

miR-486通过靶基因*Pten/Foxo1*调控 小鼠肝细胞脂质代谢

田海英^{1#} 莫索^{1#} 刘秋菊¹ 施孟如¹ 金晶¹ 吕建新^{1,2*} 李伟^{1,2*}
(¹温州医科大学检验医学院、生命科学学院,温州 325035; ²浙江省医学遗传学重点实验室,温州 325035)

摘要 该文研究了miR-486在小鼠肝细胞内是否可通过调控其靶基因*Pten*(phosphatase and tensin homolog, 同源性磷酸酶-张力蛋白)/*Foxo1*(forkhead box O1, 叉头转录因子)进而影响甘油三酯(triglyceride, TG)和极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)的合成。采用腺病毒载体感染小鼠肝癌细胞Hepa1-6, 并测定靶基因*Pten/Foxo1*表达及VLDL和TG变化。腺病毒载体感染miR-486的模拟剂(mimic)和抑制剂(antago)至细胞株Hepa1-6, Ad-miR-486 mimic组miR-486水平显著增加($P<0.001$), PTEN/FoxO1的mRNA和蛋白质水平显著降低, 细胞内VLDL含量显著降低($P<0.01$), TG含量明显增加($P<0.05$); 反之, Ad-miR-486 antago组miR-486表达水平受到抑制, PTEN/FoxO1的mRNA和蛋白质水平显著增加($P<0.01$), 且细胞内VLDL含量显著增加($P<0.01$), TG含量明显降低($P<0.05$)。该研究结果表明, miR-486可能通过调节*Pten/Foxo1*来影响细胞内的VLDL和TG生成。

关键词 miR-486; 小鼠肝癌细胞; *Pten/Foxo1*; 脂质代谢; 极低密度脂蛋白

miR-486 Regulated Lipid Metabolism through Targeting *Pten/Foxo1* in Mouse Hepatic Cell Line

Tian Haiying^{1#}, Mo Suo^{1#}, Liu Qiuju¹, Shi Mengru¹, Jin Jing¹, Lü Jianxin^{1,2*}, Li Wei^{1,2*}
(¹Wenzhou Medical University School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou 325035, China;
²Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou 325035, China)

Abstract In order to investigate the regulatory effects and mechanism of miR-486 on triglyceride (TG) and very low density lipoprotein (VLDL) synthesis in mouse liver cells, the miR-486 mimic or antago were infected into Hepa1-6 mouse hepatoma cells through adenovirus vector, then *Pten* (phosphatase and tensin homolog)/*Foxo1* (forkhead box O1) and lipid metabolism were measured. The result showed that overexpression of miR-486 ($P<0.001$) attenuated the expression of PTEN/FoxO1 and the VLDL content ($P<0.01$), and increased the TG content ($P<0.05$). Conversely, down-regulation of miR-486, increased the expression of PTEN/FoxO1 and the VLDL content ($P<0.01$), and reduced the TG content ($P<0.05$). It was concluded that miR-486 can affect lipid metabolism in mouse liver cells by regulating its potential targets *Pten/Foxo1*.

Keywords miR-486; mouse hepatoma cells; *Pten/Foxo1*; lipid metabolism; very low density lipoprotein

收稿日期: 2016-03-31

接受日期: 2016-08-10

国家自然科学基金(批准号: 81170749、31370795)和浙江省自然科学基金(批准号: LY13H070006)资助的课题

*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com; Tel: 0577-86699399, E-mail: liweiwzmc@163.com

Received: March 31, 2016

Accepted: August 10, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81170749, 31370795) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LY13H070006)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com; Tel: +86-577-86699399, E-mail: liweiwzmc@163.com

网络出版时间: 2016-10-28 13:39:15

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161028.1339.006.html>

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指除酒精和其他明确的肝损害因素外所致的以弥漫性肝细胞大泡性脂肪病变为主要特征的临床病理综合征^[1]。近年来,西方国家成年普通人群NAFLD患病率在20%~30%之间,我国NAFLD患病率也呈逐年上升的趋势。肥胖、高脂饮食和胰岛素抵抗已被确定为NAFLD发病的危险因素^[2]。

极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)是由肝合成的直径为30~80 nm的球状分子,以甘油三酯(triglyceride, TG)和胆固醇酯(cholesterol ester, CE)为核心,表面覆盖少量载脂蛋白和磷脂,VLDL的主要作用是将肝生成的脂肪酸运输到脂肪组织并贮存起来^[3]。由于生物体内肝合成的TG并不能随血液运输,必须先肝内组装成脂蛋白并以VLDL的形式分泌到血液中后才能到达肝外组织,从而被利用。因此,肝VLDL的生成和分泌受阻有可能是导致TG异常沉积于肝细胞造成肝脂肪变性导致脂肪肝的一个因素^[4]。VLDL的生物合成是一个极其复杂的过程,主要发生在肝,其生物合成的过程是载脂蛋白B100逐步酯化的过程并且受到各种因素如合成原料(甘油三酯、胆固醇)、机体能量代谢状态以及胰岛素水平等的影响^[5-6]。

近期研究发现,microRNA(miRNA)在脂蛋白代谢调控中发挥着重要的作用^[7-9]。例如,miR-33可靶向沉默ATP结合盒转运蛋白A1(ATP-binding cassette transporter A1, *ACBA1*)和ATP结合盒转运蛋白G1(ATP binding cassette transporter G1, *ABCG1*),抑制胆固醇流出和HDL合成^[10-13]; miR-122高表达于肝脏,促进胆固醇和脂肪酸合成,抑制胆汁酸和脂肪酸氧化等^[9]。

