

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.07.004

miR-26b 在 ob/ob 小鼠组织中的表达研究*

范智勇, 薛 永, 赵亚萍, 徐广峰[△]

江苏省淮安市第三人民医院检验科, 江苏淮安 223001

摘要:目的 观察 miRNA-26b(miR-26b)在野生型 C57/BL6J 小鼠和瘦素基因遗传性缺陷 ob/ob 小鼠组织中的表达特征,以及瘦素对 3T3-L1 成熟脂肪细胞中 miR-26b 表达的调控。方法 取 16 周龄 C57/BL6J 小鼠和 ob/ob 小鼠的心脏、肝脏、脾、胰、肾脏、肺、小肠、骨骼肌、白色脂肪组织和棕色脂肪组织,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)技术检测小鼠各种组织中 miR-26b 表达水平;采用 100 ng/mL 的瘦素干预 3T3-L1 成熟脂肪细胞 16 h,采用 qRT-PCR 技术检测细胞中 miR-26b 表达水平。结果 ob/ob 小鼠的体质量、血糖、甘油三酯及总胆固醇水平明显高于 C57/BL6J 小鼠,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。miR-26b 在 C57/BL6J 小鼠心脏、脂肪、胰组织中表达水平较高,而在小肠、肾脏、骨骼肌组织中表达水平较低。与 C57/BL6J 小鼠比较,miR-26b 在 ob/ob 小鼠心脏、胰、白色脂肪组织中表达水平明显下降,而在肺、骨骼肌、肾脏及小肠组织中表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);在小鼠 3T3-L1 成熟脂肪细胞中,瘦素可明显下调 miR-26b 表达。结论 ob/ob 小鼠各种组织中 miR-26b 表达呈现不同的变化特征,miR-26b 是一种与机体糖脂代谢功能密切相关的 miRNA。

关键词: miR-26b; ob/ob 小鼠; 肥胖**中图分类号:** R394**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2022)07-0876-04**Expression of miR-26b in various tissue of ob/ob mice***FAN Zhiyong, XUE Yong, ZHAO Yaping, XU Guangfeng[△]

Department of Clinical Laboratory, the Third People's Hospital of Huai'an City, Huai'an, Jiangsu 223001, China

Abstract: **Objective** To observe the expression of miRNA-26b (miR-26b) in various tissue in C57/BL6J mice and ob/ob mice and the regulative roles of leptin on miR-26b in 3T3-L1 mature adipocytes. **Methods** The level of miR-26b in heart, liver, spleen, pancreas, kidney, lung, small intestine, skeletal muscle, white adipose and brown adipose tissue were determined in 16-week-old C57/BL6J mice and ob/ob mice using real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) technique. The 3T3-L1 mature adipocytes were treated with 100 ng/mL leptin for 16 hours. The level of miR-26b in adipocytes was detected by qRT-PCR. **Results** Body mass, blood glucose, triglyceride, total cholesterol in ob/ob mice were significant higher than those in C57/BL6 mice ($P < 0.05$). The heart, adipose, pancreas tissue of C57/BL6J mice displayed high miR-26b level, while the small intestine, kidney, skeletal muscle tissue had low miR-26b level. The expression levels of miR-26b decreased significantly in heart, pancreas, white adipose tissue while increased in lung, skeletal muscle, kidney, small intestine of ob/ob mice compared to C57/BL6J mice ($P < 0.05$). Leptin could dramatically down-regulated miR-26b expression in 3T3-L1 mature adipocytes. **Conclusion** The miR-26b expression in ob/ob mice exhibited features of the various tissue. miR-26b might be involved in the regulation of glucose and lipid metabolism in mice.

