

微RNA-27a介导3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗的作用机制

谢军, 韩造木, 尹琬凌

作者单位: 华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院后湖院区老年科, 湖北 武汉 430014

基金项目: 湖北省科技厅科技计划项目(2017CFB386); 武汉市卫生计生科研基金(WX17Q04)

摘要:目的 研究微RNA-27a(miR-27a)介导3T3-L1脂肪细胞胰岛素抵抗的作用机制。方法 将3T3-L1细胞诱导分化为脂肪细胞, 采用肿瘤坏死因子- α (TNF- α)法建立3T3-L1脂肪细胞的胰岛素抵抗模型, 检测miR-27a对3T3-L1细胞葡萄糖摄取的影响, 蛋白质印迹法(Western Blot)检测miR-27a对胰岛素信号通路的影响。实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(qPCR)及双荧光素酶报告基因检测法检测miR-27a的作用靶点。结果 miR-27a介导了3T3-L1脂肪细胞的胰岛素抵抗[正常对照组, 模型组, miR-27a mimics+模型组, miR-27a inhibitor+模型组四组的吸光度值分别为 (2.03 ± 0.20) , (1.28 ± 0.27) , (1.43 ± 0.20) , (1.97 ± 0.18) , $P < 0.01$], 蛋白质印迹法显示miR-27a抑制了胰岛素信号通路中胰岛素受体底物1(IRS1)及Akt蛋白的磷酸化。qPCR显示miR-27a抑制了过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)的表达[对照组和miR-27a组的相对值分别为 (1.00 ± 0.08) 和 (0.59 ± 0.14) , $P = 0.0048$], 双荧光素酶报告基因检测验证了PPAR γ 为miR-27a的作用靶点[PPAR γ WT+miR-NC, PPAR γ WT+miR-27a, PPAR γ Mut+miR-NC, PPAR γ Mut+miR-27a四组的相对荧光值分别为 (5.37 ± 0.80) , (3.17 ± 0.57) , (4.94 ± 0.63) , (4.68 ± 0.74) , $P < 0.01$]。结论 miR-27a通过抑制胰岛素信号通路及靶向PPAR γ 介导3T3-L1细胞胰岛素抵抗。

关键词: 代谢综合征X; 胰岛素抵抗; 微RNAs; microRNA 27a; 外泌体; 抵抗素; 过氧化物酶体增殖物激活受体; 脂肪细胞; 3T3-L1脂肪细胞

The mechanism of miR-27a induced insulin resistance on 3T3-L1 adipocyte cells

XIE Jun, HAN Zaomu, YIN Wanling

Author Affiliation: The Department of Geratology, Houhu Branch, The Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan, Hubei 430014, China

Abstract: Objective To preliminary study the mechanism of miR-27a induced insulin resistance on 3T3-L1 adipocyte. **Methods** The insulin resistance modal was induced on 3T3-L1 adipocyte by TNF- α . The glucose intake by 3T3-L1 adipocyte was examined and the insulin signal pathway was detected by Western Bolt. At last, Quantitative real time PCR and Dual Luciferase Reporter were used to proved the target of miR-27a. **Results** miR-27a induced insulin resistance on 3T3-L1 adipocyte (The light absorption value of control group, model group, miR-27a mimics+model group, miR-27a inhibitor+modal group were (2.03 ± 0.20) , (1.28 ± 0.27) , (1.43 ± 0.20) , (1.97 ± 0.18) , $P < 0.01$), miR-27a mimics inhibit the phosphorylation of IRS1 and Akt. PPAR γ was proved to be the target of miR-27a by Dual Luciferase Reporter (The relative value of PPAR γ WT+miR-NC, PPAR γ WT+miR-27a, PPAR γ Mut+miR-NC, PPAR γ Mut+miR-27a were (5.37 ± 0.80) , (3.17 ± 0.57) , (4.94 ± 0.63) , (4.68 ± 0.74) , $P < 0.01$). **Conclusion** miR-27a induced insulin resistance on 3T3-L1 adipocyte by inhibit insulin signal pathway and targeting PPAR γ .

