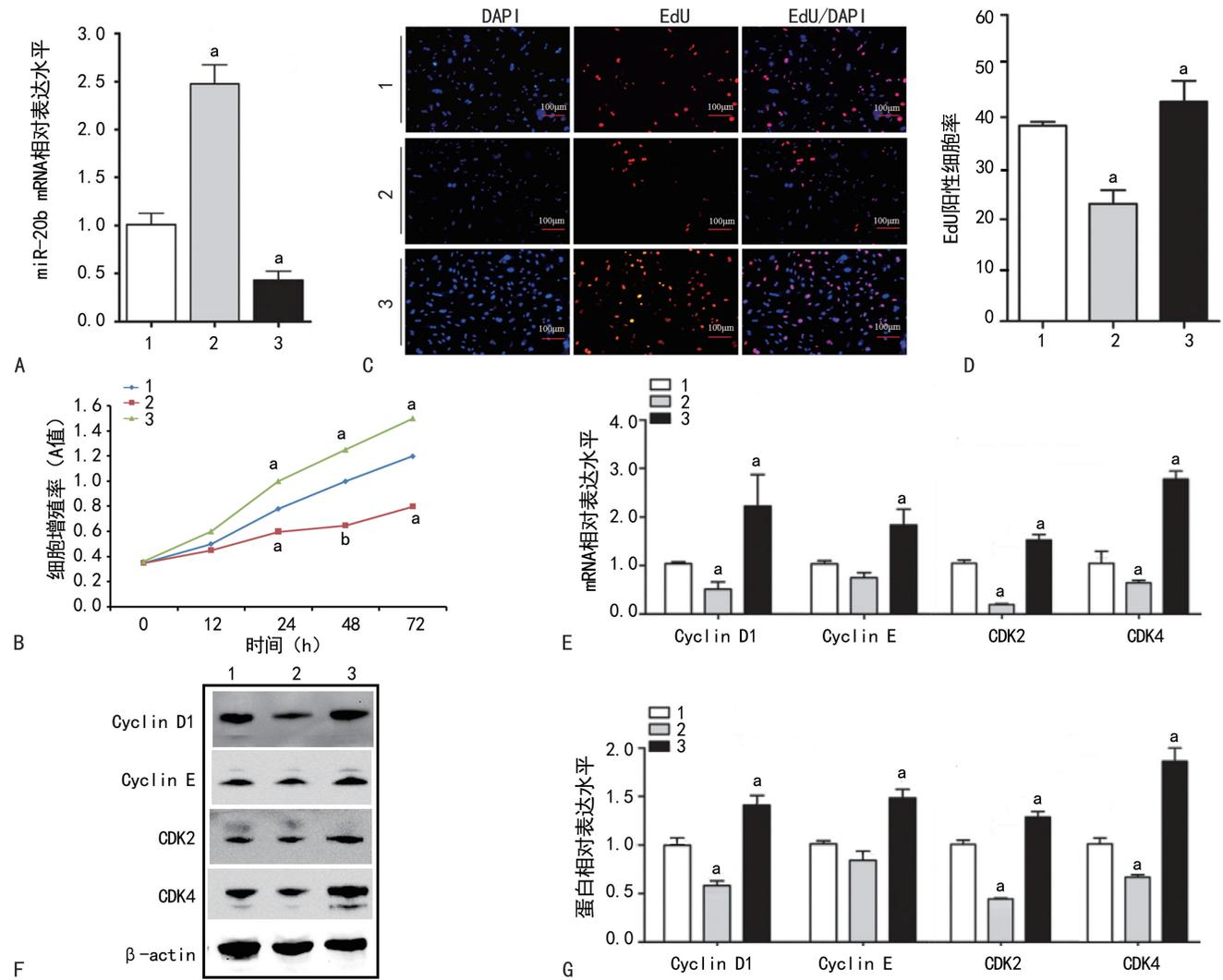
造模前,正常对照组和肥胖造模组的小鼠体重差异无统计学意义 ($P > 0.05, n = 10$);造模后,肥胖造模组小鼠和正常对照组小鼠体重分别为 (36.56 \pm 3.21)g 与 (25.12 \pm 2.04)g,肥胖造模组小鼠体重较正