Key words: miR-26b; ob/ob mice; obesity

世界范围内,肥胖已经演变成为不可忽视的公共卫生问题。而近年来,microRNA(miRNA)在肥胖症的发生、发展过程中的作用受到广泛关注。研究表明,miRNA-26b(miR-26b)在肿瘤的发生、发展过程

中发挥重要作用^[1]。而既往有研究显示,miR-26b 在脂肪细胞分化过程中上调,在成熟脂肪细胞中高表达,其在脂肪细胞分化过程中发挥重要的调节作用^[2]。瘦素基因遗传性缺陷 ob/ob 小鼠是常用的研

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81600689)。

作者简介:徐广峰,男,副主任技师,主要从事肥胖症的分子机制研究。 [△] 通信作者,E-mail:123248978@qq.com。

本文引用格式:范智勇,薛永,赵亚萍,等. miR-26b 在 ob/ob 小鼠组织中的表达研究[J]. 检验医学与临床,2022,19(7):876-879.

究肥胖的动物模型,它是瘦素基因纯合突变的小鼠,特征为肥胖、多食、高血糖和胰岛素抵抗。本研究通过观察 miR-26b 在 ob/ob 小鼠心脏、肝脏、胰、脾、肺、肾脏、骨骼肌、小肠及脂肪组织中的表达变化,以及检测瘦素干预小鼠成熟脂肪细胞后 miR-26b 的表达变化,探讨 miR-26b 在肥胖发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 16 周龄野生型 C57/BL6J 小鼠 8 只、瘦素基因遗传性缺陷 ob/ob 小鼠 12 只,购自南京大学模式动物研究所。

1.2 标本采集 动物禁食 12 h 后,称体质量、测体长,以 5% 水合氯醛溶液腹腔内注射麻醉,小鼠仰卧位固定,剪去胸前区被毛,乙醇消毒皮肤后,将左手食指放于左侧第 3~4 肋间触摸到心搏处,右手持带有 4 号针头的注射器,选择心搏最强处穿刺,收集血液至离心管,室温放置离心管至有血清析出,离心(2 000 r/min,10 min)取上清液。右手抓住鼠尾用力向后拉,同时左手拇指与食指向下按住鼠头,将脊髓与脑髓拉断,脱臼处死小鼠后,乙醇消毒腹部和胸部皮肤,然后将腹腔和胸腔剪开,取心脏、肝脏、脾、胰、肾脏、肺、小肠、生殖器周围皮下白色脂肪组织、肩胛间区棕色脂肪组织、骨骼肌适量,-80 °C 冰箱保存组织用于后续的实验。

1.3 血糖、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)检测 将离心好的小鼠血清,分别采用葡萄糖氧化酶法、甘油磷酸氧化酶-过氧化物法、胆固醇氧化酶法在 TBA-2000FR 全自动生化分析仪(日本东芝)上完成血糖、TG、TC 的检测,严格按照相应试剂盒说明书操作。

1.4 细胞培养 小鼠 3T3-L1 细胞株购自上海细胞生物研究所,采用脂肪前体细胞完全培养液[DMEM+10%胎牛血清(加拿大 Wisent 公司)]在 37 °C 孵箱(5%CO₂) 中培养,每两天换液 1 次。待细胞生长至完全融合后 2 d(第 0 天)开始诱导分化,培养液换用含 0.5 mmol/L 1-甲基-3-异丁基黄嘌呤(MIX)、1 μmol/L 地塞米松和 5 mg/L 胰岛素的完全培养液(美国 Sigma 公司)。48 h 后换成只含 5 mg/L 胰岛素的完全培养液,每两天换液 1 次,至第 8 天,经油红 O(北京天根生物科技有限公司)染色法鉴定,90%以上细胞分化为成熟脂肪细胞后进行后续的干预实验。

1.5 瘦素干预 在 3T3-L1 脂肪前体细胞诱导分化为成熟脂肪细胞后,采用磷酸盐缓冲液(PBS,加拿大 Wisent 公司)清洗细胞两次,然后用含 100 ng/mL 瘦素(美国 Sigma 公司)的细胞培养液继续培养 16 h 后,在 12 孔细胞培养板的每孔中加入 700 μL Trizol 总 RNA 提取试剂(美国 invitrogen 生命技术有限公司)收集细胞,于-80 °C 低温冰箱(日本三洋)冻存备用。实验均设立对照组,瘦素干预组设 6 个平行孔。