Key words: Metabolic syndrome X; Insulin resistance; MicroRNAs; miR-27a; Exosomes; Resistin; Peroxisome proliferator-activated receptors; Adipocytes; 3T3-L1 adipocyte

微RNAs(miRNAs)在糖尿病及胰岛素抵抗的发生过程中起重要作用, 目前已发现多种miRNA通过各种作用方式导致或改善胰岛素抵抗。作者前期研究发现miR-27a可以促进脂肪细胞胰岛素抵抗^[1]。本研究于2017年11月至2018年7月以肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)诱导3T3-L1脂肪细胞的胰岛素抵抗为模型, 进一步研究

miR-27a介导胰岛素抵抗的作用机制及作用靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料 3T3-L1前脂肪细胞购于中国科学院细胞库, Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)高糖培养基购于美国Hyclone公司, 胰蛋白酶购于bioswamp公司, 胎牛血清(fetal bovine serum)购于美国Gibco公司, 胰岛素(Insulin), TNF- α , 地塞米松

(dexamethasone), 异丁基甲基黄嘌呤(isobutyl methyl xanthine, IBMX)均购于美国 sigma 公司, 脂质体 2000 (Lipofectamine 2000) 购于美国 Invitrogen 公司, SYBR Green PCR 试剂盒购于美国 KAPA Biosystems 公司, 逆转录试剂盒购于日本 TAKARA 公司。miR-27a 类似物(mimics)和 miR-27a 抑制物(inhibitor)购于广州锐博生物科技有限公司。胰岛素受体底物 1(insulin receptor substrate 1, IRS1), 苏氨酸蛋白激酶(Akt), 糖原合成激酶(GSK-3 β)等细胞信号通路蛋白及其磷酸化活性形式 p-IRS1, p-Akt, p-GSK-3 β 抗体均购于英国 Abcam 公司, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 3T3-L1 细胞胰岛素抵抗模型的建立及 miR-27a 对葡萄糖摄取的影响 3T3-L1 前脂肪细胞在 37 °C, 5% 二氧化碳及饱和湿度条件下, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中恒温培养、传代。试验时, 将细胞接种于 6 孔板中, 当汇合度达到 70% 时, 用含诱导液(10 mg/L 胰岛素、1 μ mol/L 地塞米松和 0.5 mmol/L 异丁基甲基黄嘌呤及 10% 胎牛血清)的 DMEM 培养基诱导分化 48 h, 撤掉地塞米松、IBMX, 用含 10 mg/L 胰岛素的 DMEM 培养基再培养 48 h, 然后换成含不含胰岛素的 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基再继续培养 4 d, 采用油红 O 染色鉴定细胞的分化情况。向培养基中添加 10 ng/L TNF- α 继续培养 24 h, 即可成功建立 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型。

细胞分为正常对照组, 模型组, miR-27a mimics+模型组, miR-27a inhibitor+模型组。将 3T3-L1 细胞培养于 24 孔板中, 实验前 1 d 用含 0.2% BSA 的无血清培养基培养过夜。实验前细胞在 37 °C 含 0.2% BSA 的 KRB 缓冲液[含 120.0 mmol/L 氯化钠(NaCl), 6.0 mmol/L 氯化钾(KCl), 12.5 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES), 1.2 mmol/L 硫酸镁(Mg-SO₄), 0.4 mmol/L 磷酸二氢钠(NaH₂PO₄), 0.6 mmol/L 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄), 1.0 mmol/L 氯化钙(CaCl₂)]中作用 2 h, 然后每孔加入含 5 微居里(μ Ci)脱氧³H 葡萄糖的-脱氧葡萄糖混合液 50 μ L 孵育 5 min, 然后吸去全部孵育液, 冰磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤细胞 5 次, 干燥后室温下每孔加入 500 μ L Triton-100 裂解细胞 30 min, 最后取 400 μ L 细胞裂解液于液闪计数器下检测。

1.2.2 蛋白质印迹法(Western Blot)检测胰岛素信号通路相关蛋白的表达变化 3T3-L1 细胞分为正常对照组, 模型组, miR-27a mimics+模型组, miR-

