

CircHdgfrp3靶向miR-3089-3p/miR-760-5p抑制脂肪细胞分化

杨思晨^{1,2} 吴佳轩² 施绮雯¹ 张瑾^{2,3*} 毋文静^{2*}

(¹浙江工业大学药学院, 杭州 310014; ²嘉兴大学生物与化学工程学院, 嘉兴 314001;

³嘉兴爱博生物科技有限公司, 嘉兴 314001)

摘要 该研究旨在明确环状RNA分子circHdgfrp3对脂肪细胞成脂分化的作用及其机制。通过RNA-Seq筛选出在大白猪肌肉脂肪组织中表达水平显著高于皮下脂肪组织的环状RNA分子circHdgfl3, 其在猪和小鼠中的相似性高达93.87%。以小鼠前脂肪细胞系3T3-L1为材料, 通过RNase R消化法、核质定位法和qPCR法对circHdgfrp3进行鉴定、定位以及表达量分析, 结果显示, circHdgfrp3以稳定环状结构存在于细胞质中, 其表达水平在3T3-L1细胞分化过程中呈先升后降趋势; 通过转染si-circHdgfrp3或pcDNA3.1-circHdgfrp3改变其在3T3-L1细胞分化过程中表达水平; 利用油红O染色和Western blot等技术, 发现circHdgfrp3可显著抑制胞内脂滴积累($P<0.05$)和成脂标志基因PPAR γ 、C/EBP α 、LPL的表达($P<0.05$); 最后利用荧光素酶报告分析等技术, 确定circHdgfrp3与miR-3089-3p、miR-760-5p存在靶向结合关系, 并且可以显著减弱AKT的磷酸化。综上所述, circHdgfrp3可能通过靶向miR-3089-3p和miR-760-5p下调AKT-mTOR活性进而抑制脂肪细胞的成脂分化。

关键词 环状RNA; circHdgfrp3; 3T3-L1前脂肪细胞; 成脂分化

CircHdgfrp3 Targets miR-3089-3p/miR-760-5p to Inhibit Adipocyte Differentiation

YANG Sichen^{1,2}, WU Jiaxuan², SHI Qiwen¹, ZHANG Jin^{2,3*}, WU Wenjing^{2*}

(¹College of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; ²College of Biological and Chemical Engineering, Jiaxing University, Jiaxing 314001, China; ³Jiaxing Aibo Biotechnology Co., Ltd., Jiaxing 314001, China)

Abstract The aim of this study was to determine the effect of circHdgfrp3 on adipogenic differentiation of adipocytes and its mechanism. Firstly, the results of RNA-Seq sequencing were analyzed. And circHdgfl3, a circular RNA molecule whose expression levels in intramuscular fat was significantly higher than that of subcutaneous fat in Large White pigs, was screened out, and the sequence similarity between pigs and mice reaches 93.87% at the genomic level. Using mouse preadipocyte line 3T3-L1 as material, circHdgfrp3 was identified, localized and expressed by RNase R digestion, karyotoplasmic localization and qPCR. The results showed that circHdgfrp3 existed in the cytoplasm with stable ring structure. During 3T3-L1 cell differentiation, its expression level increased first and then decreased. Transfection of si-circHdgfrp3 or pcDNA3.1-circHdgfrp3 changed its expression level during 3T3-L1 cell differentiation. It was found that circHdgfrp3 could significantly inhibit intracellular lipid droplet accu-

收稿日期: 2025-01-10 接受日期: 2025-03-10

国家自然科学基金(批准号: 32102506、32172708)和浙江省自然科学基金(批准号: LTGD24C080001)资助的课题

*通信作者。Tel: 13516831490, E-mail: zhangjin7688@163.com; Tel: 13736433510, E-mail: wuwenjing19851020@163.com

Received: January 10, 2025 Accepted: March 10, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32102506, 32172708) and the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Grant No.LTGD24C080001)

*Corresponding authors. Tel: +86-13516831490, E-mail: zhangjin7688@163.com; Tel: +86-13736433510, E-mail: wuwenjing19851020@163.com

mulation ($P<0.05$) and the expression levels of lipid formation marker genes *PPAR γ* , *C/EBP α* and *LPL* ($P<0.05$) by oil red O staining and Western blot. Finally, using luciferase reporting analysis and other techniques, it was determined that circHdgfrp3 had a targeted binding relationship with miR-3089-3p and miR-760-5p, and could significantly reduce AKT phosphorylation. In summary, circHdgfrp3 may down-regulate AKT-mTOR activity by targeting miR-3089-3p and miR-760-5p, thereby inhibiting adipogenic differentiation of adipocytes.

Keywords circular RNA; circHdgfrp3; 3T3-L1 preadipocytes; adipogenic differentiation

脂肪组织在人体中扮演着至关重要的角色,它不仅是能量储存器官,还是内分泌器官,可以分泌多种激素对机体的代谢过程进行调控。脂肪组织的功能紊乱与多种代谢性疾病,如肥胖、胰岛素抵抗、血脂异常、非酒精性脂肪肝、高血压和心血管疾病等的发生发展密切相关,这些疾病不仅影响个体健康,也给公共卫生带来巨大挑战^[1]。脂肪细胞是脂肪组织中的主要细胞类型,它们在体内扮演着储存能量、维持体温以及参与内分泌调节等多重角色。脂肪细胞的分化是一个复杂的过程,这一过程不仅决定了脂肪细胞的数量和大小,而且对于维持正常的代谢平衡至关重要^[2]。脂肪细胞分化与脂质合成、分解、转运以及多种信号通路的调控密切相关,其中脂质合成主要依赖于脂肪酸合成酶系和甘油三酯合成酶等关键酶的作用,这些酶将葡萄糖、氨基酸等前体物质转化为脂肪酸和甘油三酯,储存在脂肪细胞内的脂滴中^[3]。涉及脂肪细胞的信号通路主要包括胰岛素信号通路、mTOR信号通路、AKT信号通路等,这些信号通路的协同作用,确保了脂肪细胞增殖分化过程的精确进行^[4]。除此之外,非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA)在调控脂肪细胞分化过程中也发挥着重要作用,这些ncRNA通过与蛋白质、DNA和RNA相互作用,在多个水平上调控基因表达。尽管目前对于ncRNA调控脂肪细胞增殖分化的研究已经取得了一定的进展,但其确切的分子机制仍有待进一步探索。

环状RNA(circular RNA, circRNA)是一类新发现的ncRNA,它们通过特殊的剪接过程形成,不具有5'到3'的极性,故而难以被核糖核酸酶降解。因此,相较于线性miRNA, circRNA具有更高的稳定性和组织特异性,这使得它们在基因表达调控中扮演着重要角色。circRNA的来源较为广泛,可由外显子、内含子等产生,不过多数circRNA是由多个外显子构成的^[5]。研究表明, circRNA可海绵吸附miRNA,参与miRNA的调控网络,影响基因的表达

