

# MiR-186-5p 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖分化的影响研究\*

辜浩<sup>1,2</sup> 郭鑫宇<sup>1,2</sup> 堵晶晶<sup>1,2</sup> 张铭文<sup>1,2</sup> 王定国<sup>3</sup> 廖坤<sup>4</sup> 张顺华<sup>1,2</sup> 朱砺<sup>1,2\*\*</sup>

(1 四川农业大学动物科技学院 成都 611130 2 四川农业大学畜禽遗传资源发掘与创新利用四川省重点实验室)

(3 成都市动物疫病预防控制中心 成都 610041 4 四川省通江县农业局畜牧站 巴中 636600)

**摘要** 目的:探究 miR-186-5p 对小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞增殖、分化的影响及其潜在的分子机制。方法:qRT-PCR 检测 miR-186-5p 在不同周龄小鼠白色脂肪组织及 3T3-L1 前脂肪细胞增殖分化过程中的表达变化;通过脂质体将 miR-186-5p mimics、inhibitors 转染入增殖液或分化液培养的 3T3-L1 细胞后,利用 CCK-8、EdU 和 qRT-PCR 检测 3T3-L1 前脂肪细胞增殖变化,油红 O 染色观察其脂滴形态;通过生物信息软件 TargetScan 和双荧光报告系统分别对 miR-186-5p 靶基因进行预测和确认。结果:(1)miR-186-5p 在 1~6 周龄小鼠的白色脂肪组织及 3T3-L1 前脂肪细胞自然分化过程中表达量均逐渐上调。(2)与阴性对照相比,mimics 或 inhibitors 转染分别显著地促进或抑制了 miR-186-5p 的表达。(3)过表达 miR-186-5p 后,3T3-L1 前脂肪细胞的增殖速率减慢,脂滴增大增多;而抑制 miR-186-5p 后,3T3-L1 前脂肪细胞增殖速率加快,脂滴数量减少,且粒径变小。其中过表达 miR-186-5p 显著地降低了野生型 *Wnt5a* 和 *Mapk1* 3'-UTR 活性,而突变相应的绑定位点可解除该抑制作用。结论:miR-186-5p 可抑制 3T3-L1 前脂肪细胞增殖,且通过直接靶向 *Wnt5a* 和 *Mapk1* 以促进其分化为成熟脂肪细胞。

**关键词** 3T3-L1 前脂肪细胞 miR-186-5p 分化 增殖 *Wnt5a* *Mapk1*

**中图分类号** Q819

脂肪是机体内重要的能量代谢及内分泌组织。已有的研究表明畜禽体内过度的脂质沉积会影响胴体品质及食用者的健康,过少则会严重影响肉产品的口感及风味<sup>[1]</sup>。对于人类健康而言,脂质的过度积累会导致肥胖从而引发疾病,如 2 型糖尿病、脂肪肝、癌症、高血脂等疾病<sup>[2-6]</sup>。机体内脂肪组织的发育受遗传、环境及营养等因素影响。因此,深入了解脂质沉积的分子遗传机制,有助于促进对脂肪发育过程的认识和推进对肥胖及相关代谢疾病的深入研究。

microRNAs (miRNAs) 是一类长度为 18~22 个核苷酸,高度保守且不具编码能力的小分子 RNA,主要通

过与其靶基因的 3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)结合使其降解或抑制其翻译<sup>[7-8]</sup>。随着研究的不断深入,研究者发现 miRNAs 在细胞的增殖、分化与凋亡等生物学过程中扮演着重要角色<sup>[9-10]</sup>。大量研究表明,miRNAs 可参与脂肪细胞的发育调控<sup>[11-15]</sup>。例如,miR-204-5p 不仅可调控 *Bcl-2* 诱导 3T3-L1 前脂肪细胞凋亡来抑制其增殖,且可直接靶向 *KLF3* 促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞<sup>[11]</sup>;何洪炳等<sup>[12]</sup>发现在前脂肪细胞分化过程中 miR-130b 可靶向抑制 PPAR $\gamma$ ,从而抑制前脂肪细胞的分化;在 3T3-L1 前脂肪细胞中,miR-92a-3p 下调相关细胞周期标志基因和蛋白质来抑制其增殖,促进成脂分化相关基因和蛋白质表达,进而加快甘油三酯积累<sup>[13]</sup>。miR-186-5p 是一个在物种间高度保守,与癌细胞增殖及侵袭能力相关的小分子 RNA<sup>[16-19]</sup>。有研究者发现 miR-186 在牛白色脂

收稿日期:2019-07-17 修回日期:2019-08-09

\* 国家重点研发计划项目(2018YFD0501004)、四川省科技支撑项目(2016NZ0050)、国家现代农业产业技术体系四川生猪创新团队项目(SCCXTD-008)资助项目

\*\*通讯作者,电子邮箱:zhuli7508@163.com

肪中的表达水平与其背膘厚度负相关<sup>[20]</sup>,与肥胖个体或肥胖相关癌细胞中脂肪酸代谢密切相关<sup>[21]</sup>。特别是,miR-186可通过靶向抑制巨噬细胞 CSE 来影响脂蛋白脂酶的表达,进而促进巨噬细胞中胆固醇、胆固醇脂的积累和相关促炎症因子的分泌<sup>[22]</sup>。脂质的生成是一个复杂有序的生物过程,研究证明脂肪前体细胞增殖、分化形成成熟脂肪细胞是机体脂质积累、维持机体正常脂质代谢的重要过程<sup>[23]</sup>。但是,关于 miR-186-5p 是否直接参与机体前脂肪细胞发育至今仍无研究报道。本研究以小鼠的 3T3-L1 前脂肪细胞为研究模型,通过过表达或抑制 miR-186-5p,在细胞水平上鉴定 miR-186-5p 在 3T3-L1 前脂肪细胞增殖、分化中的作用,并对其分子机制进行初步探究,以期为进一步研究 miRNA 调控脂肪细胞的发育提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验材料 3T3-L1 前脂肪细胞和 HeLa 细胞均购自中科院干细胞库。1~6 周龄雌性昆明小鼠,以及饲养所用高脂日粮(HFD)和正常日粮(NCW)均购自成都达硕实验动物有限公司。12 只 6 周龄小鼠随机分为 2 组,分别饲喂高脂和正常日粮。实验期间,小鼠可自由采食、饮水,饲养环境温度为(22±4)℃,规律昼夜交替。实验后,小鼠采用颈椎脱臼法处死,并采集性腺脂肪组织放于液氮;随后,样品转移至-80℃保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 脂质体 Lipofectamine 3000、无血清培养基 Opti-MEM、TRIzol 试剂均购自 Invitrogen 公司(美国);mRNA 反转录试剂盒、miRNA 反转录试剂盒、mRNA 定量试剂盒和 miRNA 定量试剂盒购自 TaKaRa 公司(大连,中国);无内毒素质粒抽提试剂盒购自 OMEGA 公司(美国);基础培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司(美国);miR-186-5p mimic (5'-caaagaauucuccuuuugggcu-3'),inhibitors (5'-agcccaaa ggagaaauucuuug-3'),negative control (5'-caguacuuuugugua guacaaa-3',5'-uuuguacuacacaaaaguacug-3')均由广州锐博生物科技有限公司(广州,中国)设计、合成;miR-186-5p 靶基因 *Wnt5a* 的 3'-UTR 野生型及突变型载体均购自成都擎科生物科技有限公司;EdU 细胞增殖检测试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司;油红 O 染液购自 Sigma 公司(美国);CCK-8 试剂盒购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司(北京,中国);Dual-Luciferase Reporter Assay System 试剂盒购自 Promega 公