27a inhibitor+模型组, 分别以蛋白质印迹法检测胰岛素信号通路 IRS1, Akt, GSK-3 β 的蛋白水平及蛋白磷酸化水平(活性形式)的变化。

1.2.3 实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(qPCR)检测过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)的表达 分别收集各组的 3T3-L1 细胞, Trizol 法提取总 RNA, 应用 TAKARA 逆转录试剂盒进行逆转录, 采用 SYBR Green PCR 试剂盒进行 qPCR。反应体系按照说明书进行配置。采用 GAPDH 作为内参, 根据 qPCR 反应曲线得到各组样品目的基因和内参基因的 Ct(Cycle threshold)值。首先计算 $\Delta\Delta Ct$ 值 = (实验组目的基因的 Ct 平均值 - 实验组内参基因的 Ct 平均值) - (对照组目的基因的 Ct 平均值 - 对照组目的内参基因的 Ct 平均值), 则基因相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.2.4 双荧光素酶报告基因法检测 miR-27a 的靶点 利用 pmirGLO 双荧光素酶报告基因检测系统检测 miR-27a 对 PPAR γ 的直接调控作用。克隆 PPAR γ 3' 非翻译区(3'-UTR)区域, 同时采用 Quick Change XL Site-Directed Mutagenesis kit 试剂盒设计 miR-27a 结合位点突变区域(即阴性对照), 插入 pmirGLO 载体中, 扩增并抽提质粒。然后利用 lipofectamine 2000 与 miR-27a mimics 或 inhibitor 以及对对照共转染 HEK293 细胞。培养 24 h 后于荧光光度计下检测荧光值以验证 miR-27a 对 PPAR γ 3'-UTR 的直接作用。

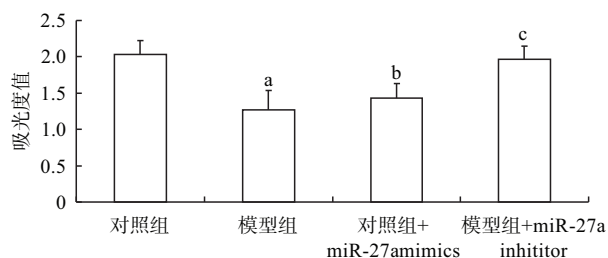
1.3 统计学方法 所有结果利用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据间比较采用单因素方差分析 + LSD 法或成组 *t* 检验, *P* < 0.01 表示数据间差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-27a 对胰岛素抵抗模型葡萄糖摄取的影响 我们采用 TNF- α 法建立了 3T3-L1 胰岛素抵抗的细胞模型, 同时检测了 miR-27a 对脂肪细胞胰岛素抵抗模型中的葡萄糖摄取的影响。结果显示: 正常对照组, 模型组, miR-27a mimics+模型组, miR-27a inhibitor+模型组四组的吸光度值分别为(2.03 $\pm$ 0.20), (1.28 $\pm$ 0.27), (1.43 $\pm$ 0.20), (1.97 $\pm$ 0.18), 模型组成功抑制了 3T3-L1 脂肪细胞对葡萄糖的摄取, 而 miR-27a inhibitor 则逆转了模型组细胞对葡萄糖摄取的抑制。见图 1。

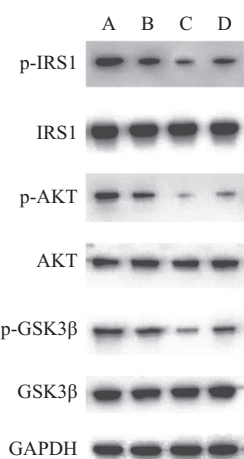
2.2 miR-27a 对胰岛素信号通路的影响 胰岛素和胰岛素受体结合后会通过磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/Akt 信号通路促进葡萄糖的摄取和转运, 从

而降低血糖。因此我们检测了 miR-27a 对 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的影响,结果显示 miR-27a mimics 抑制了胰岛素信号通路中 IRS1、Akt、GSK-3 β 的磷酸化,而 miR-27a inhibitor 则恢复了模型组对 IRS1、Akt、GSK-3 β 的磷酸化的抑制。见图 2。