和功能。此外, circRNA还可能通过与其他RNA分子或蛋白质相互作用,参与转录调控、转录后修饰以及蛋白质翻译等多个生物学过程^[6]。通过这些多种分子机制, circRNA介入到细胞的众多生理和病理过程中,涵盖细胞增殖、分化、凋亡以及代谢调控等多个方面^[7]。例如, circPPAR γ (circular peroxisome proliferator-activated receptor gamma)作为竞争性内源RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)吸附miR-92a-3p,促进脂肪细胞分化,抑制脂肪细胞增殖和凋亡^[8]; circRNF111可通过海绵吸附miR-143-3p,靶向调节*IGF2R*,影响AKT信号通路,进而抑制甘油三酯的沉积^[9]; mmu_circ_0001874可靶向miR-24-3p,调节*Igf2*的表达,进而影响下游PI3K-AKT-mTOR信号通路;此外, circ_0001874还可以结合蛋白Igf2bp2促进*Ucp1*表达,从而调控脂质代谢重编程,影响动物脂质沉积^[10]。这些研究成果提示 circRNA可能成为解析脂肪细胞代谢机制的新靶点和潜在治疗途径。虽然 circRNA在脂质代谢中的研究已取得一定进展,但仍有大量 circRNA的功能及其作用机制尚未明确。

猪脂肪组织中,皮下脂肪(subcutaneous fat, SC)与肌肉脂肪(intramuscular fat, IM)的发育特征具有显著区别。皮下脂肪主要负责能量储存,而肌肉脂肪则直接影响肉质的嫩度、风味和多汁性等关键特性。通过比较这两种脂肪组织中 circRNA的表达差异,不仅有助于揭示脂肪沉积的分子机制,还为优化猪的脂肪沉积、提高猪肉品质提供了理论依据。此外,由于猪与人在基因表达和生理结构上具有高度相似性,研究猪脂肪组织中 circRNA的功能及其调控机制,也可对人类肥胖及相关代谢疾病的治疗提供新的思路和潜在靶点。

本研究聚焦于 circHdgfrp3对3T3-L1前脂肪细胞成脂分化的影响及其作用机制。首先,基于猪与人在基因表达和生理结构上极度相似,因此我们对大白猪皮下脂肪和肌肉脂肪进行RNA-Seq测序,筛

选出差异表达较大的circRNA(circHdgfl3)。随后,经NCBI比对确定此circRNA在猪和鼠中具有高达93.87%的同源性,且源于小鼠胚胎的3T3-L1细胞系可以稳定传代并具有很好的向脂肪细胞分化的特异性,其细胞形态和生物性能都与体内脂肪细胞相似。所以后续功能研究以小鼠前脂肪细胞系3T3-L1为材料进行。运用RNase R消化法、核质定位法和qPCR法对circHdgfrp3进行鉴定、定位及表达量分析,明确其在细胞中的生物学特性。转染si-circHdgfrp3或pcDNA3.1-circHdgfrp3后,利用油红O染色和Western blot等生物技术,探究circHdgfrp3对胞内脂滴积累及成脂标志基因表达的影响,以解析其在成脂分化过程中的作用。同时,借助荧光素酶报告分析等技术,确定circHdgfrp3与miR-3089-3p、miR-760-5p的靶向结合关系,以及circHdgfrp3对AKT-mTOR信号通路的调控作用,进而确定circHdgfrp3在3T3-L1细胞脂质沉积中的调控机制,为深入理解脂质沉积相关的生物学过程提供理论依据,并为肥胖及相关代谢疾病的治疗开辟新的潜在治疗靶点与研究路径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 本实验室保存的3T3-L1细胞采用DMEM高糖培养基(含10%胎牛血清及1%青-链霉素双抗)进行培养。培养条件设定为37℃恒温、5%CO₂浓度的培养箱。细胞培养时每间隔48 h更换1次培养基,当细胞融合率达到80%至90%时,应进行细胞传代^[11]。

1.1.2 主要试剂和仪器 miR-3089-3p、miR-760-5p、miR-670-3p、miR-3102-3p.2-3p、miR-682和U6引物均购自广州锐博生物科技有限公司; circH-

dgfrp3小干扰RNA(si-circHdgfrp3)购自吉满生物有限公司; pcDNA3.1-NC和pcDNA3.1-circHdgfrp3购自汉恒生物有限公司; 脂质体 Lipofectamine 2000、Lipofectamine 3000、TRIzol试剂均购自Invitrogen公司; 新生牛血清购自依科赛生物科技(太仓)有限公司; 青-链霉素双抗、羊抗鼠和羊抗兔抗体均购自Biosharp公司; DMEM高糖培养基购自浙江百迪生物科技有限公司; RNase R试剂购自广州吉赛科技股份有限公司; 反转录试剂盒购自ThermoFisher Scientific公司; TaKaRa SYBR Premix EX Taq(Perfect Real time)购自TaKaRa公司; 双荧光素酶检测试剂盒购自Promega公司; BCA蛋白定量试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; GAPDH、过氧化酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ)、脂肪酸结合蛋白4(fatty acid binding protein 4, FABP4)、脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)和ATGL抗体均购自Abcam公司; p-AKT和AKT抗体购自CST公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及circRNA结构鉴定 通过NCBI下载circHdgfrp3全长序列信息,根据接口序列设计发散引物验证circHdgfrp3的存在,该引物后续可用于circHdgfrp3的qPCR检测,分析其在小鼠组织和细胞分化不同时期中的表达量。所有引物均使用Primer Premier 5.0以及NCBI的Primer Blast设计,引物信息见表1。引物由通用生物(安徽)股份有限公司合成。在37℃条件下,使用3 U/ μ g的RNase R对1 μ g总RNA进行10 min的消化处理,随后通过qPCR技术检测线性Hdgfrp3与circHdgfrp3的相对表达量。当3T3-L1细胞融合度至90%时,37℃使用胰酶消化50 s后进行核质分离,U6作为内参基因,qPCR分析。依

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	上游引物(5'→3') Upstream primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Downstream primer (5'→3')
Divergent primers	ACG CTG GCA ATG ACA CGA G	CTT GTT TGC TGG AGG CTT CAC
Convergent primers	CTG TGA AGC CTC CAG CAA AC	CGT GTT TCT CGT GTC ATT GC
miR-3089-3p	GCG AGC ATC TGC TGA TCC TG	AGT GCA GGG TCC GAG GTA TT
miR-682	CGC GCT GCA GTC ACA GTG A	AGT GCA GGG TCC GAG GTA TT
miR-760-5p	CCC CTC AGG CCA CCA GA	AGT GCA GGG TCC GAG GTA TT
miR-3102-3p.2-3p	GCG CTC TAC TCC CTG CCC	AGT GCA GGG TCC GAG GTA TT
miR-670-3p	GCG TTT CCT CAT ATC CAT TCA G	AGT GCA GGG TCC GAG GTA TT

据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算得出各样本的相对表达水平。

1.2.2 3T3-L1细胞诱导成脂分化 本实验室对3T3-L1前脂肪细胞予以冻存处理, 后续实验选取处于3~6代之间的细胞。当细胞融合度达到100%且接触抑制48 h后, 将基础培养基更换为诱导培养基(含10%胎牛血清的DMEM+10 μ mol/L胰岛素+0.5 mmol/L IBMX+1 μ mol/L DEX)诱导6天, 更换维持培养基(含10%胎牛血清的DMEM+10 μ mol/L胰岛素)诱导2天。

1.2.3 细胞转染 于12孔板中接种1 mL 3T3-L1细胞(3×10^4 个/孔), 培养24 h, 使用Lipofectamine 3000转染pcDNA3.1-NC和pcDNA3.1-circHdgfrp3, 再使用Lipofectamine 2000转染si-NC和si-circHdgfrp3, 结合混匀, 分别加至12孔板, 37 $^{\circ}$ C培养12 h后弃液, 加入完全培养基, 再37 $^{\circ}$ C培养24 h, qPCR检测细胞中的circHdgfrp3的表达量, 验证转染效率。

