



[DOI]10.3969/j.issn.1001-9057.2021.01.014

<http://www.lenkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2021.01.014>

· 临床研究 ·

微小 RNA-199-3p 通过一磷酸腺苷活化蛋白激酶/雷帕霉素靶蛋白通路抑制高糖诱导的白色脂肪细胞分化

胡淑芳 刘玄林 杨丽

[摘要] **目的** 探讨微小 RNA(miR)-199a-3p 与 2 型糖尿病(T2DM)病理特征关系及其对白色脂肪细胞分化和脂肪炎症调控的分子机制。**方法** 收集 2015 年 6 月~2018 年 4 月就诊于我院的 131 例 T2DM 患者(T2DM 组)与 146 例健康志愿者(NC 组)的临床资料。采用 RT-qPCR 检测外周血 has-miR-199a-5p、has-miR-199a-3p、has-miR-199b-5p 和 has-miR-199b-3p 水平;采用 ELISA 检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、瘦素、脂联素、内脂素、抵抗素和白细胞介素-6(IL-6)含量,并探讨其与 miR-199a-3p 的相关性。3T3-L1 细胞经高糖、低糖和分化诱导处理后,采用 RT-qPCR 检测 3T3-L1 细胞中 has-miR-199a-3p 含量,ELISA 检测 TNF- α 和 IL-6 含量;油红 O 染色观察 miR-199a-3p 类似物(mimics)处理高糖诱导的 3T3-L1 脂滴形成;Western blot 检测 mimics 干预高糖处理 3T3-L1 细胞中胰岛素受体底物-1(IRS-1)、磷酸化磷脂酰肌醇-3 激酶 P85 亚基(p-P85)、磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)、磷酸化糖原合成酶激酶 3 β (p-GSK3 β)、葡萄糖转运体-4(GLUT-4)、磷酸化信号传导与转录激活因子-3(p-STAT3)、磷酸化一磷酸腺苷活化蛋白激酶(p-AMPK)、磷酸化雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)、NAD-依赖性去乙酰化酶(SIRT1)和过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)蛋白表达。采用 Pearson 相关分析评估各变量间的相关性。**结果** T2DM 组患者血浆 miR-199a-3p、miR-199b-5p 和 miR-199b-3p 均明显低于 NC 组($P < 0.05$)。重度 T2DM 组患者 miR-199a-3p 含量明显低于轻、中度 T2DM 组($P < 0.05$)。T2DM 组血浆 miR-199a-3p 含量与空腹胰岛素(FIns)、空腹血糖(FPG)、胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)、TNF- α 及 IL-6 呈负相关($P < 0.05$)。高糖组 miR-199a-3p 含量高于对照组,分化的脂肪细胞内 miR-199a-3p 含量明显高于 3T3-L1 细胞($P < 0.05$),mimics 组油脂滴数量明显低于阴性对照组。高糖+抗 miR-199a-3p 组的 p-AMPK、p-mTOR、SIRT-1 和 PPAR- γ 蛋白表达均明显低于高糖组($P < 0.05$),两组 IRS-1、p-P85、p-AKT、p-GSK3 β 和 Glut-4 蛋白表达比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** T2DM 患者外周血中 miR-199a-3p 呈低表达,且与血糖、胰岛素抵抗、脂肪因子和炎症因子含量呈负相关,其可能通过调控 AMPK/mTOR 及 PPAR- γ 和 SIRT-1 蛋白表达,影响 IL-6 和 TNF- α 炎症因子释放参与白色脂肪细胞炎症和脂肪细胞分化再生。

[关键词] 2 型糖尿病; 微小 RNA-199a-3p; 脂肪再生; 脂肪因子; 炎症因子; 一磷酸腺苷活化蛋白激酶/雷帕霉素靶蛋白信号通路

[中图分类号] R589.2 **[文献标识码]** A

MicroRNA-199-3p inhibits high glucose-induced differentiation of white adipocytes via the adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase/mammalian target-of-rapamycin pathway Hu Shufang, Liu Xuanlin, Yang Li. Department of Endocrinology, Hankou Hospital of Wuhan City, Wuhan 430012, China