司(美国);NanoDrop 2000 超微量分光光度计、酶标仪购自 Thermo 公司(美国);CFX96 荧光定量仪购自 Bio-Rad 公司(美国);Olympus IX53 荧光显微镜购自 Olympus 公司(日本)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞被置于含 10% FBS 的 DMEM 增殖培养基中,放于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中进行增殖培养。当细胞密度达 80% 时,增殖培养基更换为含有 10% FBS、0.5mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、1mmol/L 地塞米松(Dex)和 5mg/ml 胰岛素的分化培养基,以诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化;3 天后,分化培养液更换为含 10% FBS、5mg/ml 胰岛素和 DMEM 的维持培养液;再 3 天后,维持培养液更换为增殖培养液培养,直至实验结束。

### 2.2 细胞转染

根据脂质体 Lipofectamine 3000 操作说明书提示,将浓度 50nmol/L miR-186-5p mimics、inhibitors、negative control (NC)转染至诱导增殖、分化的 3T3-L1 前脂肪细胞中;转染 6h 后,更换培养基。为保证转染效果,转染每 2 天执行一次。

### 2.3 CCK-8 检测

将接种在 96 孔板上的 3T3-L1 前脂肪细胞用 miR-186-5p mimics、inhibitors、negative control 转染。之后,根据 CCK-8 增殖检测试剂盒说明书,在细胞转染后相应时间点(转染后 0h、24h、48h、72h、96h)分别检测细胞增殖情况。具体方法为:每孔中加入 10μl CCK-8 试剂,并于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱孵育 1h 后,利用酶标仪检测其在 450nm 波长的吸光度值。

### 2.4 EdU 染色

将接种在 96 孔板上的 3T3-L1 前脂肪细胞,并用 miR-186-5p mimics、inhibitors、negative control 转染。48h 后,将培养液更换为按比例稀释的 EdU 试剂 A,并于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱孵育;2h 后,用 4% 多聚甲醛固定液固定,按 EdU 细胞增殖检测试剂盒说明书操作检测被标记的新生细胞。最后,使用 Olympus IX53 荧光显微镜采集实验图片。

### 2.5 油红 O 染色

将已转染 miR-186-5p mimics、inhibitors、negative control,且诱导分化 8 天的脂肪细胞用 PBS 清洗 3 次;随后用 4% 多聚甲醛固定液于室温下固定 2h;去除多聚

甲醛,PBS 清洗 3 次;将稀释好的油红稀释液加至培养板中染色 30min,随后,去除油红,用 PBS 清洗 3 次,于 Olympus IX53 显微镜下观察、拍照;拍照结束后,培养板中每孔加入 200 $\mu$ l 异丙醇萃取油红 O,并于 510nm 波长处测定其吸光值,以测定甘油三酯含量。

2.6 实时荧光定量 PCR

根据 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂说明书,提取细胞和组织的总 RNA。用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测纯度和完整性。而后,按照 TaKaRa 公司的 mRNA 和 miRNA 的逆转录试剂盒反转

得到相应的 cDNA。使用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒利用 CFX96 荧光定量仪对 miR-186-5p 及相关基因进行检测。PCR 反应体系 10 $\mu$ l:cDNA 1 $\mu$ l,上、下游引物各 0.5 $\mu$ l,SBYR Premix Ex Taq 5 $\mu$ l,DEPC 水 3 $\mu$ l。PCR 反应条件:90 $^{\circ}$ C 预变性 10min,95 $^{\circ}$ C 变性 10s,60 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 15s,共 40 个循环。以  $\beta$ -actin、U6 分别作为 mRNA、miRNA 的内参基因,使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法<sup>[24]</sup> 计算 mRNA 和 miRNA 的相对表达量。实验所用引物序列见表 1。

表 1 引物信息  
Table 1 Primers information

Genes	Primer Sequence(5'→3')	T <sub>M</sub> ( $^{\circ}$ C )
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	F:CTCCAAGAATACCAAAGTGCGA R:GCCTGATGCTTTATCCCCACA	58.3
<i>C/EBP<math>\alpha</math></i>	F:CAAGAACAGCAACGAGTACCG R:GTCAC TGGTCAACTCCAGCAC	58.3
<i>CDK4</i>	F:GTCAGTTTCTAAGCGGCCTG R:CACGGGTGTTGCGTATGTAG	61.0
<i>Cyclin D1</i>	F:GTTGCTGGAATTTTCGGGGT R:AGCGTCCCTGCTCTTCTTCA	60.0
<i>Cyclin E</i>	F:AGCCTCGGAAAATCAGACCA R:TCCTGTGCCAAGTAGAACGT	58.3
<i>Cyclin B</i>	F:TTGTGTGCCCCAAGAAGATGC R:CTCCGAAGAAAATGCAGGGG	52.0
<i>FABP4</i>	F:TTTCCTTCAAAC TGGCGCTG R:CATTCCACCACCAGCTTGTC	57.9
<i>ELOVL6</i>	F:AAGCACGCTCTATCTCCTGTT R:CTGCGTTGTATGATCCCATGAA	60.0
<i>aP2</i>	F:CGATCCCAATGAGCAAGTGG R:TGGGTCAAGCAACTCTGGAT	63.5
<i>LPL</i>	F:TGGCGTAGCAGGAAGTCTGA R:TGCCTCCATTGGGATAAATGTC	60.0
<i>Wnt 5a</i>	F: AGGGCAGAAAATGTACACGA R: GCCCAGAGAAAAC TGTAGGTC	57.0
<i>Mapk1</i>	F: GTCGCCATCAAGAAAATCAGC R: GGAAGGTTTGAGGTCAC	60.0
<i>miR-186-5p</i>	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU	60.0
<i>U6</i>	F:CTCGCTTCGGCAGCAC A R:AACGCTTCACGAATTTGCGT	61.0
<i><math>\beta</math>-actin</i>	F:TGGAATCCTGTGGCATC CATGAAAC R:TAAAACGCAGCTCAG TAACAGTCCG	60.0