高果糖喂养的仓鼠模型是研究胰岛素抵抗状态下VLDL合成机制的经典模型,我们通过分析高果糖喂养仓鼠肝脏miRNA表达谱发现,miR-486在果糖喂养后出现显著下调,进而推测miR-486可能在转录水平调控着VLDL的合成。

本研究通过在小鼠肝癌细胞株Hepal-6中过表达和抑制miR-486,观察其对同源性磷酸酶-张力蛋白(phosphatase and tensin homolog, PTEN)和叉头转录因子(forkhead box O1, FoxO1)的调控以及TG、VLDL含量的变化,探讨调控脂质代谢的新机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和病毒 miR-486 mimic腺病毒、miR-486 antago腺病毒及对照腺病毒的包装均购自汉恒生物科技(上海)有限公司, Hepal-6细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

1.1.2 主要试剂 DMEM高糖培养基及胎牛血清购自Gibco公司,胰蛋白酶和Western blot及IP细胞裂解液购自碧云天生物技术有限公司, TG检测试剂盒购自南京建成生物工程有限公司,油红O染料及油酸购自Sigma公司,牛血清白蛋白(BSA)购自Equitech-Bio公司。p-Akt抗体及Akt抗体购自Cell Signaling Technology公司, Apolipoprotein CIII兔多克隆抗体、Apolipoprotein E抗体及MTTP抗体购自Affinity公司, FoxO1兔单克隆抗体购自Abcam公司, PTEN兔单克隆抗体及 β -actin抗体购自碧云天生物技术有限公司。逆转录PCR试剂盒及实时定量PCR试剂盒购自大连宝生物工程有限公司, miR-486引物和U6 snRNA引物购自Thermo Fisher Scientific公司,其他引物均由Invitrogen公司合成。

1.1.3 主要仪器 仪器有细胞培养皿(美国Corning公司)、倒置荧光显微镜(日本Nikon公司)、凝胶成像系统和荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司)和SuperoseTM 6/10 300 GL凝胶柱(美国GE Healthcare公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Hepal-6细胞和腺病毒感染后的Hepal-6细胞培养基均为含有10% FBS和1%双抗(青霉素、链霉素)的DMEM高糖培养基,培养条件为37 °C、5% CO₂及饱和湿度的无菌培养箱。实验选用对数生长期的细胞。

1.2.2 实验分组 实验设立Ad-miR-486 mimic组(感染miR-486 mimic腺病毒的Hepal-6细胞)、Ad-miR-486 antago组(感染miR-486 antago腺病毒的Hepal-6细胞)和对照组(感染miR-486 GFP腺病毒的Hepal-6细胞)。

1.2.3 腺病毒感染Hepal-6细胞 根据腺病毒滴度确定最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)值及感染Hepal-6细胞所使用的病毒量(表1)。

1.2.4 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达 在转染24 h后分别观察对照组、Ad-miR-486 mimic和Ad-miR-486 antago组细胞内GFP的表达情况。

1.2.5 荧光定量PCR检测mRNA水平 Hepal-6细

表1 腺病毒感染复数(MOI)与病毒体积

Table 1 Adenovirus infection complex (MOI) and volume of virus

规格 Specifications	感染复数 MOI	病毒数量 Count of virus	病毒体积 Volume of virus
24 well	50-100	$(1.0-3.0) \times 10^7$	1.0-3.0 μ L
12 well	50-100	$(2.5-5.0) \times 10^7$	2.5-5.0 μ L
6 well	50-100	$(0.5-2.0) \times 10^8$	5.0-20.0 μ L

腺病毒滴度以 10^{10} /mL为准,其他滴度需相应换算;细胞数目是根据80%~100%细胞密度估算而出,具体细胞数接种细胞时进行细胞计数。

The titer of the adenovirus is 10^{10} /mL, and the other titers should be calculated accordingly. The cell numbers are estimated according to the density of 80%-100% cells, and the exact cell numbers are required to count.

表2 引物序列

Table 2 Primer sequences

基因 Gene	正向引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	反向引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
<i>Pten</i>	ACT GCA CGA ATA ATA AGG CAT	TAA AAT TGA AGC CCT AAT CCC
<i>Foxo1</i>	TTA CTT AGC TCT CCC CTC GTT	TGC CCA AAC AAA GGT AGT CAG
<i>Mtp</i>	TTG AAA TGC GAA ACA GAC GA	ACG TCT AGC CAG TAG TTC CTC
<i>ApoCIII</i>	ACA AGC CTC CAA GAC GGT CCA	TAA ACT TGC TCC AGT AGC CTT
<i>Srebfl</i>	AGA AGC TCA AGC AGG AGA ACC TGA	ACT TCG GGT TTC ATG CCC TCC ATA
<i>Fasn</i>	AGC ACT GCC TTC GGT TCA GTC	AAG AGC TGT GGA GGC CAC TTG
<i>Acaca</i>	GAA GTC AGA GCC ACG GCA CA	GGC AAT CTC AGT TCA AGC CAG TC
<i>Gapdh</i>	AAC GAC CCC TTC ATT GAC	TCC ACG ACA TAC TCA GCA C
<i>Rn18S</i>	GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT	CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG
<i>Actb</i>	TAC TGA GCT GCG TTT TAC ACC	CCT GAG TCA AAA GCG CCA A

胞以 5×10^5 /孔接种于24孔板内,用500 μ L含10% FBS DMEM培养基培养过夜,当融合度达到约70%时加入1.5 μ L稀释的腺病毒感染细胞,培养24 h后,总RNA的提取、逆转录、PCR反应均按试剂盒说明书操作。采用探针法检测miR-486及SYBR Green法检测*Pten*、*Foxo1*、*Mtp*、*Apoc3*、*Srebfl*、*Fasn*、*Acaca* mRNA的水平,内参为U6 snRNA、*Gapdh*、*Actb*和*Rn18S*。目的基因的全称和引物序列见表2。