常对照组小鼠增加了 44.54%,造模成功。qRT-PCR 检测了正常对照组和肥胖造模组小鼠的脂肪组织中 miR-20b 的表达水平,结果显示,与正常对照组小鼠比较,miR-20b 在肥胖造模组小鼠 g-Fat、p-Fat、i-Fat 均显著高表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见图 1。



a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

图 1 miR-20b mRNA 在不同脂肪组织中的表达水平



A: qRT-PCR 检测各组 3T3-L1 细胞中 miR-20b mRNA 的表达水平; B: CCK-8 检测各组 3T3-L1 细胞的增殖情况; C: EdU 检测 3T3-L1 细胞增殖情况 ($\times 200$); D: EdU 阳性细胞占比统计; E: qRT-PCR 检测各组 3T3-L1 细胞中 Cyclin D1、Cyclin E、CDK2、CDK4 mRNA 表达水平; F: Western blot 检测各组 3T3-L1 细胞中 Cyclin D1、Cyclin E、CDK2、CDK4 蛋白表达水平; G: Western blot 分析图。1: NC 组; 2: miR-20b mimic 组; 3: miR-20b inhibitor 组。a: $P < 0.05$, 与 NC 组比较。

图 2 miR-20b 对 3T3-L1 细胞增殖的影响

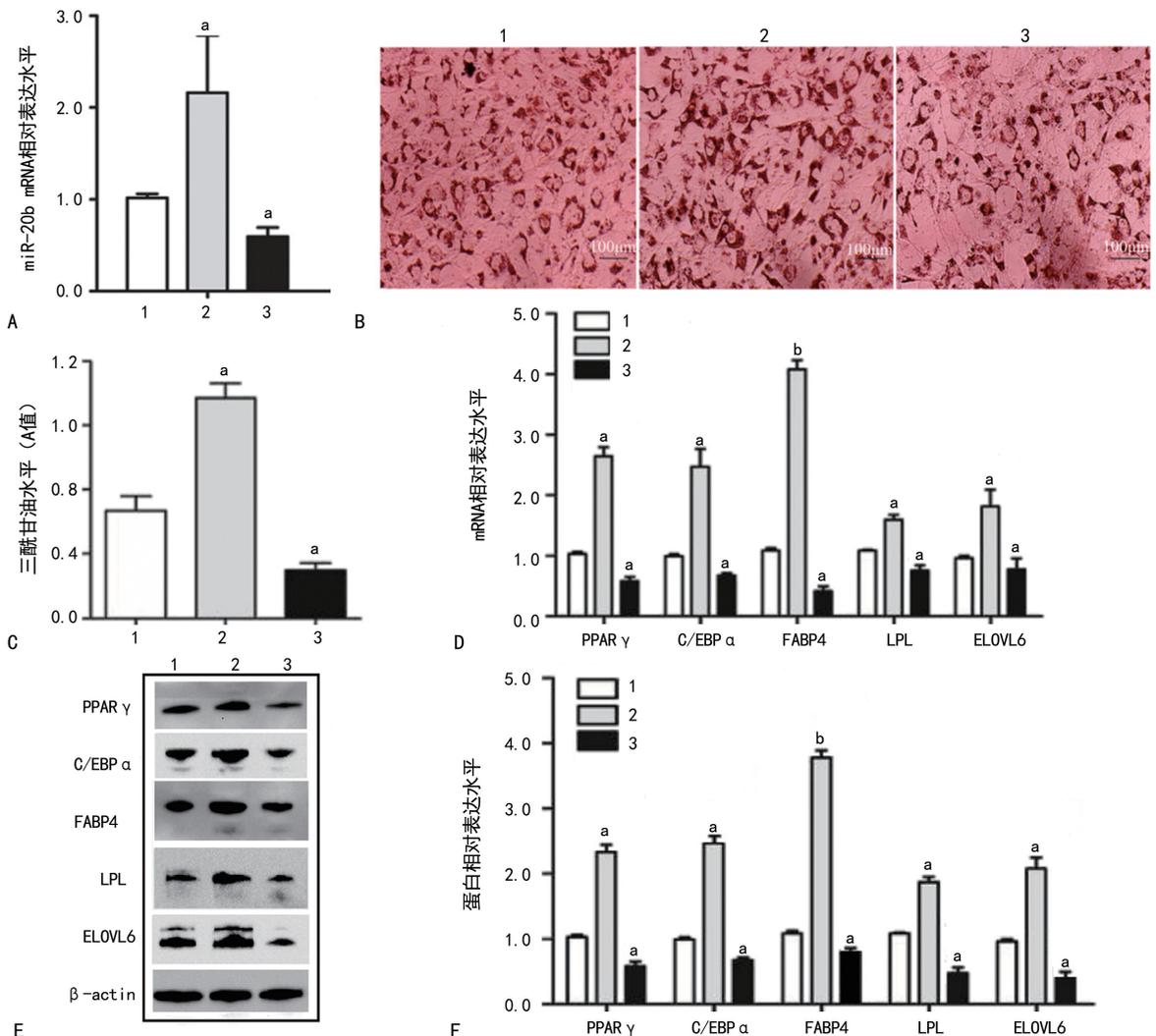
2.2 miR-20b 抑制 3T3-L1 细胞的增殖

与 NC 组比较,miR-20b mimic 组 miR-20b mRNA 的表达水平显著增加,而 miR-20b inhibitor 组的表达水平显著降低($P < 0.05$),图 2A,转染成功。与 NC 组比较,24、72 h 时 miR-20b mimic 组 3T3-L1 细胞的增殖降低;而 miR-20b inhibitor 具有相反的效果($P < 0.05$),图 2B。与 NC 组比较,miR-20b mimic 组 EdU 阳性细胞比率下降($P < 0.05$),而 miR-20b inhibitor 组 EdU 阳性细胞比率增加($P < 0.05$),图 2C、D。与 NC 组比较,miR-20b mimic 组的 3T3-L1 前脂肪细胞中 Cyclin D1、Cyclin E、CDK2 和 CDK4 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著下降($P < 0.05$);相反,miR-20b inhibitor 组以上细胞因子在 mRNA 和蛋白表达水平上均显著增加($P < 0.05$),见图 2E~G,说明过表达 miR-20b 可能抑制 3T3-L1 前脂肪细