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between microRNA(miR)-199a-3p and type 2 diabetes mellitus(T2DM) and its effect on white adipocyte differentiation and inflammation. **Methods** The clinical and pathological data of 131 T2DM patients and 146 healthy volunteers(NC group) from June, 2015 to April, 2018 were collected. RT-qPCR was used to detect the levels of has-miR-199a-5p, has-miR-199a-3p, has-miR-199b-5p and has-miR-199b-3p in peripheral blood. Tumor

基金项目:武汉市卫生和计划生育委员会科研项目(WX15D39、WZ16C22)

作者单位:430012 湖北省武汉市汉口医院内分泌科

通讯作者:杨丽, E-mail: yangli_0126@sina.com

necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), leptin, adiponectin, visfatin, resistin and interleukin-6 (IL-6) contents were measured by ELISA, and the correlation with miR-199a-3p was detected. After treated with high glucose, low glucose and differentiation induction, the content of has-miR-199a-3p in 3T3-L1 cells was detected by RT-qPCR. TNF- α and IL-6 levels were detected by ELISA, as well as differentiation induction medium treatment. Oil red O staining was used to detect lipid droplets in 3T3-L1 cells after high-glucose and miR-199a-3p analogues (mimics) treatment. Western blotting was used to detect insulin receptor substrate-1 (IRS-1), phosphorylation Phosphatidylinositol-3 kinase P85 subunit (p-P85), phosphorylated protein kinase B (p-AKT), phosphorylated glycogen synthase kinase 3 β (p-GSK3 β), glucose transporter-4 (GLUT-4), phosphorylated signal transduction and transcription activator-3 (p-STAT3), phosphorylated adenosine monophosphate activated protein kinase (p-AMPK), phosphorylated target of rapamycin (p-mTOR), NAD-dependent acetylase (SIRT1) and peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ) protein expression after miR-199a-3p mimics treatment in high glucose treated 3T3-L1 cells. *Pearson* analysis was used to evaluate the correlation. **Results** Plasma miR-199a-3p, miR-199b-5p and miR-199b-3p in the T2DM group were significantly lower than those of NC group ($P < 0.05$). The content of miR-199a-3p was significantly lower in severe T2DM group compared with mild to moderate T2DM group ($P < 0.05$). Plasma miR-199a-3p content in T2DM group was negatively correlated with fasting insulin (FIns), fasting plasma glucose (FPG), insulin resistance index (HOMA-IR), TNF- α and IL-6 ($P < 0.05$). The levels of miR-199a-3p in high glucose group and conventionally differentiated adipocytes was significantly lower, TNF- α and IL-6 were higher than those in control group and undifferentiated cells ($P < 0.05$). The number of oil droplets in the miR-199a-3p mimics group was significantly lower than that in the negative control group ($P < 0.05$). The protein expressions of p-AMPK, p-mTOR, SIRT-1 and PPAR- γ in the high glucose + anti-miR-199a-3p group were significantly lower than those in the high glucose group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of p-P85, p-AKT, p-GSK3 β and Glut-4 protein ($P > 0.05$). **Conclusion** MiR-199a-3p is lowly expressed in peripheral blood of T2DM and significantly indicates blood glucose, insulin resistance adipokines and inflammatory factors. It is involved in adipocyte inflammation and adipocyte differentiation and adipogenesis by regulation of the release of inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 through regulating AMPK/mTOR pathway, SIRT-1 and PPAR- γ proteins expression.