1.6 miR-26b 表达水平检测 将含 700 μL Trizol 总

RNA 提取试剂的细胞冻存管置于室温环境下,待融化后静置 5 min。取 50 mg 左右小鼠组织进行充分匀浆,加入 700 μL Trizol 总 RNA 提取试剂,室温静置 5 min。在上述各试管中加入 140 μL 氯仿振荡 15 s,静置 5 min,4 °C 低温离心机 12 000×g 离心 15 min,取上清液,采用离心柱法抽提细胞和组织总 RNA(Qiagen 公司),操作严格按照说明书进行。采用微量分光光度计(One Drop OD 1000)对 RNA 进行定量和纯度分析,要求 A₂₆₀/A₂₈₀ 值为 1.8~2.0。采用 miRNA 反转录试剂盒(ABI 公司,15 μL 体系)将总 RNA 反转录成 cDNA,严格按照说明书进行操作。采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)技术检测 miR-26b 水平,选择 snRU6 为内参照。miR-26b 和 snRU6 内参基因 Taqman 探针均购自美国 Life Technology 公司。应用 2^{-ΔCT} 方法计算目的基因的相对表达水平。

1.7 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计分析。呈正态分布、方差齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ob/ob 小鼠及 C57/BL6J 小鼠糖脂代谢情况比较 ob/ob 小鼠的体质量、血糖、TG 及 TC 水平明显高于 C57/BL6J 小鼠,差异均有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 1。

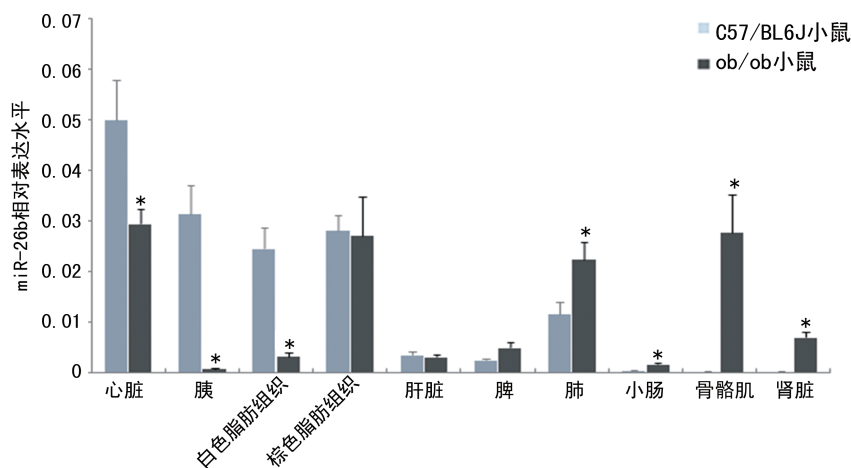
表 1 C57/BL6J 小鼠及 ob/ob 小鼠糖脂代谢情况比较($\bar{x} \pm s$)

小鼠类型	<i>n</i>	体质量 (g)	血糖 (mmol/L)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)
ob/ob	12	65.77±1.12	17.51±0.69	2.37±0.10	9.77±0.37
C57/BL6J	8	30.50±1.02*	7.16±0.22*	1.50±0.06*	3.19±0.13*

注:与 ob/ob 小鼠比较,**P* < 0.05。

2.2 C57/BL6J 小鼠 miR-26b 表达的组织学特征 采用 qRT-PCR 技术检测 C57/BL6J 小鼠心脏、肝脏、胰、脾、肺、肾脏、骨骼肌、小肠及脂肪组织中 miR-26b 表达,发现 miR-26b 在 C57/BL6J 小鼠心脏、脂肪、胰组织中表达水平较高,而在小肠、肾脏、骨骼肌组织中表达水平较低,组织间表达差异较大,表达水平最高的是心脏组织(0.049±0.008),最低的为肾脏组织(0.000 21±0.000 05),两者相差 200 余倍,见图 1。

