

Lnc-RAP3 对小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响

李欢¹, 冯晋川², 李贵林¹, 王讯¹, 李明洲¹, 刘海峰¹

1. 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, 成都 611130

2. 四川农业大学动物科技学院, 成都 611130

摘要: 长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类长度大于 200nt、没有长开放阅读框架但往往具有 mRNA 结构特征的 RNA, 可以在转录及转录后水平参与基因的表达调控。近年来, 有研究证实 lncRNA 对脂肪生成具有重要作用。*Lnc-RAP3* 位于小鼠 (*Mus musculus*) 17 号染色体, 其表达量在小鼠脂肪细胞分化前后呈现显著差异, 但其具体的生物学功能尚不清楚。为探讨 *lnc-RAP3* 在小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞成脂分化中的作用, 本文首先构建了 *lnc-RAP3* 的真核表达载体 pcDNA3.1-RAP3, 利用脂质体将 pcDNA3.1-RAP3 和人工合成的 *lnc-RAP3* 的 siRNAs 分别转染 3T3-L1 前脂肪细胞, 并对转染后的细胞进行诱导分化, 并通过油红 O 染色、qRT-PCR 检测成脂分化相关基因表达等方法比较过表达和敲降 *lnc-RAP3* 对 3T3-L1 前脂肪细胞成脂分化的影响。结果显示, 过表达 *lnc-RAP3* 后, 细胞内脂滴聚集显著减少 ($P < 0.05$), 在诱导分化第 0 d、2 d 和 4 d 时 *C/EBPα*、*Glut4*、*PPARγ*、*LPL* 和 *FAS* 的表达水平均呈显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 下降; 敲降 *lnc-RAP3* 后, 细胞内脂滴聚集显著增多 ($P < 0.05$), 同时在诱导分化第 0 d、2 d 时 *PPARγ*、*LPL*、*C/EBPα*、*FAS* 和 *Glut4* 的表达水平呈显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 升高。本研究结果表明, *lnc-RAP3* 可能通过影响成脂分化相关基因的表达来抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的成脂分化。

关键词: *lnc-RAP3*; 3T3-L1 前脂肪细胞; 成脂分化

The effect of *lnc-RAP3* on 3T3-L1 preadipocyte differentiation in mouse

Huan Li¹, Jinchuan Feng², Guilin Li¹, Xun Wang¹, Mingzhou Li¹, Haifeng Liu¹

1. Farm Animal Genetic Resources Exploration and Innovation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

2. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: The long non-coding RNAs (lncRNAs) are a type of RNAs with more than 200nt in length and without any long open reading frame, but often have mRNA structural features. They can regulate the expression of target genes in

收稿日期: 2018-03-01; 修回日期: 2018-05-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31522055 和 31772576)和四川省青年科技创新研究团队项目(编号: 2015TD0012)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31522055, 31772576) and the Program for Innovative Research Team of Sichuan Province (No. 2015TD0012)]

作者简介: 李欢, 硕士研究生, 专业方向: 分子遗传与动物育种。E-mail: lihuan0461@163.com

通讯作者: 刘海峰, 博士, 副教授, 研究方向: 猪遗传育种。E-mail: liuhf@sicau.edu.cn

DOI: 10.16288/j.yczz.18-053

网络出版时间: 2018/8/1 14:18:52

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20180801.1418.002.html>

different manners at the transcriptional and post-transcriptional levels. In recent years, various studies demonstrated that lncRNAs play crucial roles in adipogenesis. The long non-coding RNA, *lnc-RAP3*, located on the mouse chromosome 17, possesses a significantly differential expression pattern during mouse adipocyte differentiation; but its specific biological function(s) remains unclear. To investigate the effect of *lnc-RAP3* on adipogenesis in the mouse 3T3-L1 preadipocytes, we first constructed a eukaryotic expression vector pcDNA3.1-RAP3. pcDNA3.1-RAP3 and synthetic RAP3-siRNAs were transfected individually into 3T3-L1 preadipocytes by LipofectamineTM 2000, thereby over-expressing and knocking-down *lnc-RAP3* expression, respectively. The transfected preadipocytes were induced to undergo adipogenic differentiation. Oil Red O staining and qRT-PCR were used to detect the effects of *lnc-RAP3* overexpression/knockdown on 3T3-L1 preadipocyte differentiation. The results showed that overexpression of *lnc-RAP3* led to a notable decrease in lipid accumulation ($P<0.05$) and remarkably reduced the mRNA expression levels of *C/EBPα*, *Glut4*, *PPARγ*, *LPL* and *FAS* on day 0, day 2, and day 4 post differentiation ($P<0.05$, $P<0.01$). In contrast, quantitative analysis of Oil Red O on day 4 of differentiation revealed that inhibition of *lnc-RAP3* increased the formation of neutral lipid droplets ($P<0.05$). In addition, silencing *lnc-RAP3* also significantly increased the mRNA expression of *PPARγ*, *LPL*, *C/EBPα*, *FAS* and *Glut4* on day 0 and day 2 post differentiation ($P<0.05$, $P<0.01$). Our study suggests that *lnc-RAP3* might suppress 3T3-L1 preadipocyte differentiation by affecting the expression of the genes involved in adipogenic differentiation.