2.7 双萤光素酶检测实验

WT-*Wnt5a*、Mut-*Wnt5a* 和 WT-*Mapk1*、Mut-*Mapk1* 被分别定义为 *Wnt5a* 和 *Mapk1* 的 3'UTRs 野生型和突变

型。利用 Lipofactamine 3000, miR-186-5p mimics 或 negative control 与 WT-*Wnt5a*、Mut-*Wnt5a* 和 WT-*Mapk1*、Mut-*Mapk1* 被分别共转染入密度为 80% 的 HeLa 细胞。

24h后,根据 Dual-Luciferase Reporter Assay System 试剂盒操作说明,对细胞萤光素酶活性进行检测。其中,相对萤光素酶活性 = 萤火虫萤光素酶/海肾萤光素酶;每个处理设置5个重复。

## 2.8 数据分析

试验数据的差异均采用 SPSS 22.0 软件进行 Student's *t*-test 分析,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义;所有结果均用平均值  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD) 表示。

## 3 结果与分析

### 3.1 miR-186-5p 的表达特性

利用实时荧光定量 PCR 检测不同周龄小鼠的白色

脂肪组织中 miR-186-5p 的表达量。结果显示:miR-186-5p 表达量随小鼠白色脂肪发育而逐渐上调,并在第5周达到峰值后逐渐下调至与4周龄相似水平(图1a)。相似地,在3T3-L1 纯白色前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞的过程中,miR-186-5p 表达量在分化前6天呈逐渐上调趋势,之后显著下调(图1b)。为进一步探究 miR-186-5p 与白色脂肪发育的关系,我们随后检测了正常日粮(如 NCW)和高脂日粮(HFD)饲喂小鼠脂肪组织 miR-186-5p 表达的差异;如图1c所示,与 NCW 组小鼠相比,miR-186-5p 表达量在 HFD 组小鼠白色脂肪降低约60%,暗示 miR-186-5p 可能与白色脂肪发育相关。

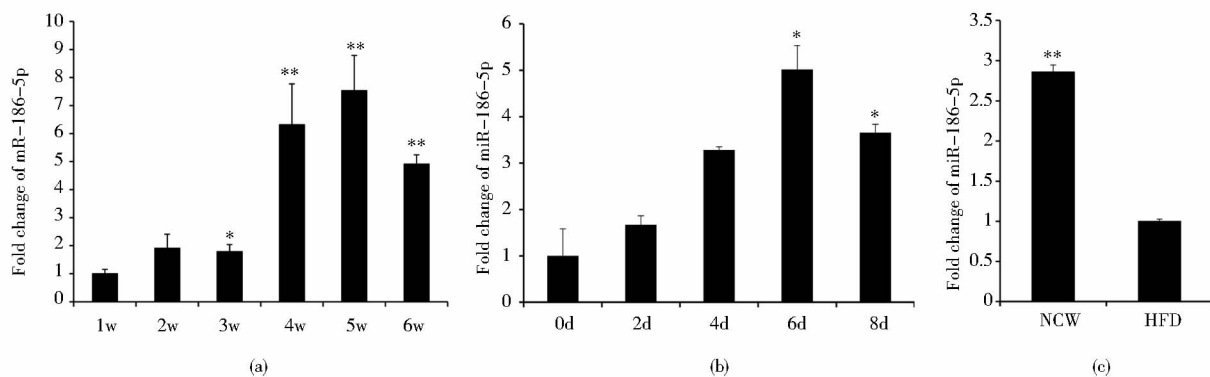


图1 miR-186-5p 在各组织、3T3-L1 前脂肪细胞中的表达量

Fig. 1 Expression of miR-186-5p in various tissues and 3T3-L1 preadipocytes

(a) The expression level of miR-186-5p in adipose tissue of 1-6 weeks old mice was detected by qRT-PCR (b) The expression level of miR-186-5p during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes was detected by qRT-PCR (c) The expression level of miR-186-5p in adipose tissue of HFD or NCW fed mice were detected by qRT-PCR \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

### 3.2 miR-186-5p 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞增殖

分别将 miR-186-5p 过表达模拟物 (mimics)、抑制剂 (inhibitors) 及阴性对照 (NC) 转染至增殖期 3T3-L1 前脂肪细胞。48h 后, qRT-PCR 检测各组 miR-186-5p 表达水平。与阴性对照组相比, mimics 组表达量增加了6倍, 而 inhibitors 组表达量减少了52%, 表明 mimics 或 inhibitors 分别成功地增加或抑制了 3T3-L1 前脂肪细胞内 miR-186-5p 的表达(图2a)。随后, 通过 CCK-8 和 EdU 细胞增殖试剂盒检测上述各组 3T3-L1 前脂肪细胞增殖变化。EdU 检测结果发现: 与阴性对照组相比, inhibitors 组含有更多 EdU 标记的新生成细胞, 而 mimics 组则相对较少, 二者差异显著(图2b、c)。CCK-8 结果显示: 与阴性对照组相比, 过表达或抑制 miR-186-5p 分别显著地降低或增加了培养液的吸光度值, 证明 miR-186-5p 负向调控 3T3-L1 前脂肪细胞增殖(图

2d)。此外, 与上述增殖表型差异相符, 实时荧光定量的结果表明: 细胞增殖标记基因 *Cyclin D1*、*Cyclin E*、*Cyclin B*、*CDK4* 的表达水平在抑制 miR-186-5p 表达后显著上调, 而在过表达 miR-186-5p 后显著下调(图2e)。

### 3.3 miR-186-5p 促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化

转染和诱导 3T3-L1 前脂肪细胞分化8天后, 油红 O 染色显示: 与阴性对照组相比, 过表达 miR-186-5p 组细胞分化明显, 形成红色脂滴较多, 而抑制 miR-186-5p 处理组细胞分化能力降低, 红色脂滴较少(图3a)。甘油三酯含量检测结果表明: 相比于对照组, mimics 组甘油三酯含量显著增多, 而 inhibitors 组甘油三酯含量减少(图3b)。实时荧光定量结果与上述观察相一致, 即与阴性对照相比, 过表达组的脂肪生成关键基因 *PPAR $\gamma$* 、*C/EBP $\alpha$* 、*aP2*、*FABP4*、*ELOVL6*、*LPL* 的表达量分别增加2.8倍、4.0倍、3.8倍、2.1倍、2.5倍、4.0倍,