注:与正常对照组相比,* $P=0.007$ 2,* $P=0.004$ 6;与模型组相比,* $P=0.009$ 1

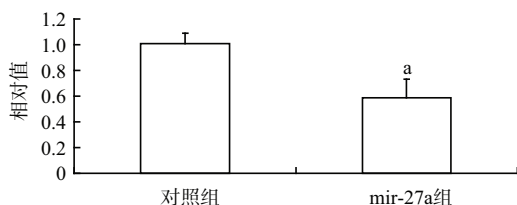
图1 miR-27a对葡萄糖摄取的影响($n=3$)



注:IRS1为胰岛素受体底物1,Akt为苏氨酸蛋白激酶,GSK-3 β 为糖原合成激酶,p-IRS1,p-Akt,p-GSK-3 β 分别为其磷酸化活性形式,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图2 miR-27a对胰岛素抵抗细胞模型信号通路的影响:A为正常对照组;B为模型组;C为模型组+miR-27a mimics;D为模型组+miR-27a inhibitor

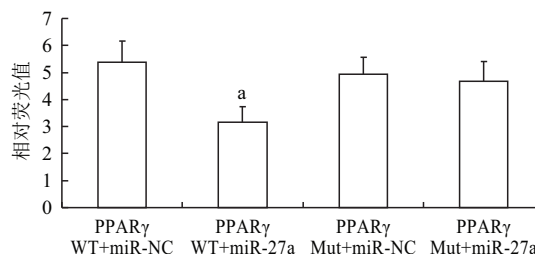
2.3 qPCR 验证 miR-27a 对 PPAR γ 的影响 PPAR γ 在脂肪细胞分化及糖尿病的发病过程中起重要作用。有文献报道 miR-27a 可以抑制 PPAR γ 的表达,通过 qPCR 我们检测了 miR-27a 对 PPAR γ 表达的影响。结果显示对照组和 miR-27a 组的相对值分别为 (1.00 ± 0.08) 和 (0.59 ± 0.14) ,miR-27a 可以显著抑制 PPAR γ 的表达。见图 3。



注:与正常对照组比较,* $P=0.004$ 8

图3 miR-27a mimics抑制PPAR γ mRNA的表达($n=3$)

2.4 双荧光素酶报告基因法验证 miR-27a 的靶点 双荧光素酶报告基因检测法是验证 miRNA 靶点的标准方法。本研究通过双荧光素酶报告基因检测法验证 PPAR γ 是否为 miR-27a 的靶点。结果显示:miR-27a 可以显著抑制报告基因的表达,而 miRNA 的对照 mir-NC 及突变结合位点的载体 Mut 均不能抑制报告基因的表达。结果证明 PPAR γ 是 miR-27a 的靶点。PPAR γ WT+miR-NC,PPAR γ WT+miR-27a,PPAR γ Mut+miR-NC,PPAR γ Mut+miR-27a 四组的荧光值分别为 (5.37 ± 0.80) 、 (3.17 ± 0.57) 、 (4.94 ± 0.63) 、 (4.68 ± 0.74) 。见图 4。



注:与 PPAR γ WT+miR-NC 组比较,* $P=0.009$ 9

图4 双荧光素酶报告基因检测法验证miR-27a的靶点($n=3$)

3 讨论

miRNAs 是在一类长约 20~24 个核苷酸在进化上高度保守的非编码 RNA。miRNAs 主要在转录水平上,通过与目标靶基因 mRNA 3'-UTR 结合,抑制目标靶基因的翻译或者促进目标靶基因 mRNA 的降解,从而抑制目标靶基因的功能。到目前为止已发现多个 miRNA 通过各种不同的机制和途径调节着糖尿病的发生和胰岛素抵抗:如 miR-29b 可以通过调控 PI3K 通路抑制胰岛素抵抗^[2]。miRNA-93 可以通过抑制葡萄糖转运蛋白 4 (glucose transporters 4, GLUT4) 表达从而导致胰岛素抵抗^[3],miRNA-145 等通过 p65 转录因子途径导致肝细胞胰岛素抵抗等^[4]。MiR-27a 是一个调节脂肪细胞分化和成熟的 miRNA^[5],大量研究表明 miR-27a 在糖尿病病人及糖尿病动物模型中表达上调^[6-11],作者前期研究结果也表明 miR-27a 参与了脂肪细胞的胰岛素抵抗,但是其作用机制却并不清楚^[1]。进一步了解 miR-27a 在糖尿病的发病机制及胰岛素抵抗中的作用将为糖尿病的检测和治疗提供新的手段。