Keywords: *lnc-RAP3*; 3T3-L1 preadipocytes; adipogenic differentiation

随着人们生活水平的不断提高,肥胖及相关代谢性疾病的发生已经成为危害人类健康的重要因素之一。研究表明,脂肪细胞内甘油三酯含量聚集过多可能会引发肥胖,从而增加胰岛素抵抗、2型糖尿病、心血管疾病、高血压、癌症等许多疾病的患病风险^[1~4]。脂肪细胞的形成和成熟需要大量基因的时序表达,经过不同的发育阶段,涉及多种生物学进程。同时,脂肪组织通过自分泌、旁分泌及内分泌方式分泌大量的脂肪因子影响整个机体的一系列生物学活动。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是在真核生物中发现的一类长度大于 200nt、没有长开放阅读框架但往往具有 mRNA 结构特征(甲基鸟苷帽子和多聚腺苷酸尾)的 RNA^[5], 广泛参与生物体的各种生理及病理过程,如细胞周期调控^[6]、肿瘤发生及转移^[7]、神经系统发育^[8]等。研究发现, lncRNA 可以通过多种方式在表观遗传、转录及转录后水平参与基因的表达调控。如 lncRNA TARID 可定位于肿瘤抑制因子 *TCF21* 启动子区,并招募 GADD45A 结合到该区域,促使 DNA 去甲基化,从

而激活靶基因的表达^[9];Tsai 等^[10]研究发现, lncRNA CRG 通过募集 RNA 聚合酶 II 到 *CASK* 上游启动子区域,从而调节 *CASK* 基因的表达;在转录后水平调控研究中, Beltran 等^[11]发现 *Zeb2* 的反义 lncRNA 能够与其 mRNA 5'端内含子剪切位点所在区域形成互补双链,阻止该内含子剪切,从而保证 *Zeb2* 的正常表达。此外,也有部分研究表明 lncRNA 密切参与脂肪细胞分化过程的调节^[12~15]。

Lnc-RAP3 位于小鼠(*Mus musculus*)17号染色体,但到目前为止,关于 *lnc-RAP3* 生物学功能的研究鲜有报道,仅有 Sun 等^[16]通过 siRNA 敲降实验对 *lnc-RAP3* 在小鼠皮下前脂肪细胞内脂滴聚集情况进行了研究。本课题组在前期实验中对诱导前后的 3T3-L1 前脂肪细胞进行转录组测序,发现 *lnc-RAP3* 在 3T3-L1 细胞诱导分化后呈现高丰度表达。为了进一步探究该 lncRNA 在小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞成脂分化过程中的作用,本研究采用过表达和敲降 *lnc-RAP3* 的方式首次揭示了其对 3T3-L1 前脂肪细胞内脂滴聚集、成脂分化相关基因表达等的影响,为进一步研究 *lnc-RAP3* 在小鼠脂肪细胞分化中的功能机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞(购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库)采用含 10%胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS) (Gibco, 美国)和双抗(青霉素 100 U/mL、链霉素 0.1 mg/mL) (北京索莱宝科技有限公司)的 DMEM 高糖培养基(Gibco, 美国)培养, 培养条件为 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的无菌培养箱(Thermo, 美国)。

1.2 重组 pcDNA3.1-RAP3 真核表达载体的构建

根据 GenBank 中 *lnc-RAP3* 序列(登录号 NR_045146.1)设计引物, 并在上下游引物 5'端分别引入 *Hind* III 和 *Kpn* I (TaKaRa, 日本)限制性酶切位点(表 1), 通过 PCR 扩增 *lnc-RAP3* 目的片段并进行胶回收, 用于 TA 克隆。将获得的 *lnc-RAP3* 目的片段与 pMD19-T 载体相连, 连接产物转化入 DH5 α 感受态细胞并涂板, 挑取阳性单克隆进行 PCR 鉴定、测序(成都擎科梓熙生物技术有限公司)。将测序正确的对应菌体放大培养后用快速质粒小提试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取质粒 pMD19-T-RAP3。用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Kpn* I 将 pMD19-T-RAP3 与真核表达载体 pcDNA3.1 分别进行酶切, 酶切产物经凝胶电泳检测后回收目的片段, 用 T4 连接酶过夜连接后进行转化涂板并挑选阳性克隆进行测序, 将测序正确的菌体放大培养, 用无内毒素质粒大提试剂盒提取重组质粒 pcDNA3.1-RAP3。

1.3 细胞转染与分化

选用生长状态良好的 3T3-L1 细胞接种于 12 孔细胞培养板(Corning, 美国), 当细胞汇合度达 70% 时, 将 RAP3-Smart Silencer(产品编号 lnc3160612-112429, 以下统一用 si-RAP3 表示, 广州锐博生物科技有限公司)、si-NC(产品编号 siN05815122147, 广州锐博生物科技有限公司)以及 pcDNA3.1(湖南优宝生物)和构建的 pcDNA3.1-RAP3 用 LipofectamineTM 2000 转染试剂(Thermo, 美国)转染到 3T3-L1 细胞中, 转染方法按说明书操作。转染 2 d 后(此时

记为诱导分化第 0 d), 将培养液换成含 5 μ g/mL 胰岛素、0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)和 1 μ mol/L 地塞米松(Sigma, 美国)的 DMEM 高糖培养基进行诱导分化, 诱导分化 2 d 后将培养液换成含 5 μ g/mL 胰岛素的培养基继续培养至分化第 4 d。每一处理组均设置 3 个重复。

1.4 油红 O 染色

将转染后的各组细胞于诱导分化的第 4 d 取出, 经油红 O 染色后置于倒置显微镜下观察、拍照; 用异丙醇萃取脂滴中的油红 O, 用酶标仪(Promega, 美国)测定 OD_{510 nm} 值。

1.5 实时荧光定量 PCR

当 3T3-L1 细胞汇合度达 70% 时进行转染与诱导分化, 方法同上。对不同处理的 3T3-L1 细胞分别于诱导分化第 0 d、2 d、4 d 采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA(重复 3 次, 并等量混合构建 RNA pool), 用 PrimeScriptTM 反转录试剂盒(TaKaRa, 日本)进行 cDNA 合成, 采用 SYBR Green 法定量检测各组中 *lnc-RAP3* 及成脂分化标志基因 *PPAR γ* 、*C/EBP α* 、*Glut4*、*FAS*、*LPL* 的表达水平, 以 *ACTB* (β -actin)为内参, 相关基因引物信息见表 1。