1.2.6 Western blot 检测蛋白质水平 Hepa1-6细胞接种于10 cm细胞培养皿中,汇合度达90%时按照上述方法铺板分组。腺病毒感染48 h后,提取各组细胞总蛋白,BCA法检测蛋白质浓度,样本加入 $5 \times$ 蛋白质上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C变性5 min,采用SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白质(每孔30 μ g),转膜、封闭,一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,二抗室温孵育1 h,ECL化学发光检测显影,在凝胶成像系统上拍照并分析,内参为GAPDH/ β -actin。

1.2.7 细胞内TG含量测定 Hepa1-6细胞接种于10 cm细胞培养皿中,汇合度达90%时按照上述方法铺板分组,腺病毒感染后8 h后各组均给予相同浓

度(0.2 mmol/L)油酸处理,继续培养24 h后收集各组细胞,弃掉培养液,用PBS清洗2遍,再用Western blot及IP细胞裂解液充分裂解细胞,12 000 r/min离心10 min,取上清液,用TG试剂盒测定上清中TG含量,并用BCA蛋白定量法进行蛋白定量,计算每毫克蛋白质所对应的TG含量。

1.2.8 油红O染色观察细胞内脂滴形态 细胞培养方法和处理同1.2.7。获得的细胞小心用PBS漂洗2次,4%多聚甲醛固定15 min,PBS洗2次,60%异丙醇媒染1~2 min,油红O工作液(0.5 g油红O溶于100 mL异丙醇,配成0.5%油红O贮备液,以6:4的比例将贮备液与蒸馏水混匀后过滤2次,至液体澄清为止,即得油红O工作液)染色20 min,蒸馏水洗2次,光镜下观察各组细胞内脂质沉积情况。为了排除DMEM自身的影响,本研究增加了空白组和DMEM组。

1.2.9 快速蛋白质液相色谱(fast protein liquid chromatography, FPLC)法分离细胞内VLDL 用胰蛋白酶消化细胞,收集到1.5 mL EP管中,离心去除上清,加入再用Western blot及IP细胞裂解液冰上处理细胞30 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心10 min,取上清液,经

过0.22 μm 微孔滤膜过滤后通过FPLC分离VLDL并检测。

1.2.10 数据分析 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 形式表示,用GraphPad Prism 5软件进行独立样本 t 检验,分析显著性差异。 $P<0.05$ 为具有统计学差异。

2 结果

2.1 腺病毒载体感染细胞株

腺病毒感染24 h后荧光显微镜下观察结果显示,对照组、Ad-miR-486 mimic组和Ad-miR-486 antago

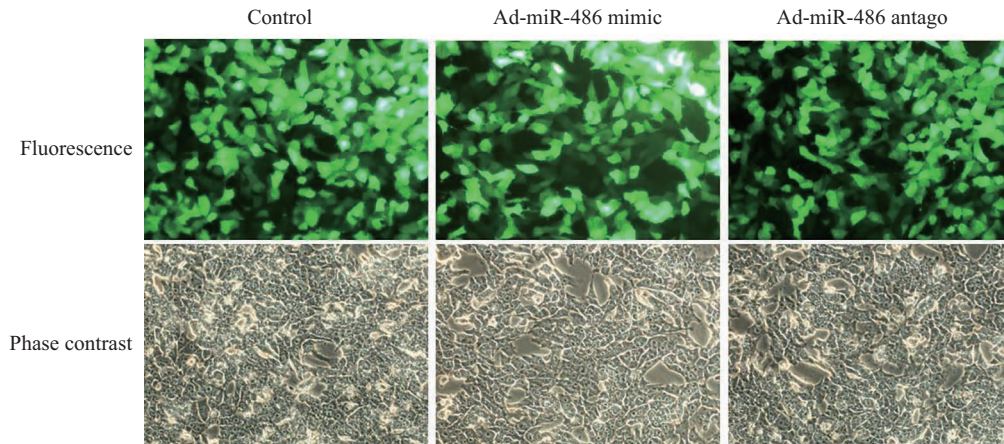
组荧光强度几乎接近而且强度都很高,说明感染效率高。荧光显微镜下拍照结果如图1所示。

2.2 细胞株感染效果的鉴定

与对照组相比,Ad-miR-486 mimic组miR-486水平显著升高($P<0.001$),Ad-miR-486 antago组miR-486水平降低($P<0.05$),说明细胞感染成功(图2)。

2.3 基因水平的检测

2.3.1 *Pten*和*Foxo1* mRNA水平的检测 荧光定量PCR结果显示,与对照组相比,Ad-miR-486 mimic组两个靶基因*Pten*和*Foxo1*的mRNA水平降低,Ad-

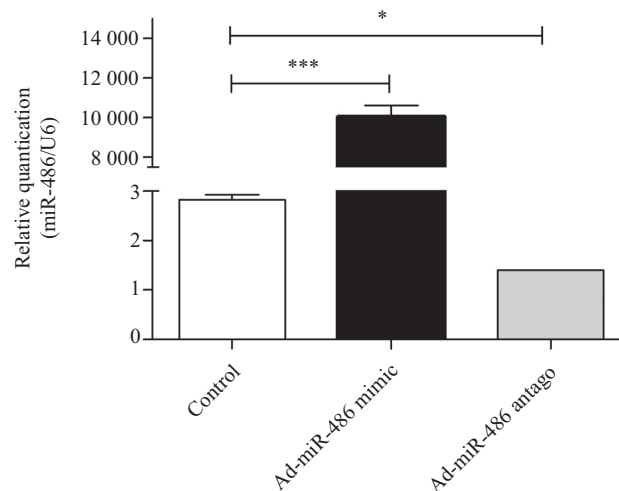


Fluorescence: 蓝色激发光下观察瞬时感染细胞绿色荧光蛋白; Phase contrast: 相同视野的白光对照。Control: 对照腺病毒载体感染组; Ad-miR-486 mimic: miR-486模拟剂感染组; Ad-miR-486 antago: miR-486抑制剂感染组。

Fluorescence: observation of transiently infected cell line under blue light; Phase contrast: observation of the same field under white light. Control: comparison adenovirus vector infection group; Ad-miR-486 mimic: miR-486 mimic infection group; Ad-miR-486 antago: miR-486 antago infection group.