1.2.4 油红O染色 3T3-L1前体脂肪细胞诱导分化8天, 移除原有培养基后, PBS洗涤1次, 加入4%多聚甲醛固定液, 室温固定10 min。完成固定后, 用PBS漂洗细胞3次, 接着加入染色洗涤液覆盖细胞层, 静置20 s。移除洗涤液后, 加入预先过滤的油红O染色液, 进行30 min的染色处理。结束后, 弃去油红O染色液, 再次加入染色洗涤液洗涤20 s, 随后用PBS洗涤3次。最后, 在显微镜下观察并拍照记录。拍照完成后, 向样本中加入异丙醇进行10 min的萃取, 之后利用酶标仪在510 nm波长下测定其吸光度(D)值^[12]。

1.2.5 总RNA提取和qPCR 采用TRIzol裂解法从转染48 h和诱导8天的样品中提取RNA, 对提取RNA的浓度和质量进行测定。根据逆转录说明书将RNA逆转录成cDNA, 并将其储存于-20 $^{\circ}$ C条件下以备后续使用。这些cDNA将用于后续的qPCR实验, 以检测circHdgfrp3的过表达和干扰效率以及脂代谢标志基因的相对表达水平^[13]。

1.2.6 蛋白提取及Western blot实验 3T3-L1诱导分化第8天, PBS洗2次。加入完全蛋白裂解液, 冰上裂解30 min刮取细胞收集总蛋白样本。BCA法测定蛋白质浓度, 调整各样本至相同蛋白浓度。随后, 加入SDS上样缓冲液, 煮沸10 min, 于-80 $^{\circ}$ C保存。制备SDS-PAGE分离胶及浓缩胶。上样20 μ g蛋白样品, 100 V电泳2 h。4 $^{\circ}$ C、200 mA转移1.5 h, 将目标条带转移至PVDF膜上后, 室温下用5%浓度的脱脂牛奶溶液进行封闭处理2 h。随后, 一抗(1:1 000)稀释,

4 $^{\circ}$ C过夜孵育。TBST洗涤3次, 二抗(1:20 000)稀释, 室温封闭2 h, TBST缓冲液洗涤3次后加入发光液曝光, 曝光后的图像通过ImageJ软件分析灰度值。以GAPDH作为内参蛋白, 目标蛋白的灰度值/内参的灰度值所得结果即为该样本的目标蛋白表达水平。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验 StarBase软件预测circHdgfrp3可能靶向结合miR-3089-3p、miR-682、miR-760-5p。于96孔板中接种HEK293T细胞(3×10^4 个/孔), 培养24 h, 细胞融合度为70%, 使用Lipofectamine 3000试剂进行共转染。分为以下四组: psi-CHECK-2-circHdgfrp3和NC mimics组; psi-CHECK-2-circHdgfrp3和miR-682 mimics组; psi-CHECK-2-circHdgfrp3和miR-3089-3p mimics组; psi-CHECK-2-circHdgfrp3和miR-760-5p mimics组。转染后, 继续培养48 h。遵循双荧光素酶检测试剂盒的操作说明, 进行荧光素酶活性的量化分析, 选用海肾荧光素酶作为内部参照, 通过计算萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶的相对发光强度来评估细胞的荧光素酶活性^[14]。

1.2.8 数据分析 利用GraphPad Prism 8软件进行数据处理与图表制作, 实验所得结果展示为平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)的格式。统计显著性通过Student's t 检验来判定, 若 $P < 0.01$, 则认为差异极其显著; 若 $P < 0.05$, 则认为差异显著。

2 结果

2.1 circHdgfrp3验证及环化效率鉴定

猪肌肉脂肪细胞分化成脂能力显著弱于皮下脂肪细胞^[15], 我们通过RNA-Seq对比分析了大白猪IM脂肪细胞和SC脂肪细胞的circRNA表达谱, 筛选出了在IM脂肪细胞中高表达的环状RNA分子circHdgfrp3(图1A)。序列分析发现circHdgfrp3由Hdgfrp3基因的第2、3、4和5外显子拼接环化构成, 全长519 bp, 在猪和鼠中的同源性高达93.87%(图1B)。根据鼠源circHdgfrp3全长序列, 我们设计了收敛引物和发散引物。扩增结果显示, 收敛引物在cDNA和gDNA中均能扩增出清晰的单一条带; 而发散引物仅在cDNA中扩增出单一条带(图1C); 对发散引物扩增的产物进行了Sanger测序验证, 测序结果与GeneBank数据库序列一致(图1D)。利用3T3-L1细胞的总RNA进行RNase R消化实验, 发现线性Hdgfrp3含

量显著下降, circHdgfrp3的含量无明显变化(图1E)。以上结果表明 circHdgfrp3在3T3-L1前脂肪细胞中存在且具有反向剪切的环状结构。将3T3-L1细胞进行核质分离, 检测circHdgfrp3的表达情况, 结果显示 circHdgfrp3在细胞质中所占比例为92.8%(图1F), 此结果提示 circHdgfrp3主要存在于3T3-L1前脂肪细胞的细胞质中。

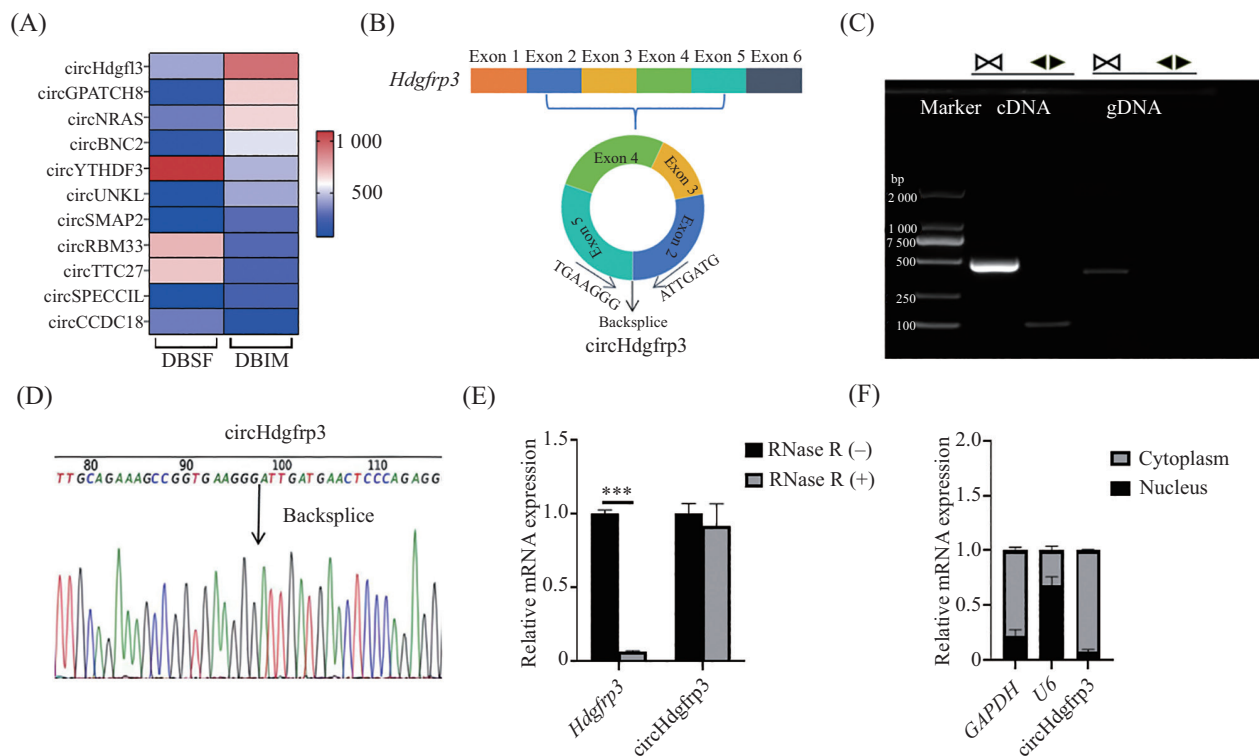
2.2 circHdgfrp3在小鼠组织以及3T3-L1成脂分化过程中的表达情况