1.6 统计分析

采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算基因的相对表达量, 对 si-NC 与 si-RAP3、pcDNA3.1 与 pcDNA3.1-RAP3 两两处理间的差异显著性分析采用 *t* 检验, 对同一基因相同处理不同时间点间的多重比较采用 DUNCAN 法, 结果以均值 \pm SD 表示, 由 GraphPad Prism 6.0 统计软件完成并作图。

2 结果与分析

2.1 重组 pcDNA3.1-RAP3 真核表达载体构建结果

lnc-RAP3 基因 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带在 700~900 bp 之间, 与预期产物(833 bp)相符(图 1A)。对 TA 克隆所筛选的阳性克隆

表 1 本文所用的引物信息
Table 1 Primers used in this study

基因	GenBank 登录号	引物序列(5'→3')	引物用途
<i>lnc-RAP3</i>	NR_045146.1	F: CCC <u>AAGCTT</u> TTCACCCTAGGAGGGTAAGG	基因克隆
		R: CGGGGTACCGGGGAACCTTTATTCAGGGA	
<i>lnc-RAP3</i>	NR_045146.1	F: ACACGAACACACGCATACAA	qRT-PCR
		R: TCATAACGACAGTGGTGCAG	
<i>PPARγ</i>	NM_011146.3	F: AAGAGCTGACCCAATGGTTG	qRT-PCR
		R: ACCCTTGCACTCCTTACAAG	
<i>C/EBPα</i>	NM_001287523.1	F: GGT ^{TT} TGCTCTGATTCTTGCC	qRT-PCR
		R: CGAAAAAACCCAAACATCCC	
<i>Glut4</i>	AB008453.1	F: CAGATCGGCTCTGACGATGG	qRT-PCR
		R: TCAATCACCTTCTGTGGGGC	
<i>FAS</i>	NM_007988.3	F: GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT	qRT-PCR
		R: TGGGTAATCCATAGAGCCCAG	
<i>LPL</i>	NM_008509.2	F: AGGACCCCTGAAGACACAGCT	qRT-PCR
		R: TGTACAGGGCGGCCACAAGT	
<i>ACTB</i>	NM_007393.5	F: CAGCCTTCCTTCTTGGGTAT	qRT-PCR
		R: TGGCATAGAGGTCTTTACGG	

下划线部分分别为限制性内切酶 *Hind* III 和 *Kpn* I 位点。

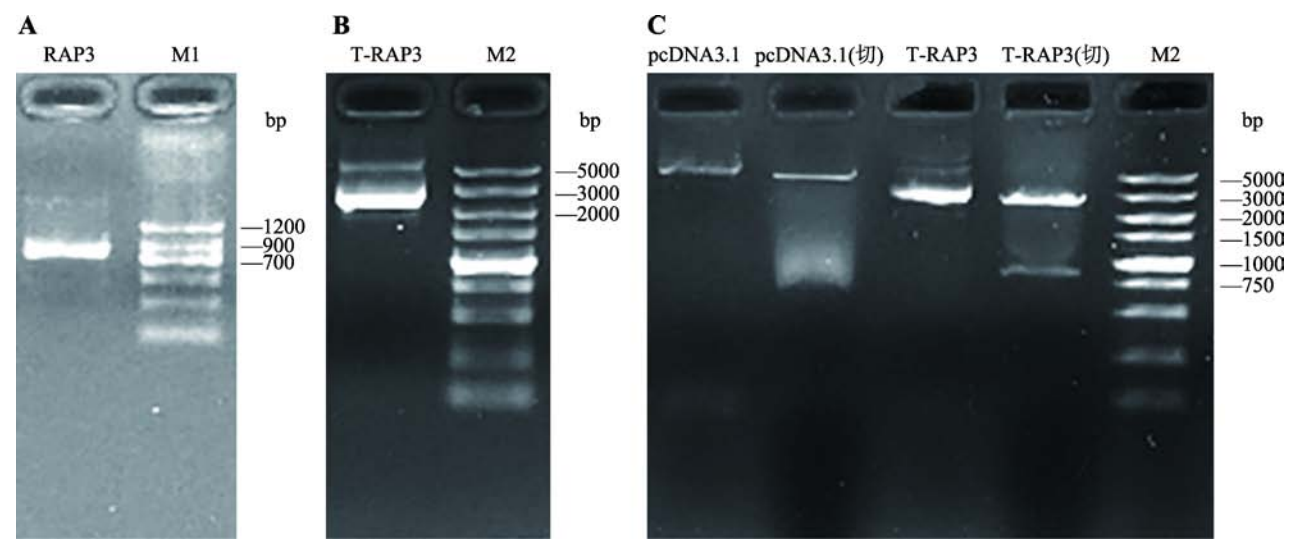


图 1 重组 pcDNA3.1-RAP3 真核表达载体的构建
Fig. 1 Construction of recombinant eukaryotic expression vector pcDNA3.1-RAP3
A : *lnc-RAP3* 基因 PCR 产物电泳结果 ; B : 质粒 pMD19-T-RAP3 电泳结果 ; C : 双酶切鉴定结果。M1/M2 : DL1200/5000 DNA marker ; T-RAP3 : pMD19-T-RAP3 ; 限制性内切酶为 *Hind* III 和 *Kpn* I 。

进行测序，测序结果与理论预期完全一致，进一步说明 PCR 扩增条带为目的条带。对测序正确的菌体放大培养后提取质粒 pMD19-T-RAP3，经电泳检测出现两个条带(图 1B)。其中，较亮的条带为超螺旋