图1 腺病毒介导的miR-486瞬时感染细胞株的建立(400 \times)

Fig.1 Establishment of adenovirus mediated miR-486 transiently infected cell lines (400 \times)



Control: 对照腺病毒载体感染组; Ad-miR-486 mimic: miR-486模拟剂感染组; Ad-miR-486 antago: miR-486抑制剂感染组。* $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。Control: comparison adenovirus vector infection group; Ad-miR-486 mimic: miR-486 mimic infection group; Ad-miR-486 antago: miR-486 antago infection group. * $P<0.05$, *** $P<0.001$ 。

图2 miR-486在瞬时感染细胞株中的表达

Fig.2 Expression of miR-486 in transiently infected cell lines

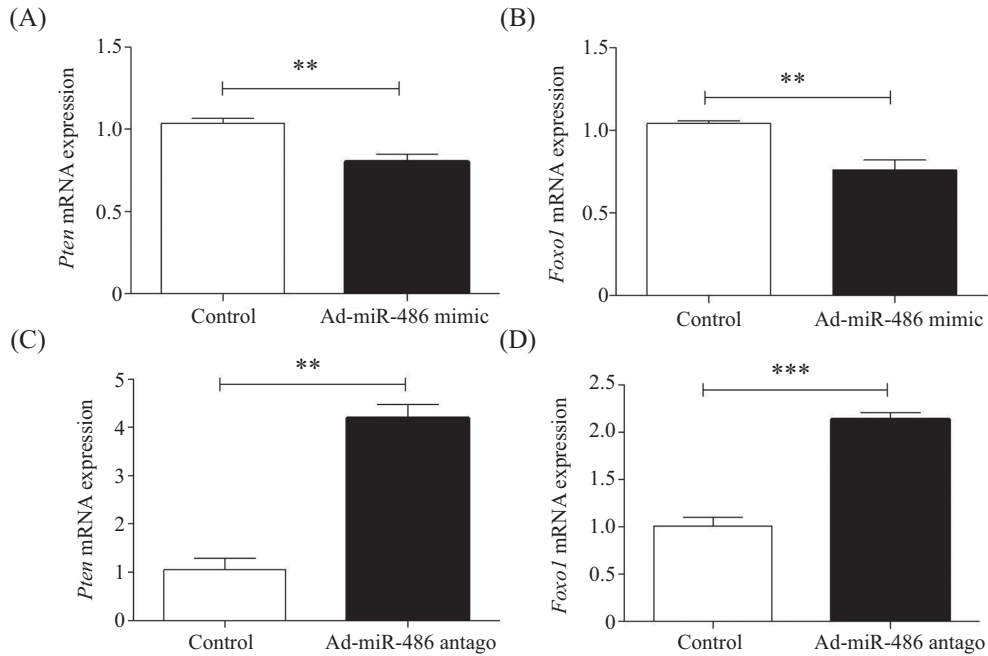
miR-486 antago组两个靶基因的mRNA水平升高, 均具有统计学意义($P<0.01$, $P<0.001$)(图3)。

2.3.2 参与VLDL组装的关键基因*Mttp* mRNA水平的检测 荧光定量PCR结果显示, 与对照组相比, Ad-miR-486 mimic组甘油三酯转运蛋白(microsomal triglyceride transfer protein, *Mttp*)的mRNA水平降低; 反之, Ad-miR-486 antago组*Mttp*的mRNA水平升高,

均具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)(图4), 说明miR-486可以阻滞VLDL的组装过程。

2.4 感染细胞株内蛋白质水平的变化

Western blot结果显示, 与对照组相比, Ad-miR-486 mimic组PTEN/FoxO1蛋白质水平降低, Akt信号通路的关键分子P-Akt^{Ser473}水平升高, MTTP、载脂蛋白CIII(apolipoprotein CIII, apoCIII)、载脂蛋白B100