[Key words] Type 2 diabetes; MicroRNA-199a-3p; Adipogenesis; Adipokines; Inflammatory factors; Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase/mammalian target-of-rapamycin signaling pathway

白色脂肪组织 (WAT) 和棕色脂肪组织 (BAT) 是内分泌信号传导和免疫炎症反应调节的重要场所^[1-2]。研究发现, 白色脂肪细胞释放代谢和免疫因子, 包括瘦素、抵抗素、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素 6 (IL-6) 等调控肥胖和 2 型糖尿病 (T2DM) 中脂肪细胞再生、分化、增生和肥大, 以及胰岛素抵抗 (IR) 和炎症反应^[3-6]。微小 RNA (miRNA, miR) 在代谢疾病中具有重要调节作用^[7-9]。近年来研究结果显示, 上调 miR-26a 和 miR-206-3p 等表达可体外促进脂肪细胞分化^[10-13]。有研究发现, T2DM 患者和模型小鼠的 miR-199a-3p 表达明显下调^[14-15]; 且 miR-199a-3p 在人脂肪细胞中呈低表达, 并受游离脂肪酸和多种脂肪因子调节^[16-17]。最新研究证实, miR-199a-3p 在分化的人脂肪来源的间充质干细胞中呈高表达, 并下调 KDM6A/WNT 信号通路抑制脂肪细胞分化^[18]。然而, miR-199a-3p 的差异表达与脂肪细胞再生、分化之间的关联仍有待阐明。因此, 本研究通过体外实验分析 miR-199a-3p 与 T2DM 临床表征的相关性及其对白色脂肪细胞代谢和脂肪因子分泌及分化的影响, 探讨 miR-199a-3p 参与调控脂肪细胞再生的分子机制, 为 T2DM 的诊断提供更好的生物标记物和治疗靶点提供理论参考。

对象与方法

1. 对象: 2015 年 6 月 ~ 2018 年 4 月于我院就诊的 T2DM 患者 131 例 (T2DM 组), 其中男 101 例, 女 30 例, 年龄 20 ~ 38 岁, 平均年龄 (28.3 \pm 8.6) 岁。依据各临床诊断指标水平^[19] 分为: 轻度糖尿病组 (54 例): 空腹血糖 (FPG) 长期保持稳定 (7.0 ~ 8.4 mmol/L), 无低血糖发生, 无急、慢性并发症, 体重正常, 生活起居自如, 能胜任正常工作; 中度糖尿病组 (48 例): 8.4 mmol/L \leq FPG \leq 10.1 mmol/L 或波动较大, 偶有反复发生糖尿病急性和慢性并发症; 重症糖尿病组 (29 例): FPG $>$ 10.1 mmol/L 或波动较大, 反复发生糖尿病急性并发症, 并已经出现慢性并发症。同期征集健康志愿者 146 例 (NC 组), 男 118 例, 女 28 例, 年龄 25 ~ 39 岁, 平均年龄 (32.3 \pm 5.4) 岁。本研究经我院伦理委员会审核批准, 所有研究对象均签署知情同意书。

2. 方法

(1) 临床资料收集: 收集研究对象的年龄、身高、体重、腰围、血压。禁食 12 h 后采集静脉血检测 ALT、AST、FPG、空腹胰岛素 (FIns)、总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 和高密度脂蛋

白胆固醇(HDL-C)、肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN),并计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR), $HOMA-IR = FPG (mmol/L) \times FIns (\mu U/ml) / 22.5$ 。

(2)外周血浆 has-miR-199 家族检测:采用 RT-qPCR 法检测患者外周血浆 has-miR-199a-5p、has-miR-199a-3p、has-miR-199b-5p 和 has-miR-199b-3p 含量,并进行相关性分析。取 250 μ l 血浆加入 750 ml Trizol 颠倒混匀 10 次,室温静置 5 min,4 $^{\circ}$ C、14 000 g 离心 20 min,吸取上清 200 μ l 至新 EP 管中,并加入 200 μ l 异丙醇颠倒混匀 10 次,4 $^{\circ}$ C、14 000 g 离心 10 min,弃上清,加入 75% 乙醇 400 μ l 悬浮沉淀。以 7 500 g 离心 10 min,弃上清后室温挥发 20 min,加入 30 μ l TE buffer 溶解。采用 NanoDrop 2000 检测浓度和纯度。取 1 000 ng RNA 采用 has-miR-199a-5p、has-miR-199a-3p、has-miR-199b-5p 和 has-miR-199b-3p 特异性逆转录引物(由广州锐博生物技术公司提供,逆转录试剂盒为 Thermo Fisher K1621)合成 cDNA,以 30 ng cDNA 为模板,以 20 μ l 的 RT-qPCR 反应体系检测相关基因 mRNA 水平(SYB Green I 染料 TaKaRa RR420A)。反应程序:95 $^{\circ}$ C 15 min,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,扩增 40 个循环。以 U6 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 has-miR-199a-5p、has-miR-199a-3p、has-miR-199b-5p 和 has-miR-199b-3p 相对表达量。