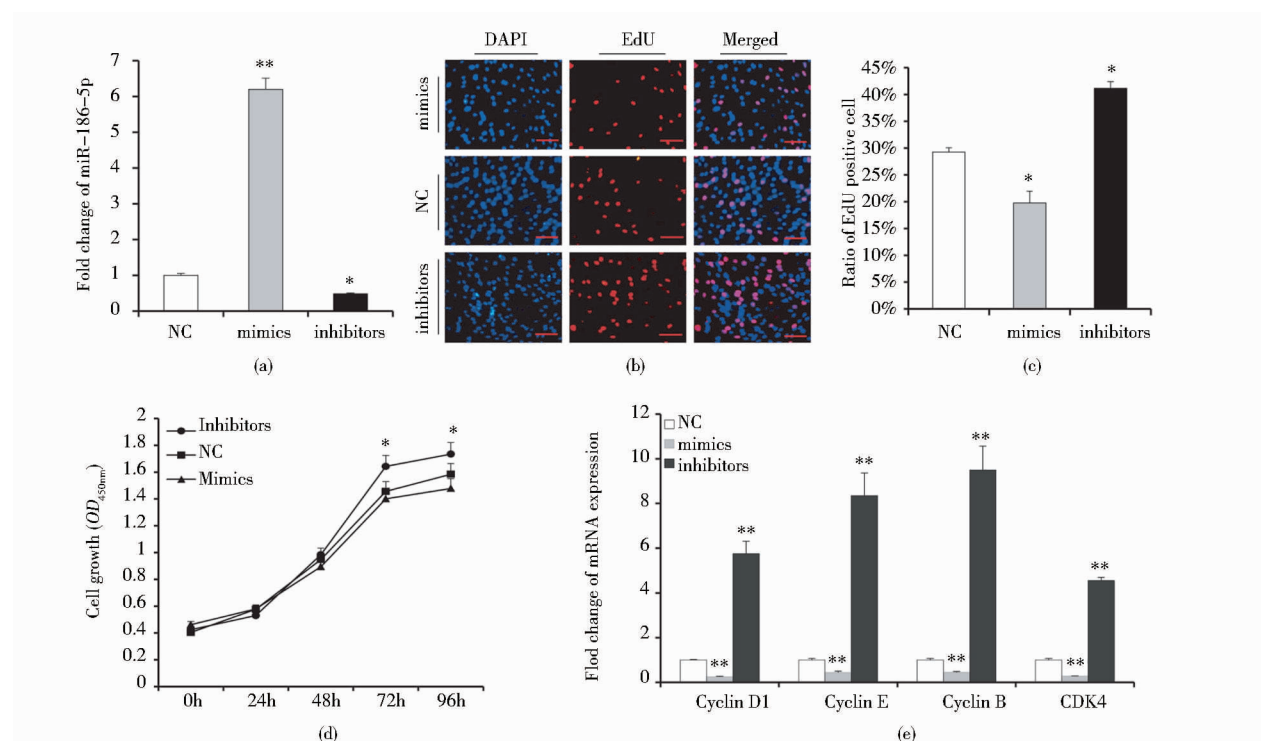


图2 miR-186-5p 对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖的影响

Fig. 2 The effect of miR-186-5p on proliferation of 3T3-L1 preadipocytes

(a) MiR-186-5p transfection efficiency (b)-(d) Cell proliferation was assessed by EdU and CCK-8 (e) mRNA levels of cell cycle related genes were detected by qRT-PCR \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

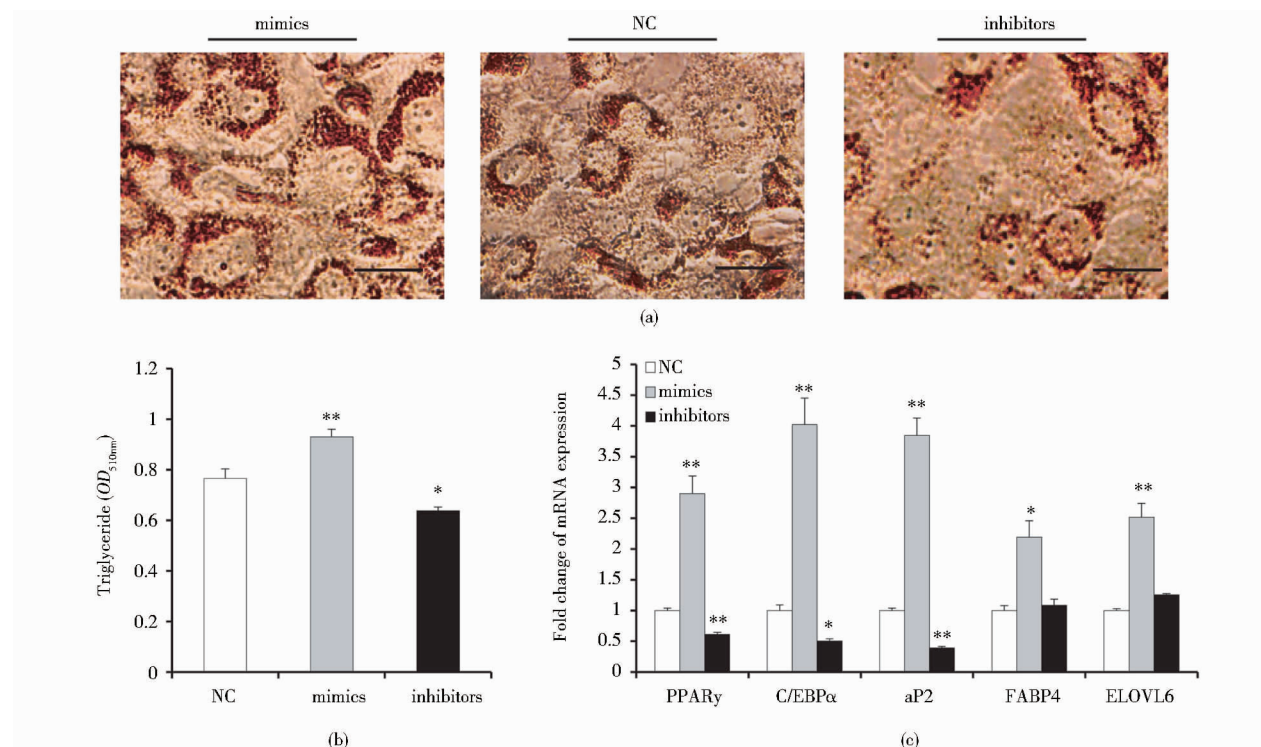


图3 miR-186-5p 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响

Fig. 3 The effect of miR-186-5p on differentiation of 3T3-L1 preadipocytes

(a) Oil red O staining results (b) Triglyceride content in adipocyte after overexpression or inhibition of miR-186-5p (c) The expression levels of PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , aP2, FABP4, ELOVL6 and LPL were detected by qRT-PCR \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