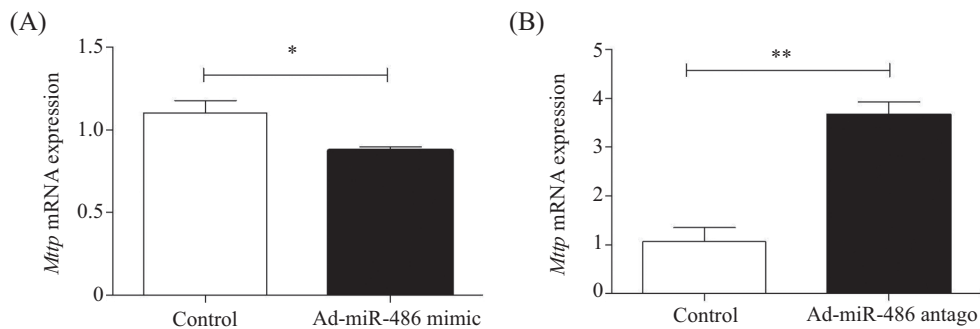


A: Ad-miR-486 mimic组*Pten*转录水平结果; B: Ad-miR-486 mimic组*Foxo1*转录水平结果; C: Ad-miR-486 antago组*Pten*转录水平结果; D: Ad-miR-486 antago组*Foxo1*转录水平结果。Control: 对照腺病毒载体感染组; Ad-miR-486 mimic: miR-486模拟剂感染组; Ad-miR-486 antago: miR-486抑制剂感染组。** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: expression of *Pten* gene in Ad-miR-486 mimic group; B: expression of *Foxo1* gene in Ad-miR-486 mimic group; C: expression of *Pten* gene in Ad-miR-486 antago group; D: expression of *Foxo1* gene in Ad-miR-486 antago group. Control: comparison adenovirus vector infection group; Ad-miR-486 mimic: miR-486 mimic infection group; Ad-miR-486 antago: miR-486 antago infection group. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图3 感染细胞株中miR-486对*Pten*/*Foxo1*表达的影响

Fig.3 Effects of miR-486 on target genes *Pten*/*Foxo1* expression in transiently infected cell lines

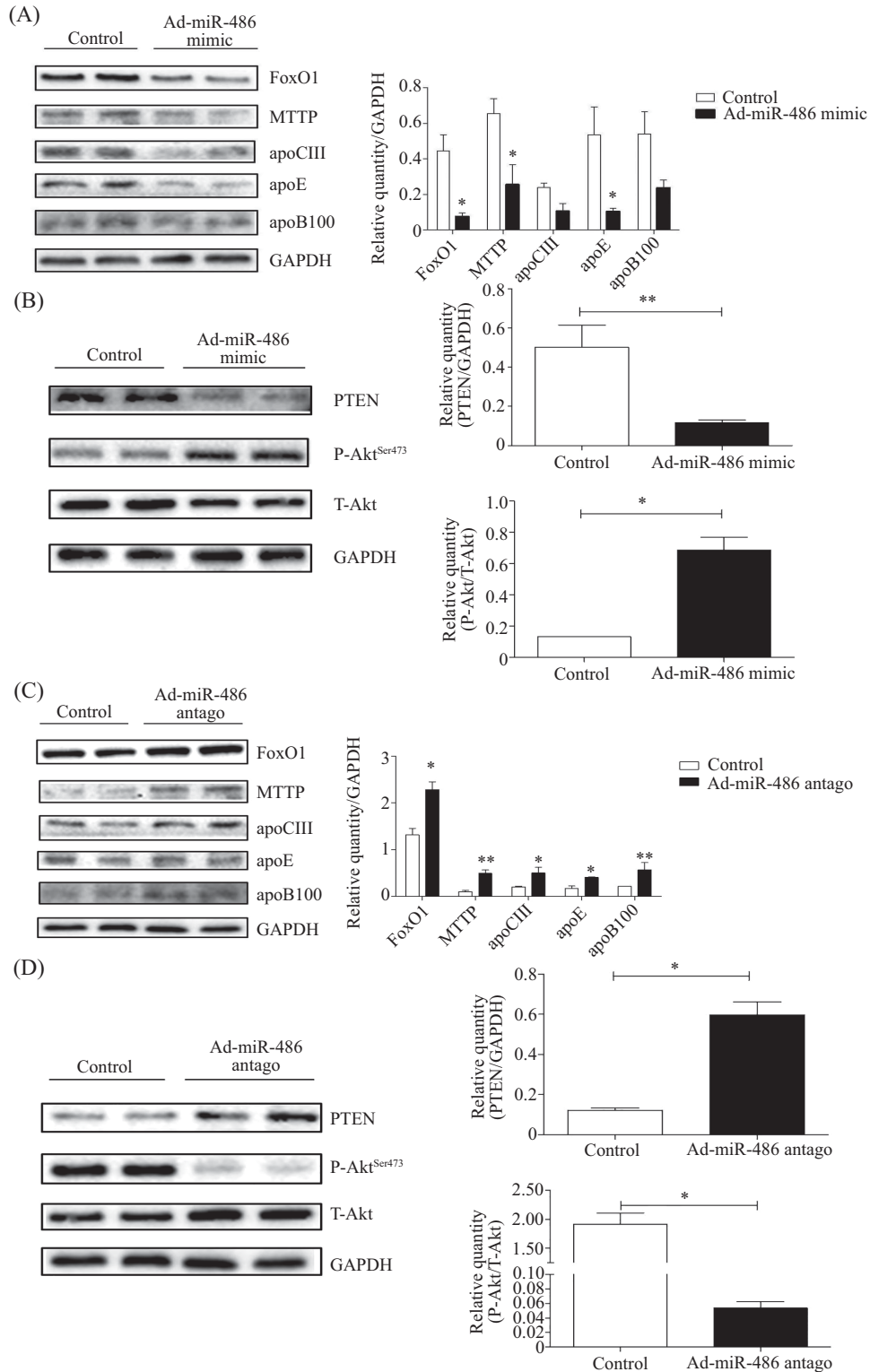


A: Ad-miR-486 mimic组*Mttp*转录水平表达情况; B: Ad-miR-486 antago组*Mttp*转录水平表达情况。Control: 对照腺病毒载体感染组; Ad-miR-486 mimic: miR-486模拟剂感染组; Ad-miR-486 antago: miR-486抑制剂感染组。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: expression of *Mttp* gene in Ad-miR-486 mimic group; B: expression of *Mttp* gene in Ad-miR-486 antago group. Control: comparison adenovirus vector infection group; Ad-miR-486 mimic: miR-486 mimic infection group; Ad-miR-486 antago: miR-486 antago infection group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图4 感染细胞株中miR-486对*Mttp*表达的影响

Fig.4 Effects of miR-486 on the expression of target gene *Mttp* in transiently infected cell lines