结构，较暗的一条为疏松结构，均为正确质粒条带。将质粒 pMD19-T-RAP3 与 pcDNA3.1 分别用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Kpn* I 进行双酶切，经电泳检测片段大小与预期相符(图 1C)。将酶切后的 *lnc-RAP3* 片

段与同样经过酶切处理的 pcDNA3.1 载体纯化回收,并用 T4 连接酶连接转化入 DH5 α 感受态细胞,挑取阳性单克隆放大培养并测序,用无内毒素质粒大提试剂盒提取重组质粒 pcDNA3.1-RAP3。测序结果与 NCBI 数据库中 *lnc-RAP3* 基因序列比对相符,说明重组 pcDNA3.1-RAP3 真核表达载体构建成功。

2.2 细胞转染效率测定

采用 si-RAP3 转染细胞对 *lnc-RAP3* 进行敲降处理,与转染 si-NC 组相比,*lnc-RAP3* 的相对表达量在诱导分化第 0 d、2 d 和 4 d 分别下降了 52.5%、50.3% 和 18.4%,其中第 0 d 和 2 d 细胞内 *lnc-RAP3* 的表达量在两处理间存在极显著差异($P<0.01$),而第 4 d 存在显著差异($P<0.05$) (图 2A)。通过向细胞内转染 pcDNA3.1-RAP3 过表达 *lnc-RAP3*,与转染 pcDNA3.1 的对照组相比,*lnc-RAP3* 的相对表达量在诱导分化第 0 d、2 d 和 4 d 分别是对照组的 5.4、2.6 和 2.1 倍,在 3 个不同时间点两处理间细胞内 *lnc-RAP3* 的表达量均存在极显著差异($P<0.01$) (图 2B)。此外,每种处理在诱导分化第 2 d 时细胞内 *lnc-RAP3* 的相对表达量均出现极显著上升,说明在 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化过程中 *lnc-RAP3* 的表达量会随之而增加。

2.3 油红 O 染色结果

对 4 种不同处理的细胞培养至诱导分化第 4 d 时进行油红 O 染色。结果显示,si-NC 组与 pcDNA3.1 组的脂滴大小和数目比较相似,且它们在 510 nm 处的吸光度值分别为 0.263 ± 0.033 和 0.268 ± 0.029 ,差

异不显著;与 si-NC 组相比,抑制 *lnc-RAP3* 表达的 si-RAP3 组细胞内脂滴大小与数目显著增加,吸光度值也显著升高($OD_{510\text{ nm}}=0.323$) ($P<0.05$) (图 3A);相反,与空载 pcDNA3.1 组相比,过表达 *lnc-RAP3* 的 pcDNA3.1-RAP3 组细胞内脂滴大小与数目显著减少,吸光度值也显著下降($OD_{510\text{ nm}}=0.213$) ($P<0.05$) (图 3B),说明 *lnc-RAP3* 参与 3T3-L1 前脂肪细胞的分化成熟,并抑制细胞内脂滴的集聚。

2.4 脂肪分化相关标志基因的表达变化

脂肪分化相关基因 *C/EBP α* 、*PPAR γ* 、*FAS*、*LPL* 和 *Glut4* 的相对表达量均以 si-NC 组诱导分化第 0 d 的对应表达量为对照(设为 1),并对 si-NC 与 si-RAP3、pcDNA3.1 与 pcDNA3.1-RAP3 两两处理间各基因相对表达量进行差异显著性分析(图 4),以及对每一基因每一处理在诱导分化第 0 d、2 d、4 d 等 3 个不同时间点间的相对表达量进行多重比较(表 2)。从整体趋势看 *PPAR γ* 、*C/EBP α* 、*FAS*、*LPL* 和 *Glut4* 等 5 个与成脂分化相关的基因在诱导分化第 2 d 的相对表达量均较诱导分化前(第 0 d)有显著或极显著的增加,但过表达 *lnc-RAP3* 后 *FAS* 出现极显著下降($P<0.01$),*PPAR γ* 出现显著下降($P<0.05$)。在抑制 *lnc-RAP3* 表达的 si-RAP3 组中各基因的相对表达量均较 si-NC 组有一定程度升高(*C/EBP α* 和 *FAS* 第 4 d 除外),在诱导分化第 0 d 时两组各基因相对表达量间均存在显著或极显著差异,但到诱导分化第 2 d 时 *C/EBP α* 和 *FAS* 两基因已无显著性差异,到诱导分化第 4 d 时除 *LPL* 还存在显著差异外,其他 4 个基因在两组

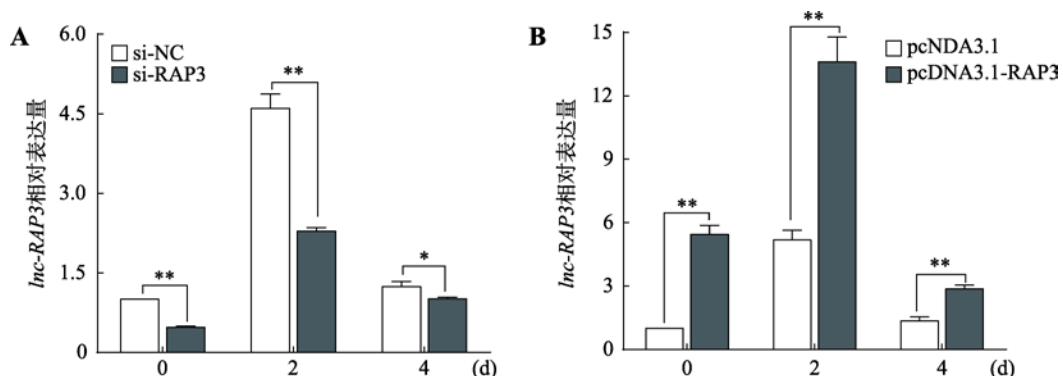


图 2 转染细胞中 *lnc-RAP3* 的表达量

Fig. 2 The expression level of *lnc-RAP3* in transfected cells

A: 抑制 *lnc-RAP3* 的表达量; B: 过表达 *lnc-RAP3* 的表达量。*表示 $P<0.05$, 差异显著; **表示 $P<0.01$, 差异极显著。