抑制剂处理组 *PPAR $\gamma$* 、*C/EBP $\alpha$* 、*aP2*、*ELOVL6*、*LPL* 的表达量分别减少了 38.8%、49.7%、60.6%、44.4%、56.5% (图 3c)。综上所述,miR-186-5p 可在细胞水平上促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞。

### 3.4 miR-186-5p 的靶基因验证

同源性分析结果显示:miR-186-5p 成熟体序列在人、小鼠、大鼠、猕猴中高度保守(图 4a)。随后,利用生物信息在线软件 TargetScan 7.1 对 miR-186-5p 的靶基因进行预测,发现 *Wnt5a* 的 3'-UTR 的第 2837~2843 位碱基、*Mapk1* 3'-UTR 的第 3675~3681 位碱基与 miR-186-5p 的种子序列反向互补(图 4a)。与此同时,miR-

186-5p 和 *Wnt5a*、*Mapk1* 在小鼠肥胖模型中呈相反表达模式(图 4b),在 3T3-L1 前脂肪细胞中过表达或抑制 miR-186-5p 可分别减少或增加 *Wnt5a* 和 *Mapk1* 表达(图 4c),暗示 *Wnt5a* 和 *Mapk1* 是 miR-186-5p 的潜在靶基因。为确认上述猜想,进一步执行了双萤光素酶报告系统实验。结果显示:与对照组相比,过表达 miR-186-5p 可显著抑制野生型 *Wnt5a* 和 *Mapk1* 的 3'-UTR 萤光素酶活性,而突变相应的结合位点后,该抑制作用被解除,表明 miR-186-5p 可直接靶向结合 *Wnt5a* 和 *Mapk1* (图 4d、e)。

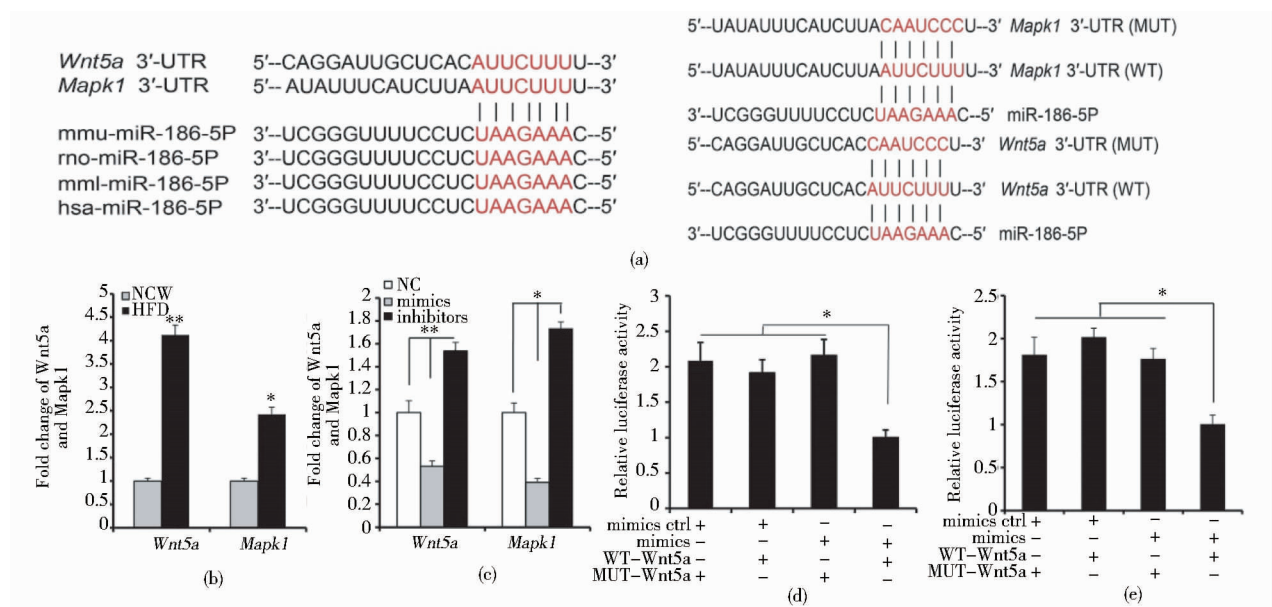


图 4 miR-186-5p 同源性分析及潜在靶基因预测

Fig. 4 Homology analysis and prediction of miR-186-5p potential target genes

(a) The conservation of miR-186-5p species and binding sites with *Wnt5a* and *Mapk1* (b) The expression levels of *Wnt5a* and *Mapk1* in adipose tissue of HFD or NCW fed mice were detected by qRT-PCR (c) The expression levels of *Wnt5a* and *Mapk1* were detected by qRT-PCR after 8d (d) The effect of miR-186-5p on the activity of *Wnt5a* and *Mapk1* 3'-UTR was detected by luciferase assay \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

## 4 讨论

MicroRNAs 是一类保守性高,具有时空特异性,且在动植物体内广泛存在的小分子 RNA。研究证明,miRNAs 可在转录后水平调节基因的表达,介导复杂生物学过程的发生。脂质代谢紊乱导致的肥胖是诱发心血管疾病、慢性炎症、非酒精性脂肪肝的高风险因子。最近的研究表明,miRNAs 在脂肪细胞发育过程中扮演着重要角色。例如,miR-143 可通过靶向调节肝素结合生长因子(PTN)表达促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟的脂肪细胞,诱导脂质沉积<sup>[25]</sup>;在猪肌肉前体脂肪细