利用 qPCR检测 circHdgfrp3在小鼠各组织及3T3-L1细胞分化不同时期中的表达量发现, circHdgfrp3在小鼠的肝组织中表达丰度最高, 其次是脾、肾周脂肪、心、皮下脂肪、肾和肺(图2A), circHdgfrp3的表达丰度在3T3-L1细胞诱导分化过程中呈现先升高后下降的趋势, 在诱导分化第2天的表达量最高(图2B)。

2.3 circHdgfrp3抑制3T3-L1前脂肪细胞的成脂分化

为研究 circHdgfrp3对3T3-L1成脂分化的影响, 根据 circHdgfrp3接口序列设计3对 siRNA, 转染48 h后, 检测 siRNA的干扰效率, 结果表明, si-circHdgfrp3-1、si-circHdgfrp3-2、si-circHdgfrp3-3的干扰效率分别为75%、35%、1%, 其中 si-circHdgfrp3-1干扰效率最大(图3A)。在后续实验中均用此 siRNA, 作为实验组。

在转染 si-circHdgfrp3并诱导分化8天后, 通过油红O染色检测脂滴聚集情况, 并通过收集总RNA检测脂代谢标志基因的表达丰度。结果显示, 与对照相比, si-circHdgfrp3组脂滴明显增多($P<0.05$, 图3B)。敲低 circHdgfrp3可显著增加 *PPAR γ* 、*CCAAT/增强子结合蛋白 α* (*CCAAT/enhancer-binding protein α* , *C/EBP α*)、*FABP4*和*ATGL* mRNA的表达水平($P<0.05$,

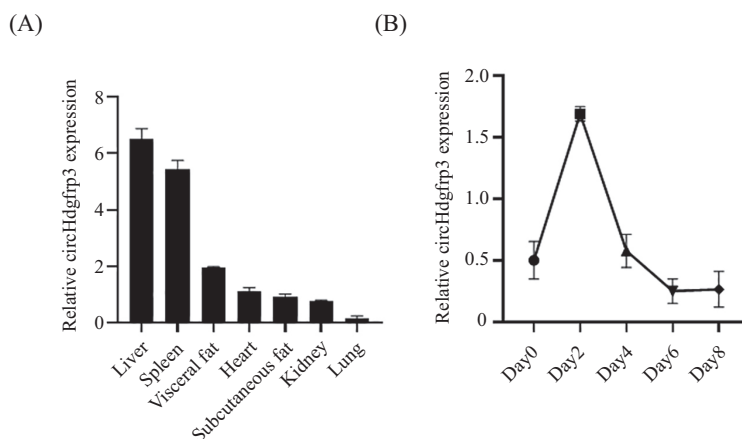


A: 大白猪肌肉内脂肪和皮下脂肪中circRNAs差异表达分析; B: circHdgfrp3的来源分析; C: circHdgfrp3发散引物和收敛引物在3T3-L1细胞的cDNA和gDNA中的表达; D: circHdgfrp3接口序列的Sanger测序结果; E: qPCR检测经RNase R消化后3T3-L1细胞中circHdgfrp3和Hdgfrp3 mRNA的表达水平; F: qPCR检测circHdgfrp3的亚细胞定位。n=3, *** $P<0.001$, 与NC组相比较。

A: an investigation was conducted to analyze the variations in the expression levels of circRNAs between intramuscular fat and subcutaneous fat tissues in Large White pigs; B: analysis of the origin of circHdgfrp3; C: expression of divergent primers and convergent primers of circHdgfrp3 in the cDNA and gDNA of 3T3-L1 cells; D: Sanger sequencing results of the junction sequence of circHdgfrp3; E: detection of the expression levels of circHdgfrp3 and Hdgfrp3 mRNA in 3T3-L1 cells after digestion with RNase R by qPCR; F: detection of the subcellular localization of circHdgfrp3 by qPCR. n=3, *** $P<0.001$ compared with the NC group.

图1 circHdgfrp3验证及环化效率鉴定

Fig.1 Verification of circHdgfrp3 and identification of its circularization efficiency

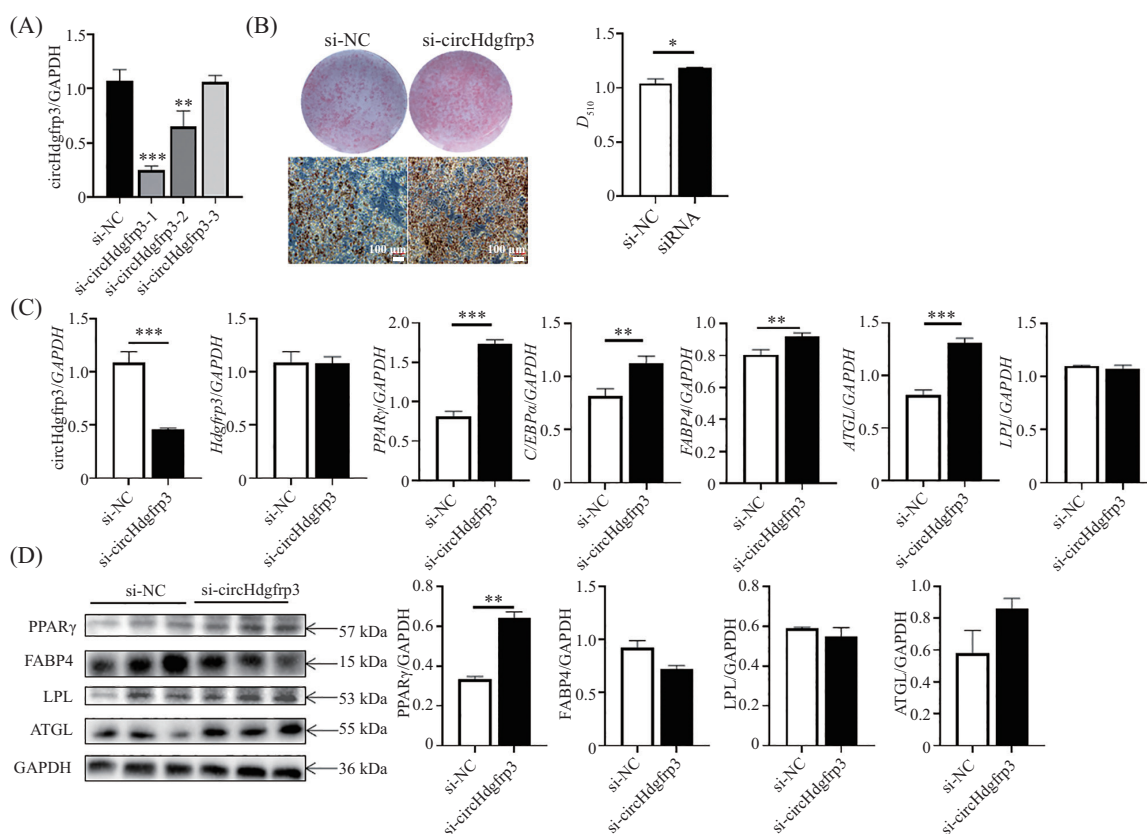


A: qPCR检测circHdgrp3在小鼠各组织中的表达水平; B: qPCR检测circHdgrp3在3T3-L1细胞分化不同时期的表达水平。

A: the expression levels of circHdgrp3 across diverse mouse tissues were quantified using qPCR; B: the expression levels of circHdgrp3 during different stages of differentiation in 3T3-L1 cells were quantified using qPCR.