(3)外周血浆脂肪因子与炎症因子含量检测:取患者外周血浆 100 ml,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 TNF- α 、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、瘦素、脂联素、内脂素、抵抗素和 IL-6 含量。

(4)3T3-L1 细胞培养与处理:3T3-L1 细胞(购自武汉塞维尔生物技术有限公司)在 42 $^{\circ}$ C 条件下复苏后,加入 10% 胎牛血清(FBS)的杜氏改良 Eagle(DMEM)高糖培养基,并置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,常规传代。取 5 代以上细胞接种于 12 孔(5×10^4 个/孔)中 24 h 后,更换为 5 mmol/L 和 25 mmol/L 葡萄糖完全培养基,同时,取 12 孔培养 24 h 的 3T3-L1 细胞(2×10^5 个/孔),加入分化诱导剂(1.7 μ mol/L 胰岛素,0.5 mmol/L IBMX 和 1 μ mol/L 地塞米松)4 天后,更换为维持液(2.0 μ mol/L 胰岛素),采用 ELISA 检测上清 TNF- α 和 IL-6 含量。

(5)转染和油红 O(ORO)染色:取 miR-199a-3p 类似物(mimics)和对照类似物干粉,依照说明加入无菌 TE 溶液溶解至 50 mmol/L。取两支 1.5 ml Ep 管,各加入 100 μ l Opti-MEM 后分别加入 mimics 或阴性对照类似物和 5 μ l Lipo2000,混匀后室温孵育 3 min,并将两者混合再室温孵育 20 min,滴加入高糖 DMEM (25 mmol/L)和低糖 DMEM (5 mmol/L)处理 12 h 的 3T3-L1 细胞中 24 h 培养进行 ORO 染色。

(6)蛋白表达检测:取接种于 12 孔的 3T3-L1 细胞,分为低糖组、高糖组、高糖 + 抗 miR-199a-3p 组。12 h 后更换培养基,并相应转染 mimics 或对照类似物至 48 h 后。采用 2 \times 样本缓冲液处理细胞,超声 10 s 破碎细胞并于 95 $^{\circ}$ C 干热变性 5 min 后,常规十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,200 mA 湿法转移 2 h 至聚偏二氟乙烯膜上,2% 牛血清白蛋白封闭 30 min 后加入一抗[兔抗鼠-胰岛素受体底物-1(IRS-1)、兔抗鼠-磷酸化磷脂酰肌醇-3 激酶 P85 亚基(p-P85)、兔抗鼠-磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)、兔抗鼠-磷酸化糖原合成酶激酶 3 β (p-GSK3 β)、兔抗鼠-葡萄糖转运体-4(Glut-4)、兔抗鼠- β -actin、兔抗鼠-磷酸化信号传导与转录激活因子-3(p-STAT3)、兔抗鼠-磷酸化一磷酸腺苷活化蛋白激酶(p-AMPK)、兔抗鼠-磷酸化雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)、兔抗鼠-NAD-依赖性去乙酰化酶(SIRT1)和兔抗鼠-过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)]4 $^{\circ}$ C 12 h 后,兔二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,常规三乙醇胺缓冲液漂洗 4 次,每次 5 min。电致发光显影并应用 Image J2x 软件分析灰度变化。

3. 统计学处理:应用 SPSS 23.0 软件进行统计分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。采用 Pearson 相关分析评估两个变量之间的相关性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 GraphPad 8.0 软件绘图。