胞中,miR-425-5p 抑制猪肌肉前体脂肪的增殖和分化,通过靶向调控 *KLF13* 来下调相关基因和蛋白质的表达<sup>[26]</sup>;miR-17-92 簇可通过负向调节肿瘤抑制蛋白 Rb2/p130 促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化<sup>[27]</sup>。相反,miR-27a 和 miR-27b 可抑制 3T3-L1 前脂肪细胞分化<sup>[28]</sup>;在肥胖人群内脏脂肪中 miR-146b 高表达,且在人体内脂肪前脂肪细胞中 miR-146b 通过靶向 *KLF7* 促进人体内脂肪前脂肪细胞分化、抑制其增殖<sup>[29]</sup>。miR-186-5p 是一个在物种间高度保守、在人类癌症发生过程中扮演重要角色并可作为癌症潜在治疗靶点的小 RNA 分子<sup>[30-32]</sup>。尽管已有证据表明 miR-186-5p 与巨噬细胞内



脂质沉积、干细胞成脂相关<sup>[22]</sup>,但其对白色脂肪发育的影响及其分子机制尚无报道。

为探究 miR-186-5p 对脂肪细胞发育的影响,本研究以 3T3-L1 前脂肪细胞和高脂诱导肥胖小鼠为研究模型,首先采用实时荧光定量技术对 miR-186-5p 在不同周龄小鼠白色脂肪中的表达量和 3T3-L1 前脂肪细胞自然分化状态下的表达变化进行分析,发现 miR-186-5p 在小鼠脂肪发育过程及 3T3-L1 前脂肪细胞分化过程中呈先升高再降低的表达模式。值得注意的是,饲喂高脂日粮可显著降低小鼠白色脂肪组织中 miR-186-5p 的表达水平,由此初步推断 miR-186-5p 与白色脂肪生成相关。前脂肪细胞的增殖、分化是脂肪沉积的基础,增加前脂肪细胞数目、促进前脂肪细胞分化为成熟的脂肪细胞是白色脂肪组织重量增加、体积膨大的重要原因<sup>[33]</sup>。随后,miR-186-5p mimics 及其 inhibitors 被转染入增殖期或分化期的 3T3-L1 前脂肪细胞中以鉴定 miR-186-5p 是否可通过影响 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖与分化来介导白色脂肪发育。CCK-8 和 EdU 结果显示,过表达 miR-186-5p 可抑制 3T3-L1 前脂肪细胞增殖,而 miR-186-5p 的抑制则促进其进一步增殖,表明 miR-186-5p 可负向调控 3T3-L1 前脂肪细胞的增殖速率。此外,油红 O 染色和甘油三酯检测结果显示,3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化后,转染 miR-186-5p mimics 或 inhibitors 可分别促进或抑制其分化效果,影响其甘油三酯积累,表明 miR-186-5p 可促进 3T3-L1 前体脂肪细胞分化为成熟的脂肪细胞。在细胞增殖过程中,细胞周期素(Cyclin)和细胞周期依赖性激酶(CDKs)在细胞周期调控中扮演重要角色。例如,Cyclin D1 和 Cyclin E 通过调控细胞周期依赖素 CDK4、CDK2 从而促进细胞由 G<sub>1</sub> 期进入 S 期<sup>[34-35]</sup>,维持细胞增殖。PPAR $\gamma$  和 C/EBP $\alpha$  是前脂肪细胞分化调控的关键转录因子,二者可通过靶向调节脂肪酸合成与转运相关的 *LPL*、*FABP4* 和 *ELOVL6* 等基因,促进脂肪细胞分化形成脂滴<sup>[36-37]</sup>。与上述增殖、分化实验结果一致,qRT-PCR 检测结果显示,抑制或过表达 miR-186-5p 可分别显著上调或下调 *Cyclin D1*、*Cyclin E* 及 *CDK4* 表达。而与成脂肪分化相关的基因 *PPAR $\gamma$* 、*C/EBP $\alpha$* 、*LPL*、*ELOVL6*、*aP2* 则呈现相反的表达趋势。上述结果证明:miR-186-5p 可通过调节前脂肪细胞增殖和分化相关因子来调控前脂肪细胞的增殖和分化。

miRNAs 可通过其种子序列与靶基因的 3'-UTR 区结合使其失活或降解,抑制其靶基因的表达,从而介导

复杂的生物学过程<sup>[38-39]</sup>。为进一步揭示 miR-186-5p 调控脂肪细胞发育的分子机制,我们利用 TargetScan 在线软件对 miR-186-5p 的靶基因进行预测,发现 *Wnt5a* 与 *Mapk1* 的 3'-UTR 含有 miR-186-5p 种子序列的反向互补序列。同时,qRT-PCR 分析显示:miR-186-5p 和 *Wnt5a*、*Mapk1* 在肥胖、正常小鼠脂肪组织中呈相反的表达模式,在调控 3T3-L1 前脂肪细胞中过表达或抑制 miR-186-5p 可分别显著抑制或促进细胞内 *Wnt5a* 与 *Mapk1* 的表达水平,暗示 *Wnt5a* 和 *Mapk1* 是 miR-186-5p 的潜在靶基因。随后,利用双荧光报告系统来进一步鉴定 miR-186-5p 与 *Wnt5a* 的靶标调控关系。结果表明:miR-186-5p 可直接靶向抑制 *Wnt5a* 和 *Mapk1* 的 3'-UTR 活性。*Wnt5a* 属非经典 WNT 信号通路关键调控因子,可通过增加脂肪组织炎症导致肥胖相关的代谢功能障碍<sup>[40-42]</sup>。在小鼠实验中,敲除 *Wnt5a* 可显著改善肥胖小鼠的胰岛素抵抗,降低葡萄糖耐受与脂肪组织炎症<sup>[41]</sup>。在人间充质干细胞中,*Wnt5a* 可通过激活 JNK 非经典信号通路来促进成骨分化抑制成脂分化,当人间充质干细胞培养液中加入 *Wnt5a* 拮抗剂后,其分化成脂能力增强;而转染 *Wnt5a* 蛋白重组体后,细胞内 PPAR $\gamma$  与 SREBP-1c 等相关成脂分化的标志蛋白水平降低<sup>[43]</sup>。相似地,利用重组蛋白 *Wnt5a* 诱导大鼠脂肪干细胞(rASC)分化为脂肪细胞中,PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  等成脂相关因子的 mRNA 和蛋白质水平均受到抑制,脂肪沉积生成受阻<sup>[44]</sup>。这与 miR-186-5p 过表达结果相同。已有研究表明<sup>[45]</sup>,MAPK 信号通路在脂肪细胞的分化过程中起关键作用;其中 MAPK 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的分化<sup>[46]</sup>,且信号调节激酶 ERK 作为 MAPK 族成员之一,参与了 3T3-L1 前脂肪细胞的分化<sup>[47]</sup>。Huang 等<sup>[48]</sup>研究证明,miR-378a-5p 通过靶向 *Mapk1* 促进了成熟脂肪细胞的生成;相同的,抑制 3T3-L1 前脂肪细胞中 *Mapk1* 的表达,也可促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化成为成熟的脂肪细胞,这与我们的结果相一致。因此,结合本实验的研究结果,我们初步判断 miR-186-5p 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞增殖,同时可通过靶向调节 *Wnt5a* 与 *Mapk1* 的表达来促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化。

