

· 基础实验研究论著 ·

# 游离脂肪酸对 HepG2 细胞及 HPA-v 成熟脂肪细胞 miRNA-143 表达的影响

王秀芳<sup>1,2</sup>, 张向君<sup>3</sup>, 徐广峰<sup>2</sup>, 张乃键<sup>1,2</sup>, 赵超<sup>2</sup>, 赵亚萍<sup>1,2△</sup>

(1. 蚌埠医学院医学检验系, 安徽蚌埠 233030; 2. 中国人民解放军第八二医院检验科, 江苏淮安 223001; 3. 蚌埠医学院第一附属医院感控科, 安徽蚌埠 233030)

**摘要:**目的 探讨游离脂肪酸(FFA)对人肝癌 HepG2 细胞及 HPA-v 成熟脂肪细胞 miRNA-143 表达的影响。方法 体外培养 HepG2 细胞及人前体脂肪细胞 HPA-v, 将 HPA-v 前体脂肪细胞诱导分化为成熟脂肪细胞。用 1 mmol/L FFA 分别干预 HepG2 细胞及 HPA-v 成熟脂肪细胞 0、4、12、24 h, 采用实时定量逆转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)技术检测细胞 miRNA-143 的表达水平。**结果** 随 FFA 干预时间的延长, HepG2 细胞 miRNA-143 表达增高( $P < 0.05$ ), HPA-v 成熟脂肪细胞中 miRNA-143 的表达降低( $P < 0.05$ )。**结论** FFA 对 HepG2 细胞及 HPA-v 成熟脂肪细胞 miRNA-143 表达具有不同的调节作用。

**关键词:** 脂肪酸类; 脂肪细胞; HepG2; miRNA-143

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)23-3110-02

## Effects of free fatty acid on miRNA-143 expression in HepG2 cells and HPA-v mature adipocytes

Wang Xiufang<sup>1,2</sup>, Zhang Xiangjun<sup>3</sup>, Xu Guangfeng<sup>2</sup>, Zhang Naijian<sup>1,2</sup>, Zhao Chao<sup>2</sup>, Zhao Yaping<sup>1,2△</sup>

(1. Department of Medical Laboratory Science, Benbu Medical College, Benbu, Anhui 233030, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the 82nd Hospital of Chinese People's Liberation Army, Huaian, Jiangsu 223001, China; 3. Department of Infection Control, the First

Affiliated Hospital of Benbu Medical College, Benbu, Anhui 233030, China)

**Abstract: Objective** To explore the effects of free fatty acid(FFA) on miRNA-143 expression in human hepatoma HepG2 cells and HPA-v mature adipocytes. **Methods** HepG2 cells and human HPA-v preadipocytes were cultured *in vitro*. HPA-v preadipocytes were induced to differentiate into mature adipocytes. HepG2 cells and HPA-v mature adipocytes were treated with 1 mmol/L FFA for 0, 4, 12, 24 h, respectively. Quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction(qRT-PCR) technique was used to detect cellular miRNA-143 expression levels. **Results** miRNA-143 expression increased in HepG2 cells( $P < 0.05$ ) and decreased in HPA-v mature adipocytes( $P < 0.05$ ) with extension of FFA treatment time. **Conclusion** FFA shows different regulative roles on miRNA-143 expression in HepG2 cells and HPA-v mature adipocytes.

**Key words:** fatty acids; adipocytes; HepG2; miRNA-143

肥胖是一种以体脂过度堆积及异常分布为主要特征的内分泌代谢性疾病, 脂质代谢紊乱是其发病的核心环节<sup>[1]</sup>。本课题组前期工作发现, 作为成脂密切相关的 miRNA, miRNA-143 在 ob/ob 肥胖小鼠内脏脂肪组织中低表达, 而于肝脏组织中高表达, 提示 miRNA-143 参与了 ob/ob 小鼠肥胖及脂质代谢紊乱的发生<sup>[2]</sup>。为深入探讨高脂环境对 miRNA-143 表达水平的直接影响, 本研究以人肝癌 HepG2 细胞及人 HPA-v 成熟脂肪细胞作为研究工具, 采用游离脂肪酸(free fatty acid, FFA) 1 mmol/L 进行体外干预<sup>[3]</sup>, 以观察 FFA 对上述细胞中 miRNA-143 表达水平是否存在调控作用。

### 1 材料与与方法

**1.1 材料** 人肝癌 HepG2 细胞株购自美国模式培养物集存库, 人 HPA-v 前体脂肪细胞株购自美国 Sciencell 公司, DMEM 培养液、胎牛血清购自美国 Gibco 公司, 地塞米松、重组人胰岛素、3-异丁甲基黄嘌呤(MIX)、二甲亚砜购自美国 Sigma 公司, 油红“O”染料购自上海化学试剂厂, MiRNeasy 总 RNA 抽提试剂购自德国 QIAGEN 公司, miRNA 逆转录试剂、TaqMan MiRNA Assay 试剂购自美国 ABI 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 HPA-v 前体脂肪细胞的培养与诱导分化** HPA-v 前