图2 circHdgrp3在小鼠不同组织和3T3-L1分化不同阶段中的表达量

Fig.2 The expression of circHdgrp3 was examined across diverse mouse tissues and during different stages of 3T3-L1 cell differentiation

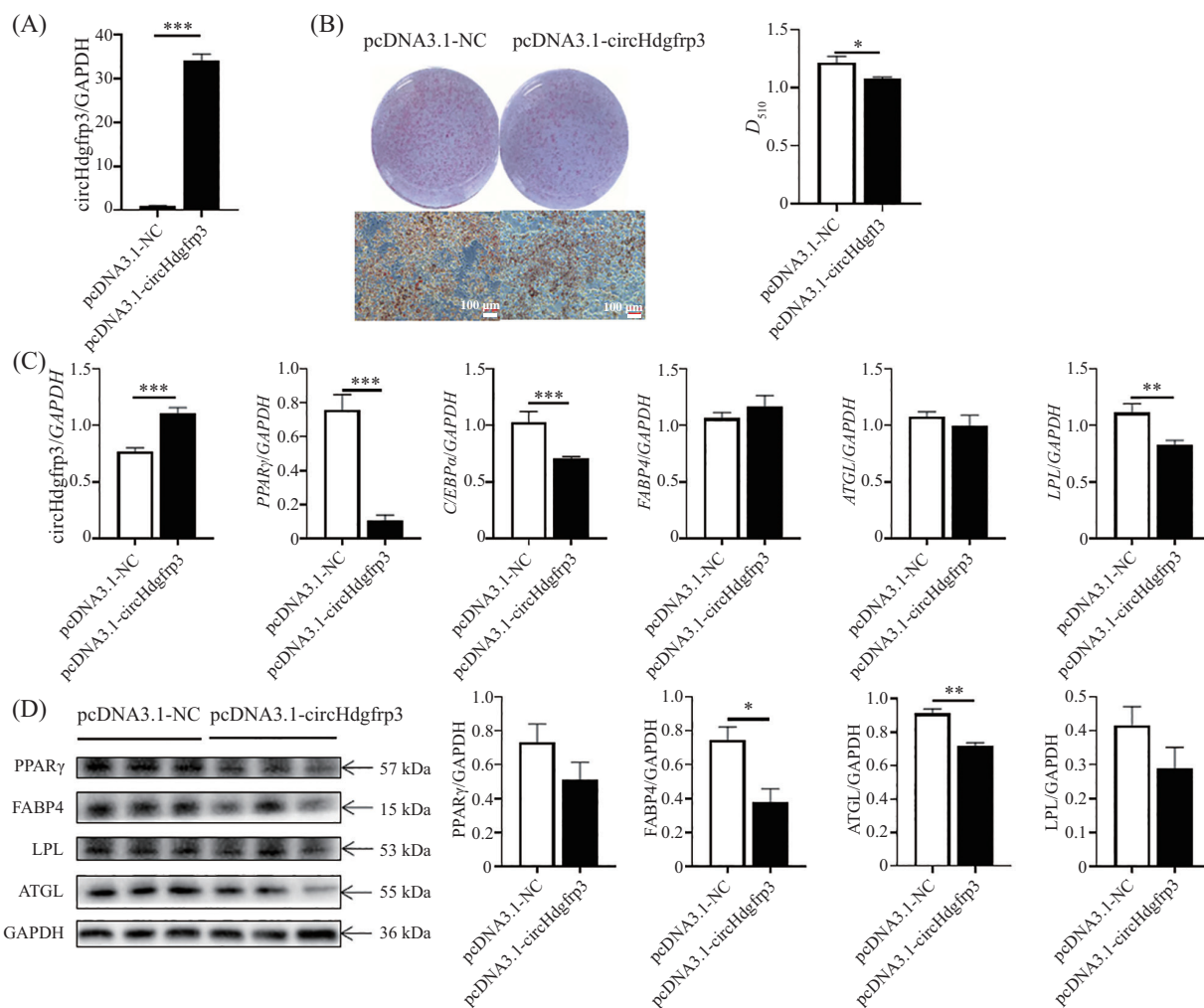


A: qPCR检测circHdgrp3干扰效率; B: 油红O染色检测转染si-circHdgrp3后3T3-L1诱导分化8天脂滴聚集情况; C: qPCR检测转染si-circHdgrp3后对成脂标志基因PPARγ、C/EBPα、FABP4、ATGL和LPL的mRNA表达水平的影响; D: Western blot检测转染si-circHdgrp3对成脂标志基因PPARγ、FABP4、LPL和ATGL蛋白表达水平的影响。n=3, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

A: qPCR was used to assess the knockdown efficiency of circHdgrp3; B: oil red O staining was employed to examine the lipid droplet accumulation in 3T3-L1 cells after 8 days of differentiation following transfection with si-circHdgrp3; C: qPCR was performed to determine the effects of si-circHdgrp3 transfection on the mRNA expression levels of adipogenic marker genes PPARγ, C/EBPα, FABP4, ATGL and LPL; D: Western blot analysis was conducted to evaluate the effects of si-circHdgrp3 transfection on the protein expression levels of adipogenic marker genes PPARγ, FABP4, LPL, and ATGL. n=3, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

图3 干扰circHdgrp3促进3T3-L1成脂分化

Fig.3 Interference of circHdgrp3 promoted the adipogenic differentiation of 3T3-L1



A: qPCR检测pcDNA3.1-circHdgrp3过表达效率; B: 油红O染色检测转染pcDNA3.1-circHdgrp3后3T3-L1诱导分化8天脂滴聚集情况; C: qPCR检测转染pcDNA3.1-circHdgrp3后对成脂标志基因PPAR γ 、C/EBP α 、FABP4、ATGL和LPL的mRNA表达水平的影响; D: Western blot检测转染pcDNA3.1-circHdgrp3后对成脂标志基因PPAR γ 、FABP4、LPL和ATGL蛋白表达水平的影响。n=3, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001。

A: the efficiency of overexpression for pcDNA3.1-circHdgrp3 was evaluated using qPCR; B: oil red O staining was employed to examine the lipid droplet accumulation in 3T3-L1 cells after 8 days of differentiation following transfection with pcDNA3.1-circHdgrp3; C: the impact on the mRNA expression levels of adipogenic marker genes, including PPAR γ , C/EBP α , FABP4, ATGL and LPL, were quantified using qPCR; D: Western blot was utilized to assess the changes in protein expression of adipogenic markers PPAR γ , FABP4, LPL and ATGL following transfection with pcDNA3.1-circHdgrp3. n=3, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