胞的增殖。

2.3 miR-20b 促进前脂肪细胞的分化

与 NC 组比较,转染 miR-20b mimic、inhibitor 可分别增加或抑制 3T3-L1 细胞中 miR-20b 的表达($P < 0.05$),见图 3A。对转染后诱导分化第 8 天的细胞进行油红 O 染色和三酰甘油分析,结果显示与 NC 组比较,miR-20b mimic 组细胞分化迹象明显,脂滴较多较大,三酰甘油水平增加($P < 0.05$),而 miR-20b inhibitor 组结果与此相反($P < 0.05$),见图 3B、C。与 NC 组比较,miR-20b mimic 组的 3T3-L1 细胞中 PPAR γ 、C/EBP α 、LPL、ELOVL6 和 FABP4 的 mRNA 和蛋白表达水平显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而 miR-20b inhibitor 组以上脂肪细胞分化标志物在 mRNA 和蛋白表达水平上均显著下降($P < 0.05$),图 3D~F。

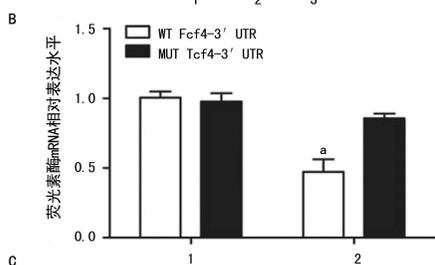
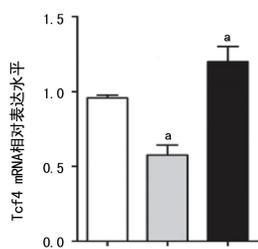
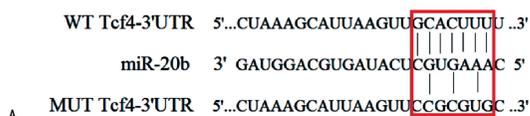


A: qRT-PCR 检测各组 3T3-L1 细胞 miR-20b mRNA 的表达水平;B: 油红 O 对各组 3T3-L1 细胞内脂滴染色($\times 200$);C: 各组 3T3-L1 细胞中三酰甘油水平;D: RT-PCR 检测各组 3T3-L1 细胞中 PPAR γ 、C/EBP α 、FABP4、LPL、ELOVL6 mRNA 的表达水平;E: Western blot 检测各组 3T3-L1 细胞中 PPAR γ 、C/EBP α 、FABP4、LPL、ELOVL6 蛋白的表达水平;F: Western blot 分析图。^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与 NC 组比较;1: NC 组;2: miR-20b mimic 组;3: miR-20b inhibitor 组。