A: Ad-miR-486 mimic组FoxO1、MTTP、apoCIII、apoE、apoB100蛋白质水平比较; B: Ad-miR-486 mimic组PTEN、P-Akt^{Ser473}蛋白质水平比较; C: Ad-miR-486 antago组FoxO1、MTTP、apoCIII、apoE、apoB100蛋白质水平比较; D: Ad-miR-486 antago组PTEN、P-Akt^{Ser473}蛋白质水平比较。Control: 对照腺病毒载体感染组; Ad-miR-486 mimic: miR-486模拟剂感染组; Ad-miR-486 antago: miR-486抑制剂感染组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组相比较。

A: protein levels of FoxO1, MTTP, apoCIII, apoE and apoB100 protein in Ad-miR-486 mimic group; B: protein levels of PTEN and P-Akt^{Ser473} in Ad-miR-486 mimic group; C: protein levels of FoxO1, MTTP, apoCIII, apoE and apoB100 in Ad-miR-486 antago group; D: protein levels of PTEN and P-Akt^{Ser473} in Ad-miR-486 antago group. Control: comparison adenovirus vector infection group; Ad-miR-486 mimic: miR-486 mimic infection group; Ad-miR-486 antago: miR-486 antago infection group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图5 感染细胞株中miR-486对蛋白质水平的影响

Fig.5 Effects of miR-486 on protein levels in transiently infected cell lines

(apolipoprotein B100, apoB100)以及载脂蛋白E(apolipoprotein E, apoE)水平降低;反之, Ad-miR-486 antago组PTEN/FoxO1水平升高, Akt信号通路的关键分子P-Akt^{Ser473}水平降低, MTTP、apoCIII、apoB100和apoE水平升高(图5)。

2.5 脂质合成相关基因*Fasn*、*Acaca*、*Srebf1* mRNA水平的检测

荧光定量PCR结果显示,与对照组相比, Ad-miR-486 mimic组*Fasn*、*Acaca*、*Srebf1*的mRNA水平升高;反之, Ad-miR-486 antago组*Fasn*、*Acaca*、*Srebf1*的mRNA水平降低,除了Ad-miR-486 antago组*Fasn*的mRNA水平差异不显著之外,均具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)(图6)。

2.6 油红O染色细胞内脂滴

油红O属于偶氮染料,是很强的脂溶剂和染

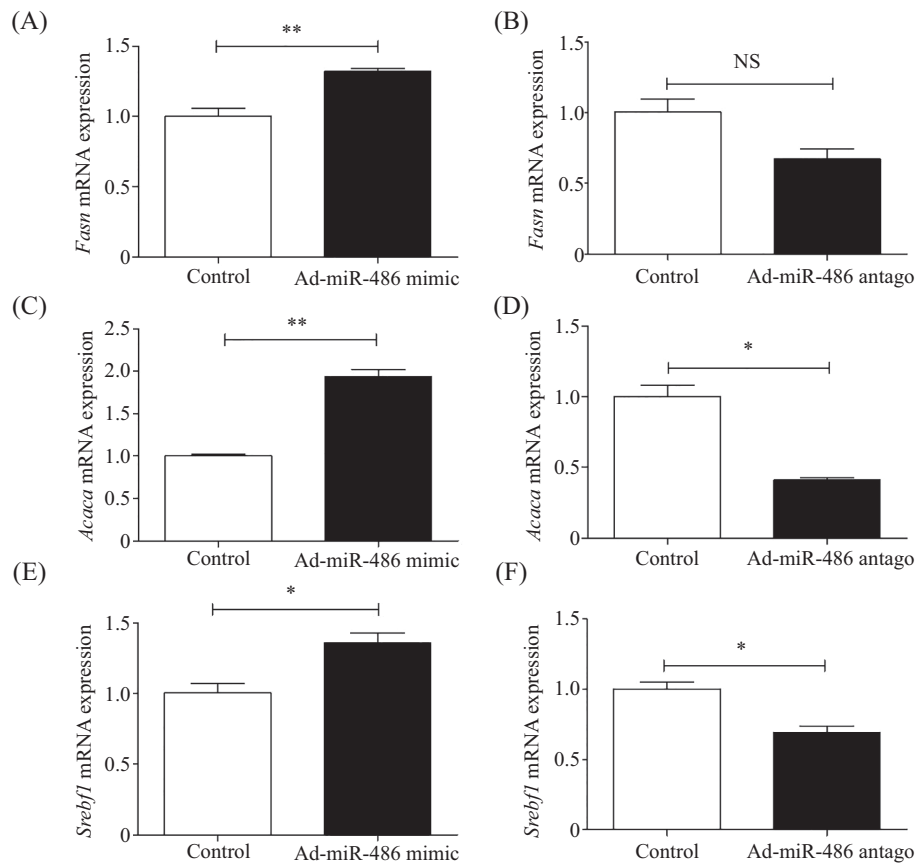
脂剂,与TG结合呈小脂滴状,可以直观地反映细胞内TG的含量。油红O染色结果显示,与对照组相比, Ad-miR-486 mimic组脂质沉积升高;反之, Ad-miR-486 antago组脂质沉积降低。试剂盒法检测细胞内TG含量的结果显示,与对照组相比, Ad-miR-486 mimic组TG含量升高($P<0.05$);反之, Ad-miR-486 antago组TG含量降低($P<0.05$)(图7)。

2.7 FPLC法分离细胞内的极低密度脂蛋白

FPLC利用分子筛的原理分离细胞内VLDL,结果显示,与对照组相比, Ad-miR-486 mimic组VLDL显著降低($P<0.01$);反之, Ad-miR-486 antago组VLDL明显升高($P<0.01$)(图8)。