胰岛素和胰岛素受体结合后通过活化 IRS1,激活 PI3K/Akt 信号通路,从而促进葡萄糖的摄取和利用。胰岛素抵抗的产生主要是胰岛素信号通路中的信号传导受阻所致。我们检测了 miR-27a 对胰岛素信号通路的影响,结果显示 miR-27a 抑制了胰岛素信号通路中 IRS1、Akt、GSK-3 β 的磷酸化,提示 miR-27a

通过抑制胰岛素信号通路促进了胰岛素抵抗。

然而,miR-27a的具体靶点并不清楚,生物信息学分析结果提示 IRS1 及 GSK-3 β 的 3'-UTR 存在 miR-27a 的结合位点,提示 IRS1 及 GSK-3 β 可能为 miR-27a 的靶标,但是我们蛋白质印迹法的结果以及双荧光素酶报告基因的结果(结果未显示)并未证明 IRS1 及 GSK-3 β 是 miR-27a 的直接靶标。PPAR γ 是参与脂肪细胞生成、成熟、分化的一类核转录因子,主要表达于脂肪组织及免疫系统中。PPAR γ 在代谢性疾病,特别是糖尿病中起重要作用。PPAR γ 激动剂噻唑烷二酮类药物已被用来治疗糖尿病。已有研究表明 miR-27a 可以调节 PPAR γ 的表达^[12-14],本研究则通过 qPCR 及双荧光素酶报告基因检测法进一步证实了 PPAR γ 是 miR-27a 介导脂肪细胞胰岛素抵抗的直接靶点。

由于一个 miRNA 可以有多个靶基因,一个靶基因也可以有多个 miRNAs 调节。为了了解 miR-27a 是否还有其它作用靶点,我们还对文献[16-18]报道的 miR-27a 的靶基因同时也是调节胰岛素信号通路的基因进行了检测。叉头框蛋白 1(Forkhead box O1, FOXO1)是一类重要的转录因子,主要表达于胰岛效应细胞,如脂肪细胞、肌肉细胞、肝细胞中。在胰腺中也仅表达于 β 细胞。FOXO1 与脂质代谢,胰岛 β 细胞增殖与凋亡以及胰岛素抵抗有密切关系^[15]。有研究表明 miR-27a 可以通过靶向 FOXO1 从而调节细胞增殖与分化^[16-18]。然而,在 3T3-L1 细胞中,我们并没有观察到 miR-27a 的对 FOXO1 靶向作用。同样,有研究表明 miR-27a 可以靶向 PI3K^[19],然而我们的实验结果也并未显示 miR-27a 直接调节 PI3K 的表达。是否还有其它的作用靶点,需要进一步研究证实。

综上所述,在作者前期研究中发现 miR-27a 可介导 3T3-L1 脂肪细胞产生胰岛素抵抗,然而机制并不十分清楚。在本研究中,进一步证实 miR-27a 可通过抑制胰岛素信号通路、靶向 PPAR γ 的表达进而介导胰岛素抵抗。而 miR-27a 对 PPAR γ 的下游信号通路的影响以及炎症信号通路的影响将进一步明确 miR-27a 的作用机制。