图4 过表达circHdgrp3抑制3T3-L1成脂分化

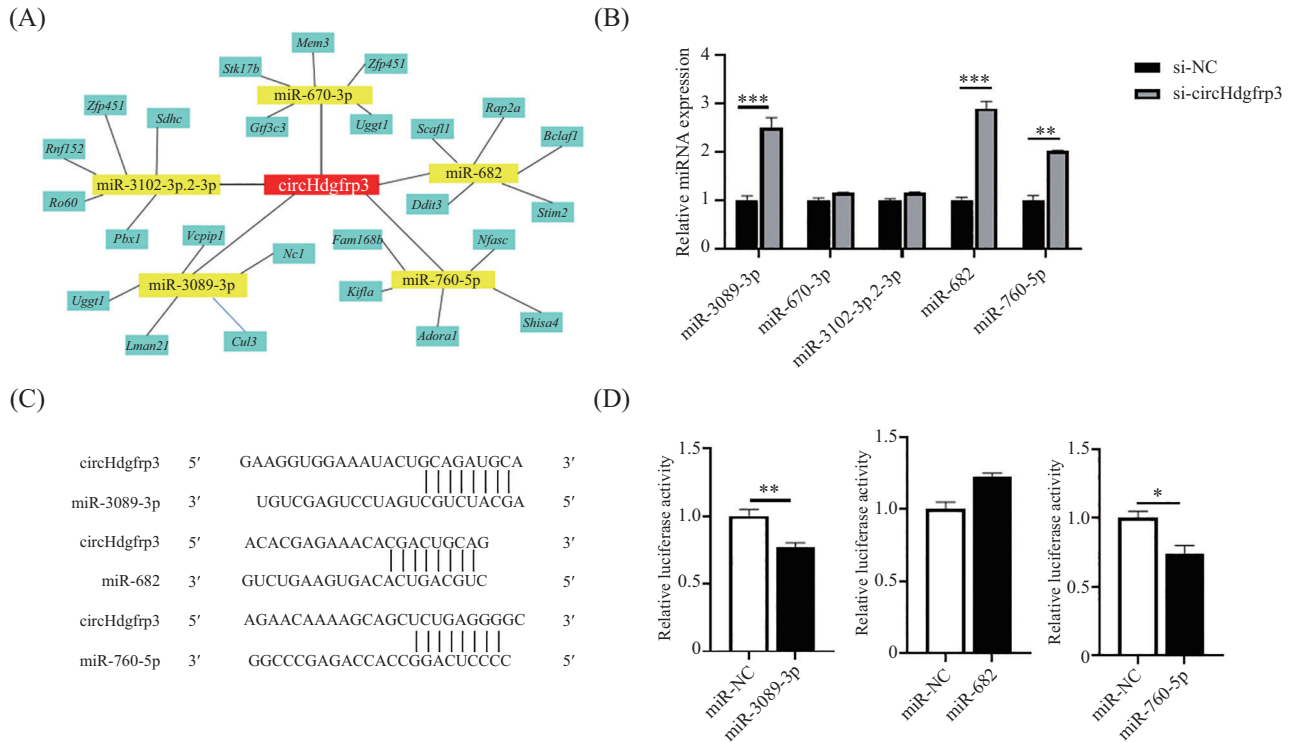
Fig.4 Overexpression of circHdgrp3 inhibited the adipogenic differentiation of 3T3-L1

图3C), 且PPAR γ 的蛋白表达水平也显著增加(图3D)。

为了验证上述结果, 在3T3-L1细胞中转染pcDNA3.1-circHdgrp3, 并检测其超表达效率, 结果表明pcDNA3.1-circHdgrp3组中circHdgrp3的表达量是pcDNA3.1-NC组的34倍(P <0.05, 图4A)。过表达circHdgrp3可显著抑制细胞内脂滴的积累(P <0.05, 图4B)和成脂标志基因PPAR γ 、C/EBP α 和LPL的mRNA表达水平(图4C), FABP4和ATGL的蛋白表达水平也显著降低(P <0.05, 图4D)。

2.4 circHdgrp3靶向结合 miR-3089-3p、miR-760-5p

为探究circHdgrp3靶向结合的miRNA, 利用starBase数据库预测显示miR-682、miR-3089-3p、miR-760-5p、miR-3102-3p.2-3p和miR-670-3p可能是circHdgrp3的潜在靶点(图5A)。敲低circHdgrp3后, miR-682、miR-3089-3p和miR-760-5p的表达水平显著升高(P <0.05, 图5B)。为了验证circHdgrp3是否直接靶向miR-682、miR-3089-3p和miR-760-5p, 用psi-CHECK-2-circHdgrp3与miR-682 mimics、miR-



A: Starbase在线网站预测 circHdgfrp3靶向 miRNA; B: qPCR检测干扰 circHdgfrp3后对靶向 miRNA 的表达水平的影响; C: circHdgfrp3与 miR-3089-3p、miR-682和miR-760-5p互补的核苷酸序列; D: miR-NC、miR-3089-3p、miR-682、miR-760-5p分别与psi-CHECK-2-circHdgfrp3共转染 HEK293T细胞后双荧光素酶活性检测; $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ 。

A: the Starbase online website was used to predict the miRNAs targeted by circHdgfrp3; B: qPCR analysis was utilized to assess the alterations in the expression profiles of targeted miRNAs after interference with circHdgfrp3; C: the nucleotide sequences of circHdgfrp3 that were complementary to miR-3089-3p, miR-682 and miR-760-5p; D: dual-luciferase activity detection after co-transfecting HEK293T cells with miR-NC, miR-3089-3p, miR-682, miR-760-5p and psi-CHECK-2-circHdgfrp3. $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

图5 circHdgfrp3对miR-3089-3p和miR-760-5p的靶向调控

Fig.5 The targeted regulation of circHdgfrp3 on miR-3089-3p and miR-760-5p

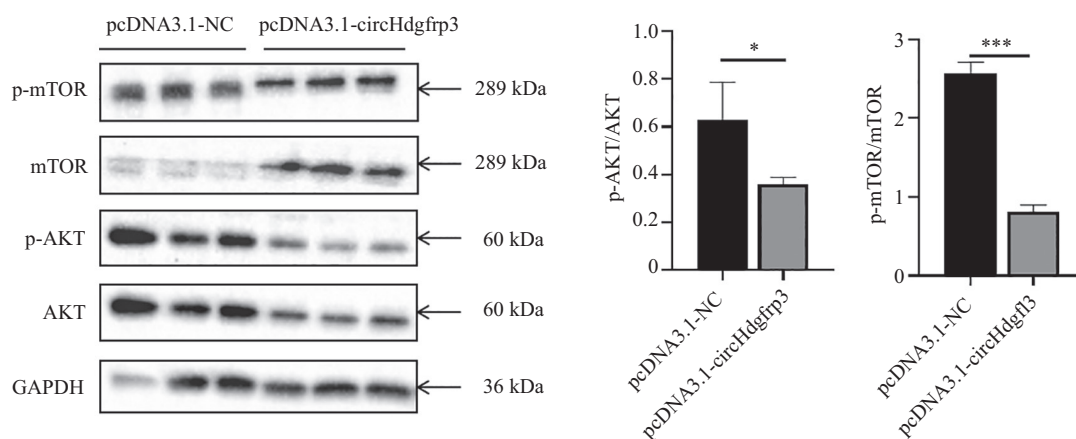
3089-3p mimics、miR-760-5p mimics、NC mimics共转染 HEK293T细胞, 48 h后检测荧光素酶的表达量变化。结果显示, psi-CHECK-2-circHdgfrp3与 miR-3089-3p mimics组、psi-CHECK-2-circHdgfrp3与 miR-760-5p mimics组的海肾荧光强度与萤火虫荧光强度的比值显著降低($P<0.05$, 图5C和图5D)。这说明 circHdgfrp3靶向结合 miR-3089-3p和 miR-760-5p。