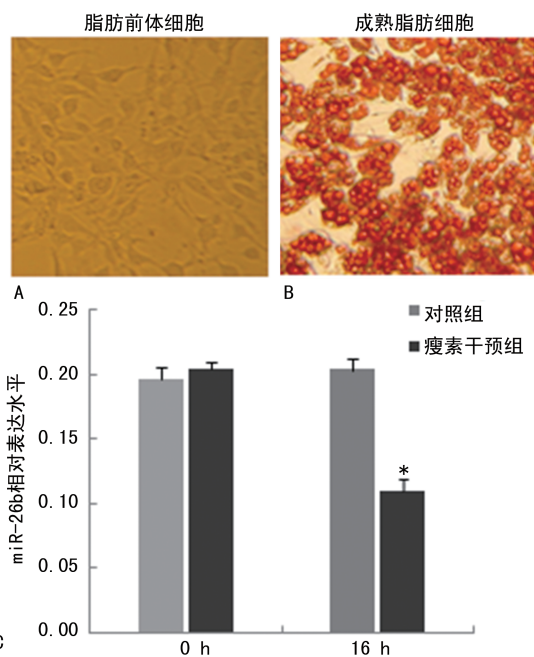
2.3 ob/ob 小鼠及 C57/BL6J 小鼠 miR-26b 表达的比较 ob/ob 小鼠各种组织中 miR-26b 的表达见图 1。与 C57/BL6J 小鼠比较,miR-26b 在 ob/ob 小鼠心脏、胰、白色脂肪组织中表达水平明显下降(*P* < 0.05),在肺、骨骼肌、肾脏及小肠组织中表达水平明显升高(*P* < 0.05);而两种小鼠 miR-26b 在肝脏、脾、棕色脂肪组织中表达水平差异无统计学意义(*P* > 0.05)。



注:与 C57/BL6J 小鼠比较, * $P < 0.05$ 。

图 1 C57/BL6 与 ob/ob 小鼠 miR-26b 的表达情况

2.4 瘦素对小鼠成熟脂肪细胞 miR-26b 表达的影响 将 3T3-L1 脂肪前体细胞(图 2A)诱导分化为成熟脂肪细胞(图 2B), 100 ng/mL 瘦素干预 16 h 后, 采用 qRT-PCR 技术检测脂肪细胞中 miR-26b 表达水平, 结果发现瘦素可明显下调脂肪细胞 miR-26b 表达水平(图 2C)。



注: A 为脂肪前体细胞油红 O 染色图; B 为成熟脂肪细胞油红 O 染色图; C 为瘦素干预小鼠成熟脂肪细胞 0 h 及 16 h 后 miR-26b 表达水平; 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 瘦素对小鼠成熟脂肪细胞 miR-26b 表达的影响

3 讨 论

肥胖已逐渐演变成全球性的公共卫生问题, 世界卫生组织的数据显示, 1975 年以来, 世界肥胖人数已增长近 3 倍, 截至 2016 年, 18 岁及以上的成年人中逾 19 亿人超重, 其中超过 6.5 亿人肥胖, 超过 3.4 亿例 5~19 岁的儿童和青少年超重或肥胖; 截至 2019 年, 3 800 万例 5 岁以下儿童及婴幼儿超重或肥胖^[3]。而