参考文献

- [1] 谢军,蔡克银.miRNA-27a对3T3-L1细胞胰岛素抵抗的作用及机制[J],华南国防医学杂志,2014,28(2):97-99,112.
- [2] 何丽亚,吴政治,王平,等.miR-29b在2型糖尿病和前期糖尿病患者血清中的表达及临床意义[J].安徽医药,2018,22(7):1331-1335.
- [3] CHEN YH, HENEIDI S, LEE JM, et al. MiRNA - 93 inhibits GLUT4 and is overexpressed in adipose tissue of polycystic ovary syndrome patients and women with insulin resistance [J]. Diabetes, 2013, 62(7):2278-2286.
- [4] WEN F, YANG Y, JIN D, et al. MiRNA-145 is involved in the development of resistin-induced insulin resistance in HepG2 cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 445(2):517-523.
- [5] SHI C, HUANG F, GU X, et al. Adipogenic miRNA and meta-signature miRNAs involved in human adipocyte differentiation and obesity [J]. Oncotarget, 2016, 7(26):40830-40845.
- [6] VILLARD A, MARCHAND L, THIVOLET C, et al. Diagnostic value of cell-free circulating MicroRNAs for obesity and type 2 diabetes: a meta-analysis [J]. J Mol Biomark Diagn, 2015, 6(6). pii: 251. DOI: 10.4172/2155-9929.1000251.
- [7] NUNEZ LYO, GARUFI G, SEYHAN AA. Altered levels of circulating cytokines and microRNAs in lean and obese individuals with prediabetes and type 2 diabetes [J]. Mol Biosyst, 2016, 13(1):106-121.
- [8] LI Y, ZHANG Y, LI X, et al. Association study of polymorphisms in miRNAs with T2DM in Chinese population [J]. Int J Med Sci, 2015, 12(11):875-880.
- [9] WANG TT, CHEN YJ, SUN LL, et al. Affection of single-nucleotide polymorphisms in miR-27a, miR-124a, and miR-146a on susceptibility to type 2 diabetes mellitus in Chinese Han people [J]. Chin Med J (Engl), 2015, 128(4):533-539.
- [10] COLLARES CV, EVANGELISTA AF, XAVIER DJ, et al. Identifying common and specific microRNAs expressed in peripheral blood mononuclear cell of type 1, type 2, and gestational diabetes mellitus patients [J]. BMC Res Notes, 2013, 6:491.
- [11] KAROLINA DS, TAVINTHARAN S, ARMUGAM A, et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(12):E2271-E2276. DOI: 10.1210/jc.2012-1996.
- [12] YU Y, DU H, WEI S, et al. Adipocyte-derived exosomal miR-27a induces insulin resistance in skeletal muscle through repression of PPAR γ [J]. Theranostics, 2018, 8(8):2171-2188.
- [13] XIAO Y, LI B, LIU J. miRNA-27a regulates arthritis via PPAR γ in vivo and in vitro [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4):5454-5462.
- [14] LV X, YAN J, JIANG J, et al. MicroRNA-27a-3p suppression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ contributes to cognitive impairments resulting from sevoflurane treatment [J]. J Neurochem, 2017, 143(3):306-319.
- [15] KITAMURA T. The role of FOXO1 in β -cell failure and type 2 diabetes mellitus [J]. Nat Rev Endocrinol, 2013, 9(10):615-623.
- [16] WANG Z, JI G, WU Q, et al. Integrated microarray meta-analysis identifies miRNA-27a as an oncogene in ovarian cancer by inhibiting FOXO1 [J]. Life Sci, 2018, 210:263-270.
- [17] SUN B, LI J, SHAO D, et al. Adipose tissue-secreted miR-27a promotes liver cancer by targeting FOXO1 in obese individuals [J]. Onco Targets Ther, 2015, 8:735-744.
- [18] WANG Y, ZHAO Y, SUN C, et al. Chitosan degradation products promote nerve regeneration by stimulating schwann cell proliferation via miR-27a/FOXO1 axis [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(1):28-39.
- [19] LIU G, CAO P, CHEN H, et al. MiR-27a regulates apoptosis in nucleus pulposus cells by targeting PI3K [J]. PLoS One, 2013, 8(9):e75251. DOI: 10.1371/journal.pone.0075251.

(收稿日期:2018-09-05,修回日期:2018-10-22)