图 3 miR-20b 对 3T3-L1 细胞分化的影响

2.4 miR-20b 靶向 Tcf4 基因调控 3T3-L1 前脂肪细胞分化

利用 TargetScan 和 miRanda 软件对 miR-20b 的靶基因进行预测,结果显示 Tcf4 3'-UTR 区存在与 miR-20b 的互补序列,见图 4A。与 NC 组比较,miR-20b mimic 组 Tcf4 mRNA 的相对表达水平显著降低,而 miR-20b inhibitor 组 Tcf4 mRNA 相对表达水平显著增加($P < 0.05$),见图 4B。双荧光素酶报告系统实验结果显示,与 NC 组比较,过表达 miR-20b 可显著抑制野生型 Tcf4 的 3'-UTR 荧光素酶活性($P < 0.05$),而突变相应的结合位点后,该抑制作用被解除,表明 miR-20b 可直接靶向结合 Tcf4,见图 4C。



A: miR-20b 与 Tcf4 靶向关系预测; B: qRT-PCR 检测各组 3T3-L1 细胞中 Tcf4 mRNA 相对表达水平; C: 双荧光素酶报告系统实验分析各组细胞荧光素酶活性。1: NC 组; 2: miR-20b mimic 组; 3: miR-20b inhibitor 组。^a: $P < 0.05$, 与 NC 组比较。

图 4 miR-20b 靶向 Tcf4 基因调控 3T3-L1 细胞分化

3 讨论

近年来,关于 miRNA 与脂肪细胞的生长、发育和分化的研究越来越多。通过高通量测序技术和 miRNA 微阵列分析,已鉴定了大量在脂肪细胞中差异表达的 miRNAs,这些 miRNAs 在脂肪形成过程中扮演重要角色。例如,miR-26b 和 miR-183 促进脂肪生成,miR-185 和 miR-709 降低脂肪生成并抑制前脂肪细胞的分化^[10-13]。本研究中,笔者发现与饲喂基础饲料的小鼠相比,miR-20b 在高脂饲料诱导的肥胖小鼠的不同脂肪组织中均显著高表达,暗示 miR-20b 可能与脂质生成相关。

肥胖是脂肪细胞大小和数量增加的结果,前脂肪细胞经分化产生成熟的脂肪细胞,并存在于脂肪组织中,因此,控制这一过程可以改善肥胖和肥胖相关综

合征的发生。已有研究表明,miRNAs 对 3T3-L1 细胞增殖分化具有调控作用^[14-15]。本研究通过将 miR-20b mimic 与 inhibitor 转染到分化期的 3T3-L1 细胞中,实验结果证明 miR-20b 可抑制 3T3-L1 细胞增殖,促进其分化及脂滴累积。脂肪细胞的增殖和分化受到许多因子的调控^[16]。通过本研究的 qRT-PCR 和 Western blot 分析显示,过表达 miR-20b 可抑制 CDK2、CDK4、Cyclin D1、Cyclin E mRNA 和蛋白的表达水平,同时促进 PPAR γ 、C/EBP α 、FABP4、LPL、ELOVL6 脂肪细胞分化标志物 mRNA 和蛋白的表达。此外,油红 O 染色显示,过表达 miR-20b 后细胞分化迹象明显,脂滴增大,而成熟的脂肪细胞具有在脂滴中以三酰甘油的形式储存多余脂质的能力。通过三酰甘油分析发现,过表达或抑制 miR-20b 可增加或者降低三酰甘油积累。这些结果均表明,miR-20b 可通过调节增殖、分化关键因子来抑制 3T3-L1 细胞增殖并促进细胞分化。

在本研究中,笔者预测到 Tcf4 的 3'UTR 含有与 miR-20b 种子序列的反向互补序列,在 3T3-L1 细胞中过表达或抑制 miR-20b 可显著降低或促进 Tcf4 mRNA 水平,并通过双荧光素酶实验证明了 Tcf4 是 miR-20b 的直接靶基因。Tcf4 是 Wnt 通路的重要成员,通过与细胞核内 β -catenin 相结合介导 Wnt 通路下游的效应^[17]。Wnt10b 和 β -catenin 的下调均可导致脂肪生成的增加,而 β -catenin 的稳定表达可抑制脂肪的形成,因此可认为 β -catenin/Tcf4 信号通路是脂肪细胞分化的重要调节通路^[18]。

综上所述,miR-20b 在脂肪组织中的表达水平较高,其作为潜在脂肪细胞发育的调控因子,不仅可抑制前体脂肪细胞增殖,同时可通过靶向调节 Tcf4 的表达来促进前脂肪细胞分化为成熟的脂肪细胞,此结果可为肥胖症治疗提供新的研究思路。