我国的情况更加严重, 2015 年《中国居民营养与慢性病状况报告》显示, 截至 2012 年我国 18 岁及以上成人超重率为 30.1%, 肥胖率为 11.9%, 6~17 岁儿童和青少年超重率为 9.6%, 肥胖率为 6.4%。最近的一项研究表明, 我国 18 岁以上的居民中, 有 29.1% (2.778 亿) 为中心性肥胖(腹部肥胖), 其中男性约为 1.40 亿, 女性约为 1.38 亿, 而腹部肥胖与代谢综合征密切相关^[4]。肥胖是遗传、环境和生活方式相互作用的结果, 肥胖无论采用保守疗法还是外科手术治疗效果均不理想, 这可能与肥胖相关的代谢紊乱有关。因此, 阐明肥胖的发生机制, 寻找有效的肥胖防治方法已迫在眉睫。

miRNA 是真核生物体内一类长度约为 22 个核苷酸(nt)的内源性非编码单链小 RNA, 其主要通过作用于靶基因的 3'非翻译区(3'-UTR)转录后水平调控基因的表达^[5], miRNA 几乎参与调节一切生命活动和大多数疾病过程^[6]。近年来 miRNA 在肥胖及其相关并发症发病过程中的作用受到广泛关注。多项研究表明, 脂肪组织分泌的外泌体 miRNA 可能在肥胖导致的脂肪肝方面发挥作用, 另外, 肥胖可导致脂肪因子和肥胖相关的 miRNA 失调, 而脂肪因子和 miRNA 的相互调节作用在肥胖及其相关疾病的发生、发展过程中亦发挥调控作用^[7-8]。早期研究表明肥胖与胰岛素抵抗、2 型糖尿病密切相关, 但有研究也提示肥胖与 I 型糖尿病关系十分密切^[9]。miRNA 的表达往往呈现明显的组织特异性, 并可影响其在特定组织中的调节功能。本研究结果表明 miR-26b 在 C57/BL6J 小鼠心脏、脂肪、胰等组织中表达水平较高。SONG 等^[10]发现 miR-26b 随着脂肪前体细胞的诱导分化, 表达水平逐渐升高, 而在脂肪前体细胞中敲低 miR-26b 可明显抑制其分化为成熟脂肪细胞。XU 等^[11]发现 miR-26b 过表达对人成熟脂肪细胞胰岛素敏感性具有促进作用。有研究报道, miR-26b 通过靶向作用于 PTEN 基因促进 3T3-L1 脂肪细胞的

分化^[12]。由此可见,miR-26b 可能是一条与机体代谢功能密切相关的 miRNA。

ob/ob 小鼠由于瘦素基因突变致其表达产物瘦素活性丧失,发生自发性肥胖,其发病过程与人类肥胖相似,因此成为研究人类肥胖最常用的动物模型之一。本研究中,16 周龄的 ob/ob 小鼠体质量为野生型 C57/BL6J 小鼠的 2 倍多,并出现高血糖、高血脂,呈现明显的肥胖表型并伴有代谢紊乱。与 C57/BL6J 小鼠比较,ob/ob 小鼠心脏、胰、白色脂肪组织中 miR-26b 表达水平明显下降($P < 0.05$),肺、骨骼肌、肾脏及小肠组织中 miR-26b 表达水平明显升高($P < 0.05$),而在肝脏、脾、棕色脂肪组织中的表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。ob/ob 小鼠 miR-26b 表达变化呈现不同的组织学特征,提示肥胖机体 miR-26b 表达调控机制复杂,其在不同组织中发挥的生物学作用是否存在差异尚待进一步探讨。

3T3-L1 细胞在体外诱导后能特异性地分化为成熟脂肪细胞,被广泛应用于脂肪细胞特性和功能的研究。鉴于 ob/ob 小鼠瘦素功能缺失,而 3T3-L1 脂肪细胞中 miR-26b 的表达调控研究鲜有报道,本研究采用瘦素干预 3T3-L1 成熟脂肪细胞,观察 miR-26b 表达的变化,结果发现瘦素可明显下调 miR-26b 表达水平,提示瘦素功能缺失并非 ob/ob 小鼠白色脂肪组织中 miR-26b 表达下调的直接原因。研究表明,炎症因子、激素、游离脂肪酸等对人脂肪细胞中的 miR-26b 表达均具有调控作用,肿瘤坏死因子(TNF)- α 、游离脂肪酸、地塞米松可下调人脂肪细胞中 miR-26b 表达水平,而生长激素可促进人脂肪细胞中 miR-26b 表达^[13-14]。ob/ob 小鼠脂肪代谢严重失调,同时伴有慢性炎症,血清游离脂肪酸及 TNF- α 等炎症因子水平明显升高^[15],这些因子可能与其白色脂肪组织、心脏、胰中 miR-26b 表达水平下降有关。