3 讨论

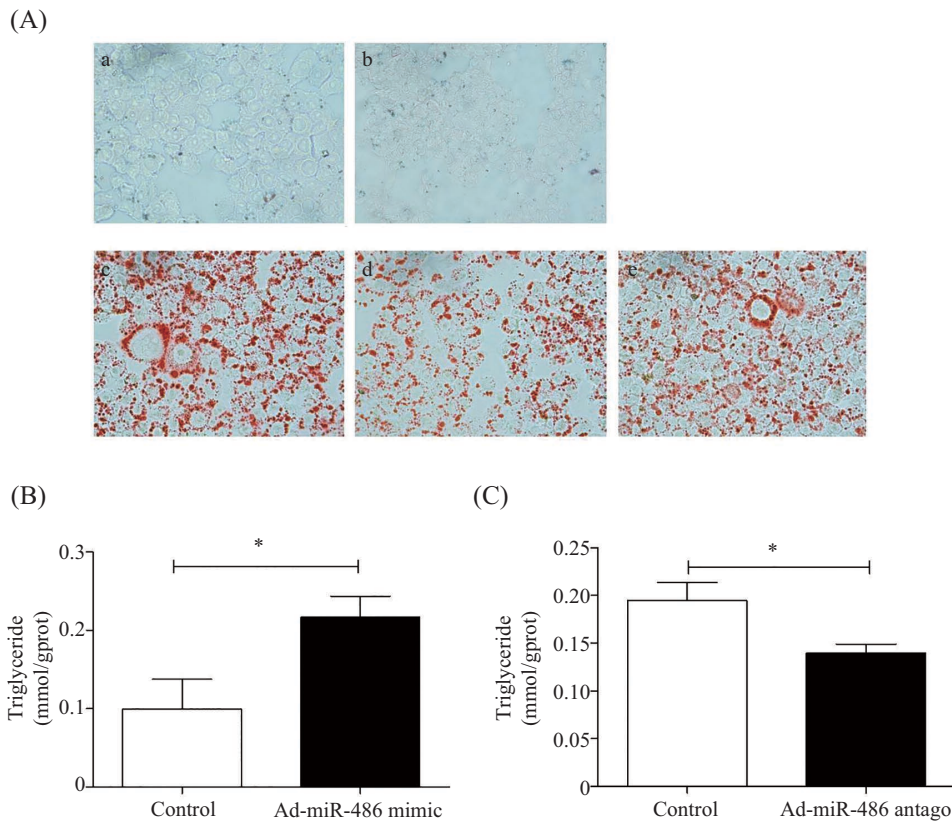
NAFLD是一种常见的临床现象,是多种原因引



A: Ad-miR-486 mimic组*Fasn*的mRNA水平; B: Ad-miR-486 antago组*Fasn*的mRNA水平; C: Ad-miR-486 mimic组*Acaca*的mRNA水平; D: Ad-miR-486 antago组*Acaca*的mRNA水平; E: Ad-miR-486 mimic组*Srebf1*的mRNA水平; F: Ad-miR-486 antago组*Srebf1*的mRNA水平。Control: 对照腺病毒载体感染组; Ad-miR-486 mimic: miR-486模拟剂感染组; Ad-miR-486 antago: miR-486抑制剂感染组。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。NS: 无统计学差异。

图6 感染细胞株中miR-486对脂质合成相关基因表达的影响

Fig.6 Effects of miR-486 on lipid synthesis-related genes expression in transiently infected cell lines

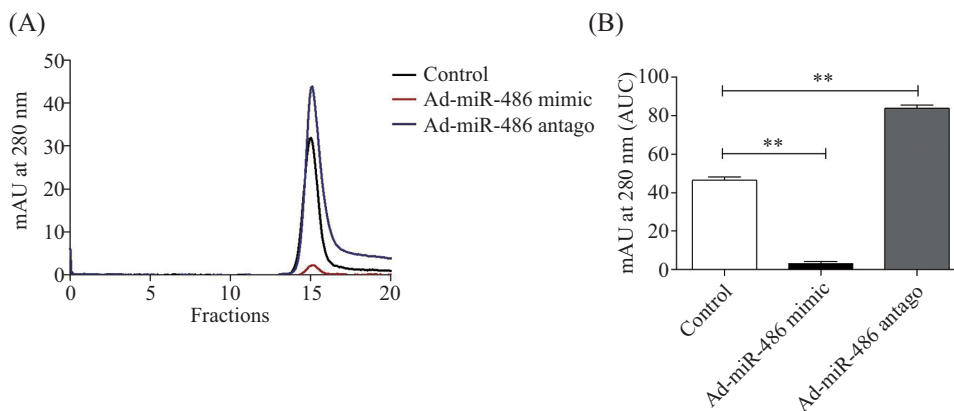


A: 油红O染料染色细胞内的脂滴(400×)。a: 空白组; b: DMEM组; c: Ad-miR-486 mimic组; d: Ad-miR-486 antago组; e: 对照组。B: Ad-miR-486 mimic组细胞内TG的含量。C: Ad-miR-486 antago组细胞内TG的含量。Control: 对照腺病毒载体感染组; Ad-miR-486 mimic: miR-486模拟剂感染组; Ad-miR-486 antago: miR-486抑制剂感染组。* $P < 0.05$ 。

A: lipid droplets within the oil red O staining in cells (400×). a: blank group; b: DMEM group; c: Ad-miR-486 mimic group; d: Ad-miR-486 antago group; e: control group. B: level of intracellular TG in Ad-miR-486 mimic group. C: level of intracellular TG in Ad-miR-486 antago group. Control: comparison adenovirus vector infection group; Ad-miR-486 mimic: miR-486 mimic infection group; Ad-miR-486 antago: miR-486 antago infection group. * $P < 0.05$.