结 果

1. T2DM 组与 NC 组临床资料比较:T2DM 组与 NC 组年龄、性别、血压比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。T2DM 组患者的 BMI、腰围、ALT、AST、FPG、FIns、HOMA-IR、TC、TG、LDL-C、Scr、BUN 均明显高于 NC 组,HDL-C 明显低于 NC 组($P < 0.05$)。见表 1。

2. T2DM 组与 NC 组 miR-199a 含量比较:T2DM 组血浆 miR-199a-3p、miR-199b-5p 和 miR-199b-3p 含量均明显低于 NC 组($P < 0.05$),两组 miR-199a-5p 含量比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。在不同程度 T2DM 患者中,重度 T2DM 组 miR-199a-3p 含量(6.11 ± 0.82)明显低于轻、中度 T2DM 组(2.79 ± 0.46 、 4.62 ± 0.59 , $P < 0.05$)。

3. T2DM 患者 miR-199a-3p 含量与血糖、生化指标的相关分析:T2DM 组血浆 miR-199a-3p 含量与 BMI($r = -0.542$, $P = 0.011$)、腰围($r = -0.813$, $P = 0.032$)、FIns($r = -0.542$, $P < 0.001$)、FPG($r = -0.705$, $P < 0.001$)和 HOMA-IR($r = -0.577$, $P < 0.001$)呈明显负相关,与血脂、肝肾功能无显著相关性($P > 0.05$)。

4. T2DM 组与 NC 组血浆炎症因子和脂肪因子比

表 1 T2DM 组与 NC 组临床资料比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	年龄 (岁)	男/女 (例数)	BMI (kg/m ²)	收缩压 (mmHg)	舒张压 (mmHg)	腰围 (cm)	ALT (U/L)	AST (U/L)	SCr (mmol/L)
NC 组	146	32.3 ± 5.4	118/28	23.1 ± 0.7	121.7 ± 3.4	78.5 ± 2.9	85.9 ± 1.3	23.9 ± 3.8	23.5 ± 3.6	35.4 ± 4.9
T2DM 组	131	28.3 ± 8.6	101/30	25.1 ± 2.4	128.3 ± 4.2	78.2 ± 3.8	90.9 ± 4.5	66.1 ± 2.9	57.8 ± 1.5	78.9 ± 11.6
P 值		0.688	0.586	0.512	0.425	0.920	0.065	0.002	0.002	0.0058

组别	例数	BUN (mmol/L)	FIns (ng/ml)	FPG (mmol/L)	HOMA-IR	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
NC 组	146	2.3 ± 0.7	1.1 ± 0.2	5.5 ± 0.8	1.7 ± 0.2	4.9 ± 0.1	1.7 ± 0.1	3.0 ± 1.2	1.0 ± 0.1
T2DM 组	131	4.7 ± 1.0	5.7 ± 1.2	9.3 ± 2.4	5.3 ± 1.9	6.7 ± 1.4	7.3 ± 2.3	1.1 ± 0.5	6.9 ± 0.8
P 值		0.035	0.005	0.002	0.027	0.025	0.002	0.006	0.010

表 2 T2DM 组与 NC 组 miR-199a 和 miR-199b 含量比较

组别	例数	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-199b-3p
NC 组	146	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
T2DM 组	131	1.18 ± 0.16	4.15 ± 0.13	1.62 ± 0.22	1.77 ± 0.29
P 值		0.956	0.015	0.042	0.038

表 3 T2DM 组与 NC 组血浆炎症因子和脂肪因子水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TNF- α (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)	瘦素 (ng/ml)	脂联素 (mg/ml)	内脂素 (ng/ml)	抵抗素 (ng/ml)
NC 组	146	39.5 ± 8.2	5.4 ± 0.9	201.2 ± 21.1	24.6 ± 6.4	18.26 ± 3.2	3.7 ± 0.5	19.2 ± 2.4
T2DM 组	131	72.8 ± 11.3	18.5 ± 0.7	582.5 ± 32.9	44.4 ± 7.1	12.32 ± 2.1	7.5 ± 0.8	22.5 ± 3.5
P 值		0.006	0.017	0.009	0.018	0.017	0.018	0.241