miRNA 生物学作用大,表达调控复杂。进一步分析本研究结果发现,miR-26b 在 C57/BL6J 小鼠骨骼肌中表达水平极低,为白色脂肪组织的 1/10,但在 ob/ob 小鼠骨骼肌中表达水平升高极为明显,为白色脂肪组织的 8 倍之多。骨骼肌、脂肪组织同为胰岛素作用的靶器官,但 miR-26b 的表达变化模式却截然相反,其原因尚不清楚。白色脂肪组织是 TG 的贮存场所,miR-26b 在白色脂肪组织中发挥促进葡萄糖摄取、TG 合成的作用,其在骨骼肌中的作用有待进一步阐明。

参考文献

[1] 吴唐维,胡绘,李晓怡,等.非小细胞肺癌患者血浆中

miR-26b 的表达及其临床意义[J].国际检验医学杂志,2018,39(16):1968-1971.

- [2] SCHEIDELER M. microRNAs in adipocyte formation and obesity[J]. Best Pract Res Cl En, 2016, 30(5): 653-664.
- [3] World Health Organization. Obesity and overweight[EB/OL]. (2021-07-14) [2021-07-26] <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
- [4] ZHANG L, WANG Z, WANG X, et al. Prevalence of abdominal obesity in china: results from a cross-sectional study of nearly half a million participants[J]. Obesity, 2019, 27(11): 1898-1905.
- [5] BARTEL D P. micrornas: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [6] LEWIS B P, BURGE C B, BARTEL D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets [J]. Cell, 2005, 120(1): 15-20.
- [7] GHASEMI A, HASHEMY S I, AZIMI-NEZHAD M, et al. The cross-talk between adipokines and miRNAs in health and obesity-mediated diseases[J]. Clin Chim Acta, 2019, 499: 41-53.
- [8] 章建伟,吴若雅,潘海滔.青少年肥胖非酒精性脂肪肝患者血清外泌体源性 miRNA 表达谱的初步研究[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(1): 87-90.
- [9] POLSKY S, ELLIS S L. Obesity, insulin resistance, and type 1 diabetes mellitus[J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2015, 22(4): 277-282.
- [10] SONG G, XU G, JI C, et al. The role of microRNA-26b in human adipocyte differentiation and proliferation [J]. Gene, 2014, 533(2): 481-487.
- [11] XU G, JI C, SONG G, et al. miR-26b modulates insulin sensitivity in adipocytes by interrupting the PTEN/PI3K/AKT pathway[J]. Int J Obesity, 2015, 39(10): 1523-1530.
- [12] LI G L, NING C Y, MA Y, et al. miR-26b promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through targeting PTEN[J]. DNA Cell Biol, 2017, 36(8): 672-681.
- [13] XU G, JI C, SHI C, et al. Modulation of hsa-miR-26b levels following adipokine stimulation [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(5): 3577-3582.
- [14] XU G, SHI C, JI C, et al. Expression of microRNA-26b, an obesity-related microRNA, is regulated by free fatty acids, glucose, dexamethasone and growth hormone in human adipocytes[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(1): 223-228.
- [15] 夏莉,王长江,代芳,等.不同干预方法对肥胖大鼠血清 FFA、TNF- α 的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(3): 231-234.

(收稿日期:2021-09-06 修回日期:2021-12-28)