图7 油红O染色细胞内脂滴及TG测定

Fig.7 Lipid droplets within the oil red O staining in cells and measuring triglycerides



A: 280 nm处VLDL吸光度平均值的曲线图; B: 各组曲线下面积值。Control: 对照腺病毒载体感染组; Ad-miR-486 mimic: miR-486模拟剂感染组; Ad-miR-486 antago: miR-486抑制剂感染组。** $P < 0.01$ 。

A: graph of VLDL absorbance mean at 280 nm; B: area under the curve values of each group. Control: comparison adenovirus vector infection group; Ad-miR-486 mimic: miR-486 mimic infection group; Ad-miR-486 antago: miR-486 antago infection group. ** $P < 0.01$ 。

图8 FPLC分离细胞内的VLDL

Fig.8 Intracellular VLDL separated by FPLC

起的肝细胞内脂肪堆积过多的病变。肝细胞脂肪酸和TG合成增加是导致NAFLD患者肝脏过量脂质沉积的主要因素^[14]。

目前研究发现,人和小鼠miR-486的成熟序列是一致的。实验室前期研究中,通过高果糖喂养仓鼠建立胰岛素抵抗状态下VLDL增多的经典模型,分析果糖喂养后仓鼠肝脏的基因表达图谱,发现miR-486的表达显著下调。文献报道证实,大鼠肌肉细胞中miR-486的靶点为*Pten*和*Foxo1*,过表达miR-486后PTEN和FoxO1蛋白质水平显著下降,PI3K/Akt(phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, 磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B)信号通路活性增强;反之,抑制miR-486后,PTEN和FoxO1a蛋白质水平增高,PI3K/Akt信号通路被抑制^[15]。PTEN与insulin-PI3K-Akt的关系已经得到充分验证,FoxO1与VLDL的关系也已经得到了广泛的证明。胰岛素信号活性降低则可以增强FoxO1活性,导致微粒体甘油三酯转运蛋白(MTTP)和载脂蛋白CIII(apoCIII)升高,MTTP促进VLDL组装,apoCIII则可以降低外周TG的代谢^[16]。

本研究通过构建miR-486过表达(miR-486 mimic)及干扰(miR-486 antago)腺病毒感染Hepa1-6细胞改变细胞内miR-486的表达量,结果显示,抑制miR-486后,PTEN表达水平增加,胰岛素信号活性受到抑制,FoxO1活性增强,导致MTTP升高,增加VLDL的组装合成,继而促进肝细胞内TG运输到细胞外的过程,减弱了肝细胞内脂质沉积。同时,抑制miR-486可通过PI3K/Akt信号通路影响mTOR的活性,进而降低脂质基因*Srebf1*、*Fasn*、*Acaca* mRNA的表达和细胞内TG的含量,油红O染色也证实抑制miR-486降低了细胞内的脂质沉积。

但不可避免的问题是,抑制miR-486在改善脂质沉积的同时也降低胰岛素信号通路的活性,但是否会导致胰岛素抵抗还需从动物水平进一步进行验证。

综上所述,抑制小鼠肝细胞内miR-486促进靶点*Pten/Foxo1*的表达进而增加细胞内VLDL的合成,改善细胞内的脂质沉积。本研究发现了可以调节VLDL合成的潜在miRNAs,为在转录水平调节VLDL合成及治疗脂肪肝和高脂血症提供了新的思路。此外,miR-486影响VLDL生成的具体作用机制

也需要进一步探讨。

参考文献 (References)

- 1 Kotronen A, Yki-jarvinen H. Fatty liver: A novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(1): 27-38.
- 2 Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* 2010; 51(2): 679-89.
- 3 Gibbons GF, Wiggins D, Brown AM, Hebbachi AM. Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* 2004; 32(Pt 1): 59-64.
- 4 Ijaz S, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Impairment of hepatic microcirculation in fatty liver. *Microcirculation* 2003; 10(6): 447-56.
- 5 Olofsson SO, Stillemark-Billton P, Asp L. Intracellular assembly of VLDL: Two major steps in separate cell compartments. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10(8): 338-45.
- 6 Olofsson SO, Boren J. Apolipoprotein B: A clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J Intern Med* 2005; 258(5): 395-410.
- 7 Moore KJ, Rayner KJ, Sudrez Y, Fernandez-Hernando C. miRNAs and cholesterol metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2010; 21(12): 699-706.
- 8 Fernandez-Hernando C, Sudrez Y, Rayner KJ, Moore KJ. MicroRNAs in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2011; 22(2): 86-92.
- 9 Tsai WC, Hsu SD, Hsu CS, Lai TC, Chen SJ, Shen R, et al. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest* 2012; 122(8): 2884-97.
- 10 Rayner K J, Suaarez Y, Davalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* 2010; 328(5985): 1570-3.
- 11 Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, et al. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science* 2010; 328(5985): 1566-9.
- 12 Gerin I, Clerbaux LA, Haumont O, Lanthier N, Das AK, Burant CF, et al. Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. *J Biol Chem* 2010; 285(44): 33652-61.
- 13 Marquart TJ, Allen RM, Ory DS, Baldan A. miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(27): 12228-32.
- 14 Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessum J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 2005; 115(5): 1343-51.
- 15 Edwin F, Singh RR, Baker SJ, Patel TB. The tumor suppressor PTEN is necessary for human Sprouty 2-mediated inhibition of cell proliferation. *J Biol Chem* 2006; 281(8): 4816-22.
- 16 Kamagate A, Dong H. FoxO1 integrates insulin signaling to VLDL production. *Cell Cycle* 2008; 7(20): 3162-70.