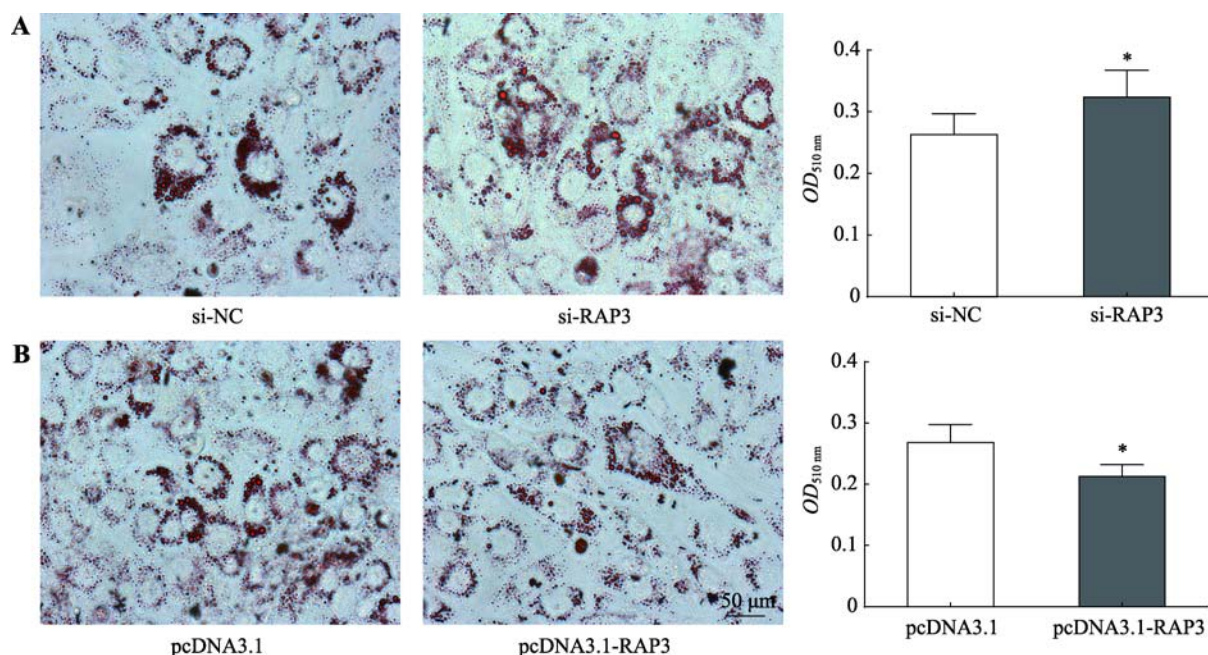


图 3 油红 O 染色及吸光度测定结果

Fig. 3 Results of Oil Red O staining and absorbance measure

A: 抑制 *lnc-RAP3* 后经油红 O 染色($\times 400$)及定量结果; B: 过表达 *lnc-RAP3* 后经油红 O 染色($\times 400$)及定量结果。*表示 $P < 0.05$, 差异显著。

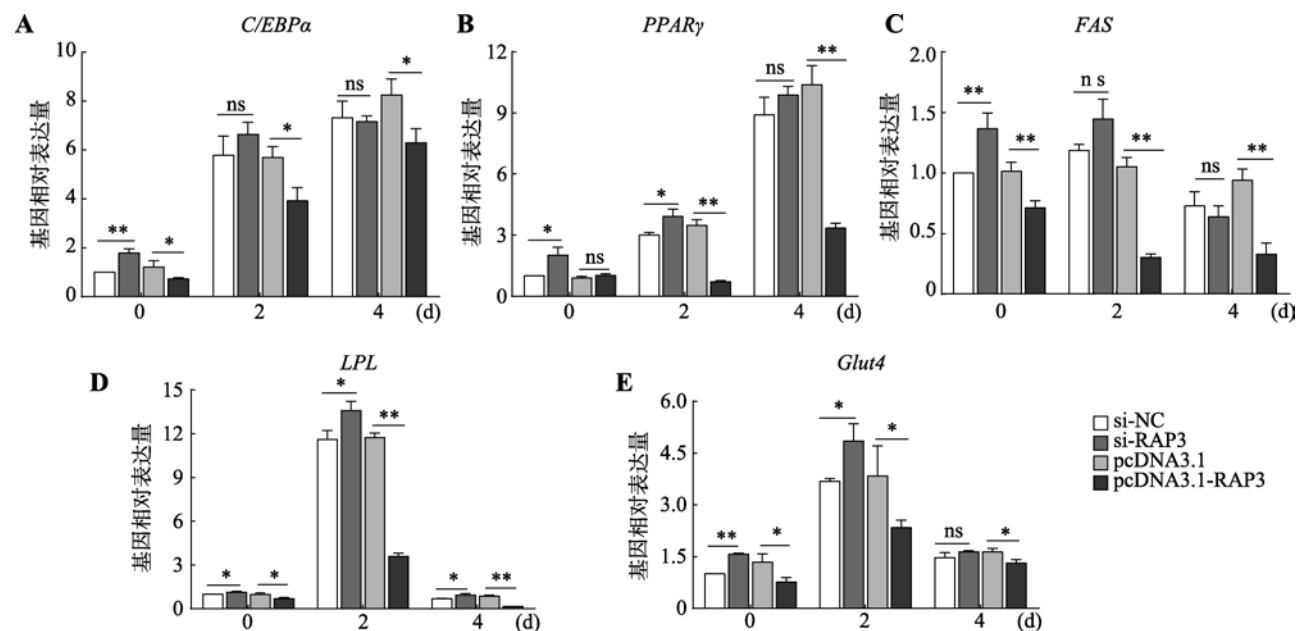


图 4 转染细胞中脂肪分化相关基因的表达

Fig. 4 The expression of adipose differentiation genes in transfected cells

A~E: 敲降/过表达 *lnc-RAP3* 后 *C/EBP α* 、*PPAR γ* 、*FAS*、*LPL*、*Glut4* 的表达水平。*表示 $P < 0.05$, 差异显著; **表示 $P < 0.01$, 差异极显著; ns 表示 $P > 0.05$, 差异不显著。