2.5 circHdgfrp3对信号通路的调控作用

PI3K/AKT信号通路在脂肪细胞的增殖分化、凋亡代谢过程中扮演着重要的角色, 在3T3-L1前脂肪细胞转染pcDNA3.1-circHdgfrp3后, 诱导成脂8天, 检测细胞内 AKT、p-AKT的蛋白表达水平。结果表明, 与pcDNA3.1-NC组相比, 过表达 circHdgfrp3会显著降低 AKT的磷酸化水平($P<0.05$, 图6), 提示 circHdgfrp3可能通过降低 AKT信号通路的活性, 抑制3T3-L1前脂肪细胞的成脂分化。

3 讨论

脂肪组织不仅是脂质形式过剩能量的储存场所, 也是在代谢稳态中起核心作用的内分泌器官。脂肪组织质量的过度膨胀是肥胖和相关并发症(如2型糖尿病、高脂血症和动脉粥样硬化)的主要驱动力^[16]。因此, 探索脂肪细胞增殖和分化的分子机制对于发现肥胖及其相关代谢紊乱的新治疗方法至关重要。脂肪细胞的增殖和分化, 也被称为脂肪生成和脂肪沉积, 是一个复杂的生物学过程, 受到多种转录因子(TF)、信号通路、表观遗传修饰和非编码RNA(ncRNA)的调控^[17-18]。ncRNA中的环状RNA(circRNA)在近年来逐渐成为脂肪细胞分化与代谢研究领域的焦点, 诸多研究表明其在这一过程中发挥着重要的调节作用。例如, 在人正常肝细胞系LO2中敲低 circACC1会使脂质含量升高, 过表达则脂质含量降低, 其可通过增强 AMPK的活性, 促进糖酵解和脂肪酸的氧化来调控脂质代谢^[19]。本



$n=3$, * $P<0.05$, *** $P<0.001$.

图6 circHdgfrp3对AKT-mTOR信号通路的调控

Fig.6 The regulation of circHdgfrp3 on the AKT-mTOR signaling pathway

研究基于对大白猪皮下脂肪和肌内脂肪的高通量测序数据分析,筛选出差异最显著的circRNA,即circHdgfrp3。经NCBI数据库比对,发现其在猪和小鼠中具有高达93.87%的同源性,进而将其确定为circHdgfrp3(mmu_circ_0001589)。但迄今为止关于circHdgfrp3在脂质沉积中的作用及机制尚无报道,因此本研究选用了3T3-L1细胞系来研究circHdgfrp3在脂质沉积中的作用及机制。

本研究通过发散引物扩增产物进行Sanger测序,结果与NCBI上序列比对一致,证明该circRNA的存在。经过RNase R消化后, circHdgfrp3的表达量不变,线性Hdgfrp3的表达量显著下降,这与此前报道的circRNA对RNase R具有耐受性的特性相符^[20],进一步证实了circHdgfrp3是以环状结构的形式存在的。通过qPCR结果发现circHdgfrp3在3T3-L1细胞诱导分化的第2天表达量达到峰值,随着诱导天数的增加而逐渐下降,推测circHdgfrp3可能在脂肪分化早期影响脂肪分化标志基因PPAR γ 和C/EBP α 的表达,进而参与3T3-L1成脂分化的过程。

脂肪细胞的分化受到一系列转录因子和基因的密切调控,包括过氧化酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)、CCAAT/增强子结合蛋白 α (C/EBP α)、C/EBP β 。C/EBP属于碱性亮氨酸拉链转录因子大家族,包括A/ α 、B/ β 、G/ γ 、D/ δ 、E/ ϵ 和Z/ ζ 成员^[21-23]。在这些转录因子中C/EBP β 和C/EBP γ 的水平在早期脂肪生成过程中增加,然后其通过与启动子结合激活C/EBP α 和PPAR γ 的表达^[24-25]。这些分子相

互作用,共同调节下游基因的表达,如脂蛋白脂肪酶(LPL)、脂联素(adiponectin)和脂肪酸结合蛋白4(FABP4)。这些下游基因在脂肪细胞的功能和特性方面发挥着不可或缺的作用,LPL是人类体内的一种关键酶,它为外周组织提供燃料。LPL水解血液中循环的脂蛋白核心中的甘油三酯,并与受体相互作用以介导脂蛋白的摄取,从而通过催化和非催化功能指导脂质的分布^[26]。Adiponectin通过激活AMPK和PPAR α 信号通路,促进脂肪酸的氧化分解,从而减少体内脂肪的积累^[27]。FABP4通过激活激素敏感性脂肪酶(hormone-sensitive lipase, HSL)等脂肪分解相关酶,促进脂肪细胞分化后的脂肪分解^[28]。本研究结果显示过表达circHdgfrp3会显著降低PPAR γ 、C/EBP α 和LPL的表达水平,敲低circHdgfrp3会促进脂滴集聚同时也会显著增加PPAR γ 、C/EBP α 、FABP4和ATGL的表达水平,提示circHdgfrp3可能通过调控这些成脂标志基因的表达进而抑制3T3-L1的成脂分化过程。

以往研究发现, circRNA主要以miRNA的分子海绵的作用方式发挥功能^[29],如circARF3通过靶向miR-103/TRAF3抑制脂肪组织中线粒体自噬介导的炎症^[30]; circ-PLXNA1通过miR-214/CTNBN1轴促进鸭脂肪细胞成脂分化^[31]。本研究通过干扰circHdgfrp3后,利用qPCR检测靶向miRNA的表达量,并借助双荧光素酶报告基因实验,成功验证了circHdgfrp3与miR-3089-3p、miR-760-5p之间存在靶向结合关系。有研究发现,瓜拉那通过抑制mmu-miR-760-

5p的表达和促进 β -catenin的核转移从而抑制3T3-L1细胞脂肪生成^[32]。这提示circHdgfrp3可能通过靶向结合miR-760-5p进而抑制3T3-L1成脂分化。

PI3K/AKT信号通路作为一种关键的细胞信号转导级联,在调控细胞生长、增殖及分化等多个生理过程中发挥着重要作用^[33]。此通路的启动依赖于磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)的活化,进而催化生成次级信号分子磷脂酰肌醇3,4,5-三磷酸(phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, PIP3),PIP3随后激活蛋白激酶B(protein kinase B, 也称为AKT),AKT磷酸化在调控细胞代谢和细胞凋亡过程中,涉及多个下游靶标^[34-35]。已有研究发现脂质沉积与AKT信号通路之间存在着紧密的联系,AKT信号通路的活化能够驱动前脂肪细胞向成熟脂肪细胞的分化进程,这是通过激活各种参与成脂的转录因子和信号通路实现的,如PPAR γ 和C/EBP α ^[36]。AKT的活化能够引发mTOR的磷酸化并进而激活它,而mTOR作为细胞生长与代谢的核心调控因子可以通过增强脂质合成酶(fatty acid synthase, FASN)和乙酰辅酶A羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)的翻译能力来促进脂质合成^[37]。本研究发现在过表达circHdgfrp3后,p-AKT的水平显著下降,提示circHdgfrp3可能通过抑制AKT-mTOR信号通路的活性进而抑制3T3-L1脂肪细胞分化。

综上所述,本研究发现circHdgfrp3能够靶向结合miR-3089-3p和miR-760-5p,下调AKT-mTOR信号通路活性,抑制3T3-L1前脂肪细胞的成脂分化。这些发现为深入理解猪皮下与肌肉脂肪组织的发育特征差异提供了新的分子视角,同时也为利用circRNA调控脂肪沉积开辟了潜在途径。

参考文献 (References)