较;T2DM 组血浆炎症因子 TNF- α 、IL-6、MCP-1 及脂肪因子瘦素、内脂素、抵抗素水平均明显高于 NC 组,脂联素水平明显低于 NC 组($P < 0.05$)。见表 3。

5. T2DM 患者 miR-199a-3p 含量与脂肪因子和炎症因子的相关分析:T2DM 组血浆 miR-199a-3p 含量与 TNF- α ($r = -0.542, P = 0.001$) 及 IL-6 ($r = -0.382, P < 0.001$) 呈负相关,与 MCP-1、瘦素、脂联素、内脂素和抵抗素无明显相关性($P > 0.05$)。

6. miR-199a-3p 对脂肪细胞分化的影响:高糖组 miR-199a-3p 含量高于对照组(2.65 ± 0.03 比 1.00 ± 0.00, $P = 0.013$),分化的脂肪细胞内 miR-199a-3p 含量明显高于 3T3-L1 细胞(3.32 ± 0.11 比 1.00 ± 0.00, $P = 0.001$)。高糖组 TNF- α 和 IL-6 的含量明显高于对照组(分别为 42.45 ± 8.06 比 24.60 ± 4.21, 62.25 ± 8.13 比 29.50 ± 3.52, $P < 0.05$),分化的脂肪细胞 TNF- α 和 IL-6 含量明显高于 3T3-L1 细胞(分别为 43.75 ± 8.18 比 27.60 ± 4.15, 52.6 ± 8.03 比 23.9.60 ± 4.19, $P < 0.05$)。ORO 染色结果显示,高糖组较对照组油脂滴明显增多,mimics 组油脂滴数量明显低于阴性对照类似物组,见图 1。

7. miR-199a-3p 对 IGF/IRS-1/PI3K/AKT 信号通路的影响:高糖组 IRS-1、p-P85、p-AKT、p-GSK3 β 和 Glut-4 蛋白表达均明显高于低糖组($P < 0.05$),高糖 + 抗 miR-199a-3p 组与高糖组上述指标比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。

8. miR-199a-3p 对 STAT3、SIRT-1、PPAR- γ 及

AMPK/mTOR 信号通路的影响:高糖组 p-STAT3、p-AMPK、p-mTOR、SIRT-1 和 PPAR- γ 蛋白表达均明显高于对照组($P < 0.05$)。高糖 + 抗 miR-199a-3p 组 p-AMPK、p-mTOR、SIRT-1 和 PPAR- γ 均明显低于高糖组($P < 0.05$),而两组 p-STAT3 比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 3。

讨 论

临床研究结果显示,正常体重人群和肥胖患者的 WAT 结构和功能存在显著差异,肥胖患者白色脂肪细胞常表现为脂肪细胞肥大、异位脂肪堆积和炎症反应^[2]。白色脂肪细胞功能障碍是肥胖相关代谢并发症 IR 和 T2DM 的决定因素;同时,脂肪组织重塑、脂肪细胞分化与再生是白色脂肪细胞功能障碍的重要调控过程之一^[2]。miR-199a-3p 参与调控 T2DM 发生发展中的多个方面,包括自由脂肪酸、IL-6 等分泌^[16-17]。然而,其在脂肪细胞再生中的作用尚未阐明。

本研究证实,miR-199 的 2 个亚型(miR-199a 和 miR-199b)、4 个成熟体(miR-199a-3p、miR-199a-5p、miR-199b-3p 和 miR-199b-5p)在不同严重程度 T2DM 患者外周血中含量不同,其中 miR-199a-3p 差异表达最为明显,且其随 T2DM 严重程度增加而逐渐降低。与早期研究结果一致^[17];同时,其含量与 T2DM 患者的 BMI、腰围、FIns、FPG 及 HOMA-IR 呈显著负相关,表明 miR-199a-3p 具有调控肥胖、糖代谢和 IR 的潜在