间的相对表达量均无显著性差异。在过表达 *lnc-RAP3* 的 pcDNA3.1-RAP3 组中, 除 *PPAR γ* 基因的相

对表达量在诱导分化第 0 d 略有升高但差异不显著外, 其他各基因的相对表达量在 3 个不同时间点均

表 2 成脂分化相关标志基因 mRNA 相对表达量的均值及多重比较

Table 2 Mean and multiple comparisons of relative expression levels of mRNAs of biomarkers associated with adipogenic differentiation

基因	分化时间	si-NC	si-RAP3	pcDNA3.1	pcDNA3.1-RAP3
<i>PPARγ</i>	0 d	1.00±0.00 ^C	2.01±0.39 ^C	0.90±0.07 ^C	1.02±0.08 ^{Ba}
	2 d	3.01±0.13 ^B	3.93±0.35 ^B	3.48±0.28 ^B	0.70±0.07 ^{Bb}
	4 d	8.90±0.86 ^A	9.88±0.44 ^A	10.39±0.93 ^A	3.35±0.25 ^A
<i>C/EBPα</i>	0 d	1.00±0.00 ^B	1.79±0.16 ^B	1.21±0.25 ^C	0.73±0.04 ^C
	2 d	5.78±0.78 ^{Ab}	6.63±0.49 ^{Aa}	5.69±0.44 ^B	3.92±0.54 ^B
	4 d	7.32±0.67 ^{Aa}	7.15±0.25 ^{Aa}	8.24±0.66 ^A	6.29±0.57 ^A
<i>FAS</i>	0 d	1.00±0.00 ^{Ab}	1.37±0.13 ^{Aa}	1.02±0.07 ^{Aa}	0.71±0.06 ^A
	2 d	1.19±0.05 ^{Aa}	1.45±0.16 ^{Aa}	1.05±0.08 ^{Aa}	0.30±0.03 ^{Ba}
	4 d	0.73±0.12 ^B	0.64±0.09 ^B	0.94±0.09 ^{Aa}	0.33±0.09 ^{Ba}
<i>LPL</i>	0 d	1.00±0.00 ^{Ba}	1.12±0.06 ^{Ba}	0.97±0.11 ^{Ba}	0.69±0.08 ^B
	2 d	11.62±0.60 ^A	13.59±0.64 ^A	11.74±0.31 ^A	3.58±0.21 ^A
	4 d	0.69±0.03 ^{Ba}	0.94±0.10 ^{Ba}	0.85±0.07 ^{Ba}	0.15±0.00 ^C
<i>Glut4</i>	0 d	1.00±0.00 ^C	1.57±0.03 ^{Ba}	1.34±0.24 ^{Ba}	0.77±0.13 ^C
	2 d	3.68±0.08 ^A	4.85±0.50 ^A	3.84±0.87 ^A	2.34±0.22 ^A
	4 d	1.47±0.15 ^B	1.64±0.03 ^{Ba}	1.63±0.10 ^{Ba}	1.31±0.10 ^B

每组基因同列数据后所标字母相同表示差异不显著($P>0.05$),字母不同表示差异显著($P<0.05$,小写字母)或极显著($P<0.01$,大写字母)。

较 pcDNA3.1 对照组显著或极显著降低,在诱导分化第 2 d 时 *PPAR γ* 、*FAS*、*LPL*、*Glut4* 和 *C/EBP α* 等基因在过表达 *lnc-RAP3* 的 pcDNA3.1-RAP3 组中的相对表达量较 pcDNA3.1 对照组分别降低了 79.8%、71%、69.5%、39.2%和 31.2%。这些结果说明 *lnc-RAP3* 能通过抑制成脂分化相关标志基因的表达而抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的成脂分化。

3 讨 论

由于人们生活方式及饮食结构的改变,肥胖现象越来越普遍,与肥胖相关的疾病发病率也急剧升高。研究表明,肥胖及相关代谢疾病的发生与脂肪细胞的分化及调控失常密切相关,深入研究脂肪细胞分化过程的作用机制,对控制和治疗肥胖及相关代谢疾病具有重要意义。

PPAR γ 和 *C/EBP α* 作为最主要的两个核心转录因子,在脂肪分化调控网络中起着不可或缺的协同作用^[17]。*FAS* 作为内源性脂肪酸合成的关键酶,在脂肪细胞分化过程中,其主要作用是促进胞内脂滴的形成和甘油三酯的积累,其表达调控主要受到