**致谢:**感谢农业农村部农业重大技术协同推广计划试点项目“四川省生猪提质增效和粪污资源化利用关键技术推广应用”对本论文的资助。

## 参考文献

- [1] Webb E C, O' Neill H A. The animal fat paradox and meat

- quality. *Meat Science*, 2008, 80 (1): 28-36.
- [ 2 ] Sik C S, Young H J, Jae H I, et al. Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 2016, 7 (Suppl 2): 30.
- [ 3 ] Kahn S E, Hull R L, Utzschneider K M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 2006, 444 (7121): 840-846.
- [ 4 ] Collier A, Ghosh S, McGlynn B, et al. Prostate cancer, androgen deprivation therapy, obesity, the metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease: a review. *Am J Clin Oncol*, 2012, 35 (5): 504-509.
- [ 5 ] Renahan A G, Roberts D L, Dive C. Obesity and cancer: pathophysiological and biological mechanisms. *Archives of Physiology & Biochemistry*, 2008, 114 (1): 71-83.
- [ 6 ] Saadeh S. Nonalcoholic Fatty liver disease and obesity. *Nutrition in Clinical Practice*, 2007, 22 (1): 1-10.
- [ 7 ] Lucas K, Raikhel A S. Insect microRNAs: biogenesis, expression profiling and biological functions. *Insect Biochem Mol Biol*, 2013, 43 (1): 24-38.
- [ 8 ] Diederichs S, Winter J, Jung S, et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 2009, 11 (3): 228-234.
- [ 9 ] Gangaraju V K, Lin H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10 (2): 116-125.
- [ 10 ] Manikandan J, Aarthi J J, Kumar S D, et al. Oncomirs: the potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer. *Bioinformation*, 2008, 2 (8): 330-334.
- [ 11 ] Du J, Zhang P, Gan M, et al. MicroRNA-204-5p regulates 3T3-L1 preadipocyte proliferation, apoptosis and differentiation. *Gene*, 2018, 668 (2): 1-7.
- [ 12 ] 何洪炳, 蔡明成, 梁小虎, 等. miR-130b 靶向 PPAR $\gamma$  抑制家兔前体脂肪细胞分化. *畜牧兽医学报*, 2017, 48 (11): 2076-2083.
- zhang H L, Cai M C, Liang X H, et al. miR-130b targets PPAR $\gamma$  to inhibit the differentiation of preadipocytes in rabbits. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2017, 48 (11): 2076-2083.
- [ 13 ] 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. *中国兽医科学*, 2016, (11): 1450-1455.
- Zhang L H, Ou Y D, Xu L F, et al. Effect of miR-92a-3p on proliferation and differentiation of 3T3-L1 precursors. *Chinese Veterinary Science*, 2016, (11): 1450-1455.
- [ 14 ] Diawara M R, Hue C, Wilder S P, et al. Adaptive expression of microRNA-125a in adipose tissue in response to obesity in mice and men. *Plos One*, 2014, 9 (3): e91375.
- [ 15 ] Hong L J, Cheng C S, Yue F L, et al. miR-125a inhibits porcine preadipocytes differentiation by targeting ERR $\alpha$ . *Molecular & Cellular Biochemistry*, 2014, 395 (1-2): 155-165.
- [ 16 ] Qiu H, Yuan S, Lu X. miR-186 suppressed CYLD expression and promoted cell proliferation in human melanoma. *Oncology Letters*, 2016, 12 (4): 2301-2306.
- [ 17 ] Anamaria B. The relationship between platinum drug resistance and epithelial mesenchymal transition. *Archives of Toxicology*, 2016, 91 (2): 1-15.
- [ 18 ] Li J L, Xia L M, Zhou Z H, et al. MiR-186-5p upregulation inhibits proliferation, metastasis and epithelial-to-mesenchymal transition of colorectal cancer cell by targeting ZEB1. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 2018, 640 (2): 53-60.
- [ 19 ] Lan T, Yan X, Li Z, et al. Long non-coding RNA PVT1 serves as a competing endogenous RNA for miR-186-5p to promote the tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*, 2017, 39 (6): 1-11.
- [ 20 ] Jin W, Dodson M V, Moore S S, et al. Characterization of microRNA expression in bovine adipose tissues: a potential regulatory mechanism of subcutaneous adipose tissue development. *BMC Molecular Biology*, 2010, 11 (1): 21-29.
- [ 21 ] Ali A S, Ali S, Ahmad A, et al. Expression of microRNAs: potential molecular link between obesity, diabetes and cancer. *Obesity Reviews*, 2011, 12 (12): 1050-1062.
- [ 22 ] Yao Y, Zhang X, Chen H P, et al. MicroRNA-186 promotes macrophage lipid accumulation and secretion of pro-inflammatory cytokines by targeting cystathionine  $\gamma$ -lyase in THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*, 2016, 250 (Complete): 122-132.
- [ 23 ] Kras K M, Hausman D B, Hausman G J, et al. Adipocyte development is dependent upon stem cell recruitment and proliferation of preadipocytes. *Obesity research*, 1999, 7 (5): 491-497.
- [ 24 ] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 2001, 25 (4): 402-408.
- [ 25 ] Yi C, Xie W D, Li F, et al. MiR-143 enhances adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells through targeting the coding region of mouse pleiotrophin. *Febs Letters*, 2011, 585 (20): 3303-3309.
- [ 26 ] Chen F F, Yan X, Ying P, et al. miR-425-5p inhibits differentiation and proliferation in porcine intramuscular preadipocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18 (10): 2101.
- [ 27 ] Wang Q, Li Y C, Wang J, et al. miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (8): 2889-