体脂肪细胞于 10% 胎牛血清(FBS)完全培养液在 37 ℃ 培养箱中培养, 每 2 天换液 1 次。待细胞生长至完全融合时(第 0 天)开始诱导分化, 培养液换用含 0.5 mmol/L MIX、1 μmol/L 地塞米松、1 μmol/L 罗格列酮和 5 μg/mL 胰岛素的完全培养液。96 h 后撤去其他诱导剂, 使培养液中只含有 5 μg/mL 胰岛素, 以后每 2 天换液 1 次, 至第 17 天, 经油红“O”染色法鉴定, 约 90% 以上细胞分化为成熟脂肪细胞后进行后续试验。

**1.2.2 FFA 的干预** 将 HepG2 细胞及 HPA-v 成熟脂肪细胞的培养液更换为含 1 mmol/L 混合 FFA(月桂酸、肉豆蔻酸、亚油酸、油酸、花生四烯酸)的培养液进行干预, 分别于第 0、4、12、24 h 收集细胞, 以观察 FFA 干预不同时间对 HepG2 细胞及 HPA-v 成熟脂肪细胞中 miRNA-143 表达的影响。

**1.2.3 miRNA-143 表达水平检测** 采用 Trizol 法提取总 RNA, 通过比较 28 S 与 18 S 两条带, 分析其完整性, 同时运用 Quawell Q5000 紫外分光光度仪进行纯度分析和定量, 要求  $A_{260}/A_{280}$  值为 1.8 ~ 2.0。根据逆转录试剂盒操作说明, 将 RNA 逆转录成 cDNA。使用实时定量逆转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)技术检测 miRNA-143 含量。选择 sno234 为内参照, 应用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算目的基因的相对含量<sup>[4]</sup>。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 计

量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间均数比较采用方差分析, Fisher 精确检验后, 进一步采用  $q$  检验进行组间两两比较, 以  $\alpha = 0.05$  为检验水准, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 HPA-v 脂肪细胞诱导分化前、后的形态变化及鉴定** 在倒置显微镜下观察 HPA-v 前体脂肪细胞诱导分化前、后的形态变化, HPA-v 前体脂肪细胞贴壁后呈梭形的成纤维细胞形态; 加入诱导分化试剂后第 17 天时约有 80% 以上的细胞胞内积有脂滴, 用油红“O”染色着红色, 提示这些细胞已分化为成熟脂肪细胞。

**2.2 FFA 对 HepG2 细胞中 miRNA-143 表达的影响** qRT-PCR 检测发现, 1 mmol/L 混合 FFA 干预 HepG2 细胞 4 h, 细胞中 miRNA-143 的表达水平明显高于与未干预组比较, 明显增高 ( $P < 0.05$ )。但随干预时间延长, 其上调作用有下降的趋势, 干预至 24 h, HepG2 细胞中 miRNA-143 的表达水平显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.3 FFA 对 HPA-v 成熟脂肪细胞中 miRNA-143 表达的影响** FFA 干预 HPA-v 成熟脂肪细胞 4 h, miRNA-143 的表达水平呈下降趋势, 且随干预时间延长, 该基因表达逐渐降低, 呈时间依从性。干预至 24 h, HPA-v 成熟脂肪细胞中 miRNA-143 的表达水平与未干预组比较, 显著降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨 论

FFA 来源于脂肪组织中的三酰甘油, 生理浓度下可通过  $\beta$  氧化释放大量能量, 向骨骼肌、肝脏和心肌等重要组织器官提供基础能量, 是人体重要的能源物质之一<sup>[5]</sup>。肥胖, 尤其是腹型肥胖者, 常伴有脂肪细胞的脂解作用增强以及严重的高 FFA 血症, 引起脂质在肝脏等外周组织发生异位沉积<sup>[6-7]</sup>。miRNA-143 已被证实与脂肪细胞分化及脂质蓄积密切相关<sup>[8-10]</sup>。本研究前期工作发现, miRNA-143 在 ob/ob 肥胖小鼠肝脏组织中高表达, 而于内脏脂肪组织中低表达, 并推测这一结果可能与高脂环境下肝脏组织成脂能力增强而脂肪组织三酰甘油合成能力降低有关。但目前关于高 FFA 与 miRNA-143 之间的确切关系尚不清楚。因此, 为进一步明确高脂环境对于肝脏及脂肪组织中 miRNA-143 表达水平的直接影响, 本研究采用超生理浓度的 FFA 模拟高脂环境, 体外干预 HepG2 细胞及 HPA-v 成熟脂肪细胞, 以观察 miRNA-143 的表达变化。