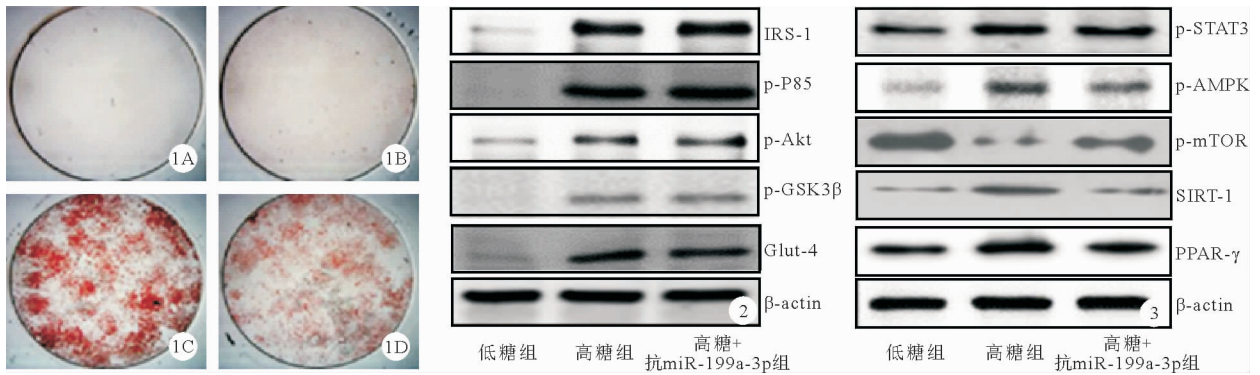


图 1 ORO 染色检测 miR-199a-3p 对 3T3-L1 脂肪细胞油脂滴形成的影响(A:对照组;B:对照组 + mimics;C:高糖组 + 阴性对照类似物;D:高糖组 + mimics) 图 2 Western blot 检测 miR-199a-3p 对 3T3-L1 细胞 IGF-1/PI3K/AKT 信号通路的影响 图 3 Western blot 检测 miR-199a-3p 对 3T3-L1 细胞 STAT3、SIRT-1、PPAR- γ 及 AMPK/mTOR 信号通路的影响

作用。其次,本研究分析了其与炎症因子和代谢因子之间的联系,发现 miR-199a-3p 与 IL-6 和 TNF- α 含量呈显著负相关,表明其对脂肪因子和炎症因子具有潜在的调节作用^[14]。因而,本研究采用高糖诱导的白色脂肪细胞炎症和脂肪再生模型,探究 miR-199a-3p 对炎症和脂肪细胞分化的影响,结果显示,高糖诱导和经典分化的 3T3-L1 白色脂肪细胞的 miR-199a-3p 显著降低,IL-6 和 TNF- α 含量均显著增加^[16-17]。同时,miR-199a-3p 上调显著抑制高糖诱导的 3T3-L1 白色脂肪细胞油脂增加,表明 miR-199a-3p 具有抑制脂肪再生的作用。IGF-1/AKT/mTOR 和 IRS-1/PI3K/AKT 是 IR 调节的重要信号通路,且文献报道 miR-199a-3p 可调节癌细胞中该通路的激活^[14,20]。本研究结果显示,miR-199a-3p 并不影响 IRS-1/PI3K/AKT 通路、糖转运体 Glut-4、IGF 和 GSK-3 β 蛋白表达,提示其与 IGF-1/GSK-3 β 依赖性促炎反应和糖转运无关。因此本研究分析 STAT3、PPAR- γ 、AMPK/mTOR 和 SIRT-1 蛋白的表达,证实 miR-199a-3p 通过影响 PPAR- γ 、SIRT-1 及调节 AMPK/mTOR 信号通路参与脂肪细胞分化,且调控 IL-6 和 TNF- α 的释放^[17,21]。

综上所述,T2DM 患者的外周血中低表达的 miR-199a-3p 与血糖、IR 和脂肪因子和炎症因子呈显著负相关,其机制可能是通过调控 AMPK/mTOR 及 SIRT-1 和 PPAR- γ 蛋白表达,影响 IL-6 和 TNF- α 炎症因子释放,参与白色脂肪炎症和脂肪细胞分化再生。