- 2894.
- [28] Zou B, Ge Z, Zhu W, et al. Persimmon tannin represses 3T3-L1 preadipocyte differentiation via up-regulating expression of miR-27 and down-regulating expression of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in the early phase of adipogenesis. *Eur J Nutr*, 2015, 54 (8): 1333-1343.
- [29] Chen L, Dai Y M, Ji C B, et al. MiR-146b is a regulator of human visceral preadipocyte proliferation and differentiation and its expression is altered in human obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 393 (1-2): 65-74.
- [30] Chen F, Zhou C, Lu Y X, et al. Expression of hsa-miR-186 and its role in human colon carcinoma cells. *Journal of Southern Medical University*, 2013, 33 (5): 654-660.
- [31] Cai J, Wu J, Zhang H, et al. miR-186 downregulation correlates with poor survival in lung adenocarcinoma, where it interferes with cell-cycle regulation. *Cancer Research*, 2013, 73 (2): 756-766.
- [32] Wang H, Shen Q, Zhang X, et al. The long non-coding RNA XIST controls non-small cell lung cancer proliferation and invasion by modulating miR-186-5p. *Cellular Physiology & Biochemistry International Journal of Experimental Cellular Physiology Biochemistry & Pharmacology*, 2017, 41 (6): 2221-2229.
- [33] Cornelius P, MacDougald O A, Lane M D. Regulation of adipocyte development. *Annual Review of Nutrition*, 1994, 14 (1): 99-129.
- [34] Stacey D W. Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 2003, 15 (2): 158-163.
- [35] Kozar K, Sicinski P. Cell cycle progression without cyclin D-CDK4 and cyclin D-CDK6 complexes. *Cell Cycle*, 2005, 4 (3): 388-391.
- [36] Pu Y, Veiga - Lopez A. PPAR $\gamma$  agonist through the terminal differentiation phase is essential for adipogenic differentiation of fetal ovine preadipocytes. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2017, 22 (1): 6.
- [37] Choi S K, Park S, Jang S, et al. Cascade regulation of PPAR $\gamma$  2 and C/EBP $\alpha$  signaling pathways by celastrol impairs adipocyte differentiation and stimulates lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Metabolism Clinical & Experimental*, 2016, 65 (5): 646-654.
- [38] Bartel D P. MicroRNAs : genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [39] Shukla G C, Singh J, Barik S. MicroRNAs; processing, maturation, target recognition and regulatory functions. *Molecular & Cellular Pharmacology*, 2011, 3 (3): 83-92.
- [40] Rauner M, Stein N, Winzer M, et al. WNT5A is induced by inflammatory mediators in bone marrow stromal cells and regulates cytokine and chemokine production. *Journal of Bone & Mineral Research*, 2012, 27 (3): 575-585.
- [41] Fuster J J, Zuriaga M A, Ngo T M, et al. Noncanonical wnt signaling promotes obesity-induced adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction independent of adipose tissue expansion. *Atherosclerosis*, 2015, 64 (4): 1235-1248.
- [42] Victoria C, Javier G A, Amaia R, et al. Activation of noncanonical Wnt signaling through WNT5A in visceral adipose tissue of obese subjects is related to inflammation. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2014, 99 (8): 1407-1417.
- [43] Matthias L. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285 (2): 6170-6178.
- [44] Tang Q, Chen C, Zhang Y, et al. Wnt5a regulates the cell proliferation and adipogenesis via MAPK - independent pathway in early stage of obesity. *Cell biology international*, 2018, 42 (1): 63-74.
- [45] Bost F, Aouadi M, Caron L, et al. The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie*, 2005, 87 (1): 51-56.
- [46] Adams M, Montague C T, Prins J B, et al. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *The Journal of Clinical Investigation*, 1997, 100 (12): 3149-3153.
- [47] Tanabe Y, Koga M, Saito M, et al. Inhibition of adipocyte differentiation by mechanical stretching through ERK-mediated downregulation of PPAR $\gamma$ 2. *Journal of Cell Science*, 2004, 117 (16): 3605-3614.
- [48] Huang N N, Wang J, Xie W D, et al. MiR-378a-3p enhances adipogenesis by targeting mitogen-activated protein kinase 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 457 (1): 37-42.

## The Effect of miR-186-5p on the Proliferation and Differentiation of 3T3-L1 Preadipocyte

GU Hao<sup>1,2</sup> GUO Xin-yu<sup>1,2</sup> DU Jing-jing<sup>1,2</sup> ZHANG Pei-wen<sup>1,2</sup> WANG Ding-guo<sup>3</sup>  
LIAO Kun<sup>4</sup> ZHANG Shun-hua<sup>1,2</sup> ZHU Li<sup>1,2</sup>

(1 Sichuan Agricultural University College of Animal Science and Technology, Chengdu 611130, China)

(2 Farm Animal Genetic Resources Exploration and Innovation Key Laboratory of Sichuan Province,  
Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

(3 Chengdu animal disease prevention and control center, Chengdu 610041, China)

(4 Agricultural Bureau Animal Husbandry Station of Tongjiang, Bazhong 636600, China)

**Abstract** Objective: To investigate the effect of miR-186-5p on the proliferation and differentiation of mouse 3T3-L1 preadipocytes and its potential molecular mechanism. Methods: qRT-PCR was utilized to measure the expression levels of miR-186-5p in adipose tissue of different-age mice or during the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocyte; miR-186-5p mimics or inhibitors were transfected into the 3T3-L1 adipocytes cultured in growth or differentiation medium using lipofectamine; CCK-8, EdU, qRT-PCR or Oil red O staining were performed to determine the effect of miR-186-5p on 3T3-L1 preadipocyte proliferation or differentiation, respectively. Meanwhile, TargetScan and dual-luciferase assay were used to predict and confirm the target genes of miR-186-5p. Results: With aging of mice or 3T3-L1 preadipocytes differentiation into mature adipocyte, the mRNA levels of miR-186-5p were upregulated gradually. When compared to the negative control, notably, mimics or inhibitors transfection could remarkably increase or decrease the expression levels of miR-186-5p, respectively. MiR-186-5p overexpression significantly inhibited the 3T3-L1 preadipocyte proliferation and promoted its differentiation, and in contrast, miR-186-5p inhibition had opposite effect on 3T3-L1 preadipocyte proliferation and differentiation compared to the overexpression group. Further, overexpression of miR-186-5p significantly repressed the relative luciferase activity of wild type-*Wnt5a* and *Mapk1* 3'-UTR were found, whereas its inhibition effect was abolished by the mutation of the binding sites. Conclusions: miR-186-5p inhibits the proliferation of 3T3-L1 preadipocyte and promotes its differentiation by targeting *Wnt5a* and *Mapk1*.

**Key words** 3T3-L1 preadipocyte miR-186-5p Differentiation Proliferation *Wnt5a* *Mapk1*