已往研究表明, FFA 培养可以显著增加肝细胞内三酰甘油的含量、脂滴的堆积以及促使肝细胞发生脂肪变性<sup>[11-12]</sup>。本实验通过采用 1 mmol/L FFA 干预 HepG2 细胞, 结果发现, 干预 4 h 时, miRNA-143 的表达水平即明显高于未干预组, 提示 FFA 可以显著上调 HepG2 细胞中 miRNA-143 的表达。这与体内实验结果一致, 进一步证明高 FFA 环境下, 肝细胞内脂质的蓄积与成脂基因 miRNA-143 的表达增高密切相关。但本实验中, 随干预时间的持续, miRNA-143 的表达水平呈逐渐降低趋势。干预至 24 h 时, HepG2 细胞内 miRNA-143 的表达水平显著低于 4 h 时。鉴于 FFA 是重要的能源物质, 本文分析推测, 上述现象可能与培养过程中, FFA 逐渐被细胞作为能量物质消耗, 以致高脂环境解除有关。

本研究同时采用 FFA 干预人成熟脂肪细胞, 结果发现, 随作用时间的延长, miRNA-143 的表达水平逐渐下降, 即 FFA 可以显著下调 HPA-v 成熟脂肪细胞中 miRNA-143 的表达。结合先前动物实验, 提示肥胖机体脂肪组织中 miRNA-143 的

低表达与肥胖时高水平的 FFA 可能存在某些联系。研究表明<sup>[13-15]</sup>, 肥胖机体脂肪组织生成及储存三酰甘油达到饱和, 而在高脂环境的不断作用下, 会逐步出现脂肪细胞的功能失调, 即脂肪细胞三酰甘油的合成能力降低及脂解作用增强, 其后果是加剧了循环中的高 FFA 状态。而高 FFA 血症又会进一步引起脂肪细胞功能紊乱的不断发展, 形成恶性循环。因此, 笔者推测, miRNA-143 可能参与了肥胖状态下脂肪细胞功能紊乱以及脂代谢紊乱所致脂肪肝的发生机制。

## 参考文献

- [1] Michaud A, Drolet R, Noël S, et al. Visceral fat accumulation is an indicator of adipose tissue macrophage infiltration in women[J]. *Metabolism*, 2012, 61(5): 689-698.
- [2] 张向君, 黄婷婷, 付海龙, 等. MiR-143 在 ob/ob 小鼠肝脏、骨骼肌中的表达及意义[J]. *西南国防医药*, 2013, 23(3): 244-246.
- [3] Nguyen MT, Satoh H, Favelyukis S, et al. JNK and tumor necrosis factor- $\alpha$  mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(42): 35361-35371.
- [4] 余舜武, 刘鸿艳, 罗利军. 利用不同实时定量 PCR 方法分析相对基因表达差异[J]. *作物学报*, 2007, 33(7): 1214-1218.
- [5] Hirabara SM, Curi R, Maechler P. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 222(1): 187-194.
- [6] Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(2): 463-478.
- [7] Huang J, Xiong Y, Li T, et al. Ectopic overexpression of swine PPAR $\gamma$ 2 upregulated adipocyte genes expression and triacylglycerol in skeletal muscle of mice[J]. *Transgenic Res*, 2012, 21(6): 1311-1318.
- [8] Yi C, Xie WD, Li F, et al. MiR-143 enhances adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells through targeting the coding region of mouse pleiotrophin[J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(20): 3303-3309.
- [9] Xie H, Lim B, Lodish HF. MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity[J]. *Diabetes*, 2009, 58(5): 1050-1057.
- [10] Esau C, Kang X, Peralta E, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(50): 52361-52365.
- [11] Iio A, Ito M, Itoh T, et al. Molecular hydrogen attenuates fatty acid uptake and lipid accumulation through downregulating CD36 expression in HepG2 cells[J]. *Med Gas Res*, 2013, 3(1): 6-8.
- [12] Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K, et al. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes[J]. *Hepatology*, 2007, 46(3): 823-830.
- [13] Peng Y, Rideout D, Rakita S, et al. Diet-induced obesity associated with steatosis, oxidative stress, and inflammation in liver[J]. *Surg Obes Relat Dis*, 2012, 8(1): 73-81.
- [14] 骆天红, 赵冀, 李果, 等. 肥胖及 2 型糖尿病患者内脏脂肪基因差异表达研究[J]. *中国应用生理学杂志*, 2007, 23(2): 229-234.
- [15] Nadler ST, Stoehr JP, Schueler KL, et al. The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(21): 11371-11376.