PPAR γ 的激活^[18, 19]。*LPL* 作为脂肪沉积过程中的关键酶,在脂肪细胞分化过程中主要表达于终末分化早期,随细胞内甘油三酯含量的增加而逐渐上升,其表达也受 *PPAR γ* 的调控^[20]。此外, *Glut4* 在脂肪和肌肉组织中具有较高表达,其表达主要受 *C/EBP α* 的调控^[21]。研究表明, *lncRNA* 可以靶向作用于脂肪细胞分化过程中相关通路的分子组件而影响下游转录因子的表达,或是直接作用于 *C/EBPs* 和 *PPARs* 等关键转录因子调控下游基因的表达,从而调节脂肪细胞分化。如 *linc-RAP1*, 也称 *Firre*, 能与核基质因子核糖核蛋白 U (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U, hnRNP U) 相互作用调节脂肪形成关键基因的表达^[22]; *lncRNA SRA* 对脂肪生成也具有调控作用,它能与 *PPAR γ* 结合,从而增加其转录活性,促进 3T3-L1 前脂肪细胞的分化^[23, 24]。Xiao 等^[25]通过功能缺失实验发现敲降 *lncRNA ADINR* 导致人间充质干细胞内脂滴形成显著减少,成脂分化相关标志基因 *C/EBP α* 、*PPAR γ* 、*FABP4* 和 *LPL* 的表达量也显著下降,进一步研究发现 *lncRNA ADINR* 可通过招募染色体修饰复合物 MLL3/4 调节 *C/EBP α* 基因启动子区域的 H3K4me3 修饰,从而转录激活 *C/EBP α*

正向调节脂肪形成。

本研究为探讨 *lnc-RAP3* 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化的影响,通过比较诱导分化前后细胞内 *lnc-RAP3* 的相对表达量发现,诱导分化第 2 d 细胞内 *lnc-RAP3* 的表达量较诱导分化前显著增加,这与 Sun 等^[16]的研究结果相一致。采用干扰细胞内 *lnc-RAP3* 的表达和构建 *lnc-RAP3* 的真核过表达载体并转染 3T3-L1 前脂肪细胞的方法,比较不同处理组间细胞内脂滴集聚情况、成脂分化相关标志基因 *PPAR γ* 、*C/EBP α* 、*FAS*、*LPL* 和 *Glut4* 等的相对表达量差异发现 *lnc-RAP3* 可抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的成脂分化,这与 Sun 等^[16]所报道结果相反,究其原因,可能存在以下几方面的影响:(1)本研究所用细胞为 3T3-L1 前脂肪细胞系,细胞单一,而 Sun 等所用细胞为小鼠皮下脂肪来源的原代分离培养细胞,所分离细胞里可能混杂部分脂肪细胞和其他类型细胞如成纤维细胞等,可能对实验结果产生一定影响;(2)本研究采用对 *lnc-RAP3* 敲降和过表达相结合的方式均发现 *lnc-RAP3* 可抑制前脂肪细胞的成脂分化(均持续转染 48 h),而 Sun 等只进行了敲降试验,且转染 siRNA 只持续了 24 h,并且本研究中发现 Sun 等所用 3 条 siRNA 对 *lnc-RAP3* 的抑制效率均低于 50%。同时,本研究所用 si-RAP3 在分化第 0 d 时(转染 2 d 后)其抑制效率为 52.5%,分化第 2 d 时(转染 4 d 后)抑制效率为 50.3%,到分化第 4 d 时(转染 6 d 后)抑制效率出现急剧下降,仅有 18.4%,这可能与 siRNA 作用的时效性有关;(3) 3T3-L1 前脂肪细胞在含胰岛素、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤和地塞米松的诱导分化培养液的诱导刺激下,*PPAR γ* 、*C/EBP α* 、*FAS*、*LPL* 和 *Glut4* 等成脂分化相关标志基因的表达量本应上升^[26-29],但本研究中过表达 *lnc-RAP3* 后脂肪酸合成酶基因 *FAS* 的表达量较诱导分化前极显著下降了 57.7%,*PPAR γ* 显著下降了 31.4%,进一步说明 *lnc-RAP3* 可通过抑制 *FAS* 和 *PPAR γ* 等成脂分化相关基因的表达而抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的成脂分化。此外,本研究结果显示 *lnc-RAP3* 的表达量在诱导分化后先升高后降低,猜测 *lnc-RAP3* 可能属于阶段性表达基因,即随着 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化,细胞会发生一系列改变与适应。而 *lnc-RAP3* 可能扮演

着拮抗者的角色,在细胞内刚开始成脂分化时,为了维系细胞稳态而出现高表达,当细胞的成脂分化已不可逆时,其表达量又自然回落,但 *lnc-RAP3* 在脂肪生成中的具体作用机制还有待进一步研究。

本研究结果表明 *lnc-RAP3* 可通过抑制 *FAS* 和 *PPAR γ* 等成脂分化相关基因的表达而抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的成脂分化,为进一步探讨 lncRNA 对脂肪细胞分化的分子机制提供了理论依据。

参考文献(References):

- [1] Van den Berg E, Kloppenborg RP, Kessels RP, Kappelle LJ, Biessels GJ. Type 2 diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemia and obesity: a systematic comparison of their impact on cognition. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792(5): 470-481. [DOI]
- [2] Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(5): 968-976. [DOI]
- [3] Barth RJ. Insulin resistance, obesity and the metabolic syndrome. *S D Med*, 2011, Spec No: 22-27. [DOI]
- [4] Larsson SC, Wolk A. Obesity and the risk of gallbladder cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*, 2007, 96(9): 1457-1461. [DOI]
- [5] Hung T, Chang HY. Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms. *RNA Biol*, 2010, 7(5): 582-585. [DOI]
- [6] Yang L, Froberg JE, Lee JT. Long noncoding RNAs: fresh perspectives into the RNA world. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(1): 35-43. [DOI]
- [7] Du MY, Yin L, He X. Research progress and clinical prospect of lncRNA in tumor invasion and metastasis. *J Chin Oncol*, 2017, 23(1): 54-59.
杜鸣宇, 尹丽, 何侠. lncRNA 在肿瘤侵袭转移中的研究进展与临床展望. *肿瘤学杂志*, 2017, 23(1): 54-59. [DOI]
- [8] Riva P, Ratti A, Venturin M. The long non-coding RNAs in neurodegenerative diseases: novel mechanisms of pathogenesis. *Curr Alzheimer Res*, 2016, 13(11): 1219-1231. [DOI]
- [9] Arab K, Park YJ, Lindroth AM, Schäfer A, Oakes C, Weichenhan D, Lukanova A, Lundin E, Risch A, Meister M, Dienemann H, Dyckhoff G, Herold-Mende C, Grummt I, Niehrs C, Plass C. Long noncoding RNA TARID, directs demethylation and activation of the tumor suppressor TCF21, via GADD45A. *Mol Cell*, 2014, 55(4): 604-614. [DOI]