参考文献

- [1] XIA Q, CAI H, XIANG Y B, et al. Prospective cohort studies of birth weight and risk of obesity, diabetes, and hypertension in adulthood among the Chinese population[J]. J Diabetes, 2019, 11(1): 55-64.
- [2] PARK H, LEE H W, YOO J, et al. Body mass index and prognosis in ischemic stroke patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Front Neurol, 2019, 10: 563.
- [3] CUI J, ZHOU B, ROSS S A, et al. Nutrition, microRNAs, and human health[J]. Adv Nutr, 2017, 8(1): 105-112.
- [4] JIN Y, WANG J, ZHANG M, et al. Role of bta-

- miR-204 in the regulation of adipocyte proliferation, differentiation, and apoptosis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(7):11037-11046.
- [5] DU J, ZHANG P, GAN M, et al. MicroRNA-204-5p regulates 3T3-L1 preadipocyte proliferation, apoptosis and differentiation [J]. *Gene*, 2018, 668: 1-7.
- [6] KARBIENER M, FISCHER C, NOWITSCH S, et al. MicroRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets ppargamma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 390(2):247-251.
- [7] 张丽华, 欧阳丹, 徐立凤, 等. miR-92a-3p 对 3T3-L1 前体脂肪细胞增殖与分化的影响 [J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(11):1450-1455.
- [8] CASCIO S, D' ANDREA A, FERLA R, et al. miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 alpha and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 224(1): 242-249.
- [9] SHIN Y, KIM D Y, KO J Y, et al. Regulation of KLF12 by microRNA-20b and microRNA-106a in cystogenesis [J]. *FASEB J*, 2018, 32(7): 3574-3582.
- [10] LI G, NING C, MA Y, et al. miR-26b promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through targeting PTEN [J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(8): 672-681.
- [11] CHEN C, XIANG H, PENG Y L, et al. Mature miR-183, negatively regulated by transcription factor GATA3, promotes 3T3-L1 adipogenesis through inhibition of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway by targeting LRP6 [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(6):1155-1165.
- [12] NING C, LI G, YOU L, et al. MiR-185 inhibits 3T3-L1 cell differentiation by targeting SREBP-1 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2017, 81(9):1747-1754.
- [13] CHEN H, MO D, LI M, et al. miR-709 inhibits 3T3-L1 cell differentiation by targeting GSK3 β of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(11):2583-2589.
- [14] STRYCHARZ J, SWIDERSKA E, WRÓBLEWSKI I A, et al. Hyperglycemia affects miRNAs expression pattern during adipogenesis of human visceral adipocytes memorization involved? [J]. *Nutrients*, 2018, 10(11):E1774.
- [15] SIERSB K R, NIELSEN R, MANDRUP S. PPAR γ in adipocyte differentiation and metabolism—novel insights from genome-wide studies [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(15):3242-3249.
- [16] CHOI S K, PARK S, JANG S, et al. Cascade regulation of PPAR γ (2) and C/EBP α signaling pathways by celastrol impairs adipocyte differentiation and stimulates lipolysis in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Metabolism*, 2016, 65(5):646-654.
- [17] ROSE S E, HEMATI N, LONGO K A, et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling [J]. *Science*, 2010, 289(5481):950-953.
- [18] ZHAO C, WU H, QIMUGE N, et al. MAT2A promotes porcine adipogenesis by mediating H3K27me3 at Wnt10b locus and repressing Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018, 1863(2):132-142.

(收稿日期:2020-03-27 修回日期:2020-04-27)

(上接第 2869 页)

- [14] HOFFMAN R M, AMOH Y. Hair follicle-associated pluripotent(HAP) stem cells [J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2018, 160:23-28.
- [15] ABBASI S, BIERNASKIE J. Injury modifies the fate of hair follicle dermal stem cell progeny in a hair cycle-dependent manner [J]. *Exp Dermatol*, 2019, 28(4):419-424.
- [16] JOSHI J, BRENNAN D, BEACHLEY V, et al. Cardiomyogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cellspheroids within electrospun collagen nanofiber mats [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2018, 106(12):3303-3312.
- [17] PETERS E L, OFFRINGA C, KOS D, et al. Regulation of myoglobin in hypertrophied rat cardiomyocytes in experimental pulmonary hypertension [J]. *Pflugers Arch*, 2016, 468(10):1697-1707.

(收稿日期:2020-03-05 修回日期:2020-05-16)