参 考 文 献

[1] Saxton SN, Clark BJ, Withers SB, et al. Mechanistic Links Between Obesity, Diabetes, and Blood Pressure: Role of Perivascular Adipose Tissue[J]. *Physiol Rev*, 2019, 99(4): 1701-1763.
 [2] Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential[J]. *Nat Med*, 2013, 19(10): 1252-1263.
 [3] Kusminski CM, Bickel PE, Scherer PE. Targeting adipose tissue in the treatment of diabetes-associated diabetes [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(9): 639-660.
 [4] Yue R, Zhou BO, Shimada IS, et al. Leptin Receptor Promotes Adipo-

genesis and Reduces Osteogenesis by Regulating Mesenchymal Stromal Cells in Adult Bone Marrow[J]. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(6): 782-796.
 [5] Kim NJ, Baek JH, Lee J, et al. A PDE1 inhibitor reduces adipogenesis in mice via regulation of lipolysis and adipogenic cell signaling[J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(1): 5-18.
 [6] Almuraikhy S, Kafienah W, Bashah M, et al. Interleukin-6 induces impairment in human subcutaneous adipogenesis in obesity-associated insulin resistance[J]. *Diabetologia*, 2016, 59(11): 2406-2416.
 [7] Arner P, Kulyte A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2015, 11(5): 276-288.
 [8] Trajkovski M, Ahmed K, Esau CC, et al. MyomiR-133 regulates brown fat differentiation through Prdm16[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(12): 1330-1335.
 [9] 林美萍, 王建军. 微小 RNA-126 和微小 RNA-155 在冠心病合并糖耐量减低患者中的表达及阿卡波糖的干预作用[J]. *临床内科杂志*, 2019, 36(2): 108-112.
 [10] Gurha P, Chen X, Lombardi R, et al. Knockdown of Plakophilin 2 Down-regulates miR-184 Through CpG Hypermethylation and Suppression of the E2F1 Pathway and Leads to Enhanced Adipogenesis In Vitro[J]. *Circ Res*, 2016, 119(6): 731-750.
 [11] Lee J E, Schmidt H, Lai B, et al. Transcriptional and Epigenomic Regulation of Adipogenesis[J]. *Mol Cell Biol*, 2019, 39(11): 343-356.
 [12] Zaiou M, El AH, Bakillah A. The clinical potential of adipogenesis and obesity-related microRNAs [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2018, 28(2): 91-111.
 [13] Engin AB. MicroRNA and Adipogenesis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 960(31): 489-509.
 [14] Wang H, Wang Z, Tang Q. Reduced expression of microRNA-199a-3p is associated with vascular endothelial cell injury induced by type 2 diabetes mellitus[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(4): 3639-3645.
 [15] Nesca V, Guay C, Jacovetti C, et al. Identification of particular groups of microRNAs that positively or negatively impact on beta cell function in obese models of type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2013, 56(10): 2203-2212.
 [16] Gu N, You L, Shi C, et al. Expression of miR-199a-3p in human adipocytes is regulated by free fatty acids and adipokines[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2): 1180-1186.
 [17] 李艳, 刘佳, 王广. 游离脂肪酸与 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗的相关性研究[J]. *临床内科杂志*, 2018, 35(9): 634-635.
 [18] Shuai Y, Yang R, Mu R, et al. MiR-199a-3p mediates the adipogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by regulating KDM6A/WNT signaling[J]. *Life Sci*, 2019, 220: 84-91.
 [19] Ahlqvist E, Storm P, Karajamaki A, et al. Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2018, 6(5): 361-369.
 [20] Jia L, Li YF, Wu GF, et al. MiRNA-199a-3p regulates C2C12 myoblast differentiation through IGF-1/AKT/mTOR signal pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 15(1): 296-308.
 [21] Lee CG, Kim YW, Kim EH, et al. Farnesoid X receptor protects hepatocytes from injury by repressing miR-199a-3p, which increases levels of LKB1[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(5): 1206-1217.

(收稿日期:2019-08-24)

(本文编辑:张一冰)