- [10] Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F, Shi Y, Segal E, Chang HY. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*, 2010, 329(5992): 689–693. [DOI]
- [11] Beltran M, Puig I, Peña C, García JM, Alvarez AB, Peña R, Bonilla F, de Herreros AG. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes Dev*, 2008, 22(6): 756–769. [DOI]
- [12] Alvarez-Dominguez JR, Bai Z, Xu D, Yuan B, Lo KA, Yoon MJ, Lim YC, Knoll M, Slavov N, Chen S, Peng C, Lodish HF, Sun L. *De novo* reconstruction of adipose tissue transcriptomes reveals long non-coding RNA regulators of brown adipocyte development. *Cell Metab*, 2015, 21(5): 764–776. [DOI]
- [13] Zhao XY, Li S, Wang GX, Yu Q, Lin JD. A long noncoding RNA transcriptional regulatory circuit drives thermogenic adipocyte differentiation. *Mol Cell*, 2014, 55(3): 372–382. [DOI]
- [14] Divoux A, Karastergiou K, Xie H, Guo W, Perera RJ, Fried SK, Smith SR. Identification of a novel lncRNA in gluteal adipose tissue and evidence for its positive effect on preadipocyte differentiation. *Obesity (Silver Spring)*, 2014, 22(8): 1781–1785. [DOI]
- [15] Gernapudi R, Wolfson B, Zhang Y, Yao Y, Yang P, Asahara H, Zhou Q. MicroRNA 140 promotes expression of long noncoding RNA NEAT1 in adipogenesis. *Mol Cell Biol*, 2015, 36(1): 30–38. [DOI]
- [16] Sun L, Goff LA, Trapnell C, Alexander R, Lo KA, Hacsileyman E, Sauvageau M, Tazon-Vega B, Kelley DR, Hendrickson DG, Yuan B, Kellis M, Lodish HF, Rinn JL. Long noncoding RNAs regulate adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(9): 3387–3392. [DOI]
- [17] Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, Ellis R, Chen J, Evans RM, Spiegelman BM. Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev*, 1996, 10(8): 974–984. [DOI]
- [18] Brandes R, Arad R, Bar-Tana J. Inducers of adipose conversion activate transcription promoted by a peroxisome proliferators response element in 3T3-L1 cells. *Biochem Pharmacol*, 1995, 50(11): 1949–1951. [DOI]
- [19] Tzamelis I, Fang H, Ollero M, Shi H, Hamm JK, Kievit P, Hollenberg AN, Flier JS. Regulated production of a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand during an early phase of adipocyte differentiation in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 2004, 279(34): 36093–36102. [DOI]
- [20] Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J*, 1996, 15(19): 5336–5348. [DOI]
- [21] Stephens JM, Pekala PH. Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. Regulation is coordinate and independent of protein synthesis. *J Biol Chem*, 1992, 267(19): 13580–13584. [DOI]
- [22] Hacsileyman E, Goff LA, Trapnell C, Williams A, Henao-Mejia J, Sun L, McClanahan P, Hendrickson DG, Sauvageau M, Kelley DR, Morse M, Engreitz J, Lander ES, Guttman M, Lodish HF, Flavell R, Raj A, Rinn JL. Topological organization of multichromosomal regions by the long intergenic noncoding RNA Firre. *Nat Struct Mol Biol*, 2014, 21(2): 198–206. [DOI]
- [23] Lanz RB, McKenna NJ, Onate SA, Albrecht U, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell*, 1999, 97(1): 17–27. [DOI]
- [24] Xu B, Gerin I, Miao H, Vu-Phan D, Johnson CN, Xu R, Chen XW, Cawthorn WP, MacDougald OA, Koenig RJ. Multiple roles for the non-coding RNA SRA in regulation of adipogenesis and insulin sensitivity. *PloS One*, 2010, 5(12): e14199. [DOI]
- [25] Xiao T, Liu L, Li H, Sun Y, Luo H, Li T, Wang S, Dalton S, Zhao RC, Chen R. Long noncoding RNA ADINR regulates adipogenesis by transcriptionally activating C/EBPalpha. *Stem Cell Reports*, 2015, 5(5): 856–865. [DOI]
- [26] Fernyhough ME, Okine E, Hausman G, Vierck JL, Dodson MV. PPARgamma and GLUT-4 expression as developmental regulators/markers for preadipocyte differentiation into an adipocyte. *Domest Anim Endocrinol*, 2007, 33(4): 367–378. [DOI]
- [27] Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 1998, 273(46): 30057–30060. [DOI]
- [28] Wang HW, Lu HL, Wen Y, Cianflone K. Expression of DGAT, LPL and adiponin mRNA during differentiation of 3T3-L1 preadipocyte induced by acylation stimulating protein. *Acta Med Univ Sci Technol Huazhong*, 2005, 34(6): 707–710.
王宏伟, 卢慧玲, 温宇, 陈安福. 乙酰化蛋白诱导前脂肪细胞分化过程中 DGAT、LPL、adiponin mRNA 表达. *华中科技大学学报(医学版)*, 2005, 34(6): 707–710. [DOI]
- [29] Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. Transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 1998, 10(2): 165–173. [DOI]