- [1] JUNG U J, CHOI M S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(4): 6184-223.
- [2] GREGOIRE F M, SMAS C M, SUL H S. Understanding adipocyte differentiation [J]. *Physiol Rev*, 1998, 78(3): 783-809.
- [3] MORIGNY P, BOUCHER J, ARNER P, et al. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17(5): 276-95.
- [4] KHEZRI M R, JAFARI R, YOUSEFI K, et al. The PI3K/AKT signaling pathway in cancer: molecular mechanisms and possible therapeutic interventions [J]. *Exp Mol Pathol*, 2022, 127: 104787.
- [5] MISIR S, WU N, YANG B B. Specific expression and functions of circular RNAs [J]. *Cell Death Diff*, 2022, 29(3): 481-91.
- [6] 王嵩, 黄思捷, 邵庆, 等. circRNA-miRNA-mRNA调节网络在疾病研究中的进展[J]. 蚌埠医学院学报(WANG S, HUANG S J, XI Q, et al. Progress in the study of circRNA-miRNA-mRNA regulatory networks in disease research [J]. *Journal of Bengbu Medical College*), 2021, 46(12): 1801-4.
- [7] CHEN L L. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(8): 475-90.
- [8] WU J, ZHANG S, YUE B, et al. CircRNA profiling reveals CircPPAR γ modulates adipogenic differentiation via sponging miR-92a-3p [J]. *J Agr Food Chem*, 2022, 70(22): 6698-708.
- [9] LIN X, DU Y, LU W, et al. CircRNF111 protects against insulin resistance and lipid deposition via regulating miR-143-3p/IGF2R axis in metabolic syndrome [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 663148.
- [10] SHAO J, WANG M, ZHANG A, et al. Interference of a mammalian circRNA regulates lipid metabolism reprogramming by targeting miR-24-3p/Igf2/PI3K-AKT-mTOR and Igf2bp2/Ucp1 axis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2023, 80(9): 252.
- [11] 郑诚, 东方阳, 程蕾, 等. miR-29家族通过AKT/mTOR信号通路抑制结肠癌MC38细胞的增殖、迁移和侵袭[J]. 中国细胞生物学学报(ZHENG C, DONGFANG Y, CHENG L, et al. The miR-29 family inhibits proliferation, migration, and invasion of colon cancer MC38 Cells via the AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2022, 44(5): 798-806.
- [12] 毋文静, 刘铀, 张平平, 等. 猪前脂肪细胞分化过程中RETN基因的表达[J]. 中国兽医科学(WU W J, LIU Y, ZHANG P P, et al. Expression of RETN gene during porcine pre-adipocyte differentiation [J]. *Veterinary Science in China*), 2011, 41(10): 1052-5.
- [13] 周兵勇, 黄鑫, 徐珂, 等. 可乐代替饮用水对小鼠健康的影响[J]. 中国细胞生物学学报(ZHOU B Y, HUANG X, XU K, et al. Effects of Cola as the only drinking liquid on mice health [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2020, 42(6): 988-96.
- [14] 刘可可, 钟洁, 李红强, 等. 猪脂肪酸结合蛋白4启动子的克隆及转录活性分析[J]. 中国细胞生物学学报(LIU K K, ZHONG J, LI H Q, et al. Cloning and transcriptional activity analysis of the porcine fatty acid-binding protein 4 (FABP4) promoter [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2022, 44(2): 283-9.
- [15] ZHANG D W, WU W J, HUANG X, et al. Comparative analysis of gene expression profiles in differentiated subcutaneous adipocytes between Jiaying Black and Large White pigs [J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 1-14.
- [16] LONGO M, ZATTERALE F, NADERI J, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9): 2358.
- [17] RU W, ZHANG S, LIU J, et al. Non-coding RNAs and adipogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(12): 9978.
- [18] 卢春丽, 马燕芬, 马云. CircRNA在动物脂质代谢中的调控作用[J]. 生命科学(HU C L, MA Y F, MA Y. The regulatory role of circRNA in lipid metabolism in animals [J]. *Life Sciences*), 2023, 35(6): 790-8.
- [19] LI Q, WANG Y, WU S, et al. CircACC1 regulates assembly and activation of AMPK complex under metabolic stress [J]. *Cell Metab*, 2019, 30(1): 157-73.e7.
- [20] SUZUKI H, ZUO Y, WANG J, et al. Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circu-

- lar RNAs from pre-mRNA splicing [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(8): e63.
- [21] CHO W, KIM S Y, JEONG M, et al. Shockwaves suppress adipocyte differentiation via decrease in PPAR γ [J]. Cells, 2020, 9(1): 166.
- [22] GUO L, LI X, TANG Q Q. Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: a central role for CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β [J]. J Biol Chem, 2015, 290(2): 755-61.
- [23] LEE J E, SCHMIDT H, LAI B, et al. Transcriptional and epigenomic regulation of adipogenesis [J]. Mol Cell Biol, 2019, 39(11): e00601-18.
- [24] ROSEN E D, HSU C H, WANG X, et al. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway [J]. Genes Dev, 2002, 16(1): 22-6.
- [25] LEFTEROVA M I, ZHANG Y, STEGER D J, et al. PPAR γ and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale [J]. Genes Dev, 2008, 22(21): 2941-52.
- [26] WHELESS A, GUNN K H, NEHER S B. Macromolecular interactions of Lipoprotein lipase (LPL) [J]. Subcell Biochem, 2024, 104: 139-79.
- [27] 郑言, 曹中赞, 邱云桥, 等. 脂联素与其受体的结构及在脂类代谢中的作用机制[J]. 动物营养学报(ZHENG Y, CAO Z Z, QIU Y Q, et al. Structure of adiponectin and their receptors and action mechanisms in lipid metabolism [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition), 2022, 34(6): 3503-10.
- [28] FURUHASHI M, SAITOH S, SHIMAMOTO K, et al. Fatty acid-binding protein 4 (FABP4): pathophysiological insights and potent clinical biomarker of metabolic and cardiovascular diseases [J]. Clin Med Insights Cardiol, 2015, 8(Suppl 3): 23-33.
- [29] HWANG H J, KIM Y K. Molecular mechanisms of circular RNA translation [J]. Exp Mol Med, 2024, 56(6): 1272-80.
- [30] ZHANG Z, ZHANG T, FENG R, et al. circARF3 alleviates mitophagy-mediated inflammation by targeting miR-103/TRAFF3 in mouse adipose tissue [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 14: 192-203.
- [31] WANG L, LIANG W, WANG S, et al. Circular RNA expression profiling reveals that circ-PLXNA1 functions in duck adipocyte differentiation [J]. PLoS One, 2020, 15(7): e0236069.
- [32] LIMA N S, NUMATA E P, MESQUITA L M S, et al. Modulatory effects of guarana (*Paullinia cupana*) on adipogenesis [J]. Nutrients, 2017, 9(6): 635.
- [33] YU J S L, CUI W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination [J]. Development, 2016, 143(17): 3050-60.
- [34] OSAKI M, OSHIMURA M, ITO H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer [J]. Apoptosis, 2004, 9: 667-76.
- [35] HE Y, SUN M M, ZHANG G G, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 425.
- [36] SU W Y, TIAN L Y, GUO L P, et al. PI3K signaling-regulated metabolic reprogramming: from mechanism to application [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2023, 1878(5): 188952.
- [37] LIU D D, HAN C C, WAN H F, et al. Effects of inhibiting PI3K-Akt-mTOR pathway on lipid metabolism homeostasis in goose primary hepatocytes [J]. Animal, 2016, 10(8): 1319-27.