

人前体脂肪细胞分化过程及 肥胖人群脂肪组织中 hsa_circ_0017650 高表达

张晶¹, 吴凯², 黄伟^{1*}

- 武汉市普仁医院 武汉科技大学附属普仁医院 内分泌科, 湖北 武汉 430081;
- 武汉市青山区厂前街社区卫生服务中心 内科, 湖北 武汉 430081

摘要:目的 探讨 hsa_circ_0017650 在人前体脂肪细胞分化过程以及肥胖人群脂肪组织中的表达变化。方法 RT-qPCR测定人前体脂肪细胞分化第 0/1/3/5/7/9/12 天 hsa_circ_0017650 的水平变化;油红 O 染色观察人前体脂肪细胞分化第 0/6/12 天脂滴形成;RT-qPCR 测定人前体脂肪细胞中 CCAAT 增强子结合蛋白 α (C/EBP α)、脂肪酸结合蛋白 4 (FABP4/ap2) 和脂蛋白脂酶 (LPL) mRNA 水平;根据体质指数 (BMI) 将 125 例患者分为肥胖组和对照组,比较 2 组腹膜后白色脂肪组织 hsa_circ_0017650 表达差异;Pearson 相关性分析 hsa_circ_0017650 表达水平与肥胖组患者 BMI、三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 相关性。结果 培养第 12 天时人前体脂肪细胞中 C/EBP α 、FABP4/ap2 和 LPL 水平均高于第 0 天 ($P < 0.001$);Hsa_circ_0017650 表达呈时间依赖性,其中第 3 天达到峰值 ($P < 0.001$)。与对照组相比,肥胖组白色脂肪组织中 hsa_circ_0017650 水平及 BMI、腰臀比、TC、TG、LDL-C 水平以及升高 ($P < 0.001$);Hsa_circ_0017650 与 BMI、TG、LDL-C 呈正相关 ($r = 0.554, 0.569, 0.618, P < 0.001$)。结论 Hsa_circ_0017650 在人前体脂肪细胞分化过程以及肥胖人群白色脂肪组织中高表达,与患者肥胖密切相关,为肥胖患者的治疗提供靶点。

关键词: 人前体脂肪细胞;分化;肥胖;Hsa_circ_0017650

中图分类号: R589.2; R331 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2023.07.1079

High expression of hsa_circ_0017650 in human adipocyte differentiation process and adipose tissue of obese people

ZHANG Jing¹, WU Kai², HUANG Wei^{1*}

- Department of Endocrinology, Wuhan Puren Hospital, Puren Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081;
- Department of Internal Medicine, Changqian Street Community Health Service Center of Qingshan District, Wuhan 430081, China

Abstract: Objective To investigate the expression changes of hsa_circ_0017650 in the human adipocyte differentiation process and adipose tissue of obese people. **Methods** The changes of hsa_circ_0017650 on the 0th, 1st, 3rd, 5th, 7th, 9th and 12th days of human preadipocyte differentiation were determined by RT-qPCR; Oil Red O staining was performed to observe the formation of lipid droplets on 0th, 6th, and 12th days of human preadipocyte differentiation. The mRNA levels of CCAAT enhancer-binding protein α (C/EBP α), fatty acid-binding protein 4

收稿日期: 2022-05-30 修回日期: 2022-12-09

基金项目: 湖北省卫生健康委员会联合基金 (WJ2019H224)

* 通信作者 (corresponding author): zhanghf951@163.com

(FABP4/ap2), and lipoprotein lipase (LPL) in human preadipocytes were determined by RT-qPCR to identify the differentiation of human preadipocytes. A total of 125 patients who underwent appendectomy in our hospital were selected as research subjects, and were divided into obesity group (53 cases) and control group (72 cases) according to body mass index (BMI). The expression differences of hsa_circ_0017650 in retroperitoneal white adipose tissue of the two groups were compared. The Pearson's correlation coefficient between the expression level of hsa_circ_0017650 and BMI, triacylglycerol (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in obesity group was analyzed. **Results** Human preadipocytes gradually changed from spindle to oval or round, with a gradual increase in volume and an increase in fat droplets. On the 12th day of culture the levels of C/EBP α , FABP4/ap2 and LPL in human precursor adipocytes were higher than those on day 0 ($P < 0.001$). Compared with baseline of day zero (1.02 ± 0.13), the expression of hsa_circ_0017650 increased on the 1st (2.47 ± 0.30), 3rd (27.38 ± 3.42), 5th (15.62 ± 1.95), 7th (16.24 ± 2.03), 9th (18.37 ± 2.29) and 12th (16.24 ± 2.21), and reached the peak on the 3rd day ($P < 0.001$). Compared with the control group, the levels of BMI, waist-to-hip ratio, TC, TG, LDL-C and of hsa_circ_0017650 in white adipose tissue increased in the obesity group ($P < 0.001$); Hsa_circ_0017650 was positively correlated with BMI, TG, and LDL-C ($r = 0.554, 0.569, 0.618, P < 0.001$). **Conclusions** Hsa_circ_0017650 is highly expressed during human adipocyte differentiation and mainly in white adipose tissue of obese individual. It is closely related to obesity and is potential for the treatment of obese patients.

Key words: human preadipocytes; differentiation; obesity; hsa_circ_0017650

肥胖是指体内脂肪过多积累的一种状态,肥胖者脂肪层较厚,体质量明显超标。肥胖者一般摄入能量过多,机体代谢改变,引发一系列生理、病理改变,是II型糖尿病、高血压和心血管疾病等发生的危险因素,对患者健康造成严重影响^[1-2],因此,肥胖相关机制的探讨是研究热点。肥胖与白色脂肪的存在密切相关,体内过多的能量均靠白色脂肪存储,减少白色脂肪含量是减肥的有效手段^[3]。环状RNA(circular RNA, circRNA)是非编码RNA中的一种,广泛存在于真核生物细胞内,稳定性强,参与营养物质合成以及代谢过程。多项研究显示,其在脂质分化中发挥作用^[4-5]。通过circRNA微阵列检测内脏脂肪组织与脂肪细胞中circRNA表达谱,发现 hsa_circ_0017650 差异表达^[6],并经RT-qPCR验证此结果。CircRNA可招募miRNA来调节靶基因的表达。研究显示,miR-370在脂肪酸代谢中发挥作用^[7]。生物信息网站分析显示,hsa_circ_001765与miR-370存在靶关系。因此,初步认为 hsa_circ_0017650 在肥胖患者脂肪组织中发挥调控作用。基于此,本研究拟分析 hsa_circ_0017650 与肥胖的相关性,旨在为 hsa_circ_0017650 在肥胖患者中发挥的作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及病例:人前体脂肪细胞系(3610)(宁波明舟生物科技有限公司);病例:武汉市普仁医院外科2017年9月至2019年9月期间行阑尾手术的患者125例。

1.1.2 试剂及试剂盒:地塞米松(上海源叶生物科技有限公司);3-丁基-1-甲基次黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)和胰岛素(Sigma-Aldrich公司);油红O染料、反转录试剂盒和PCR试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。C/EBP α 、FABP4/ap2和LPL基因引物序列由上海生工生物工程技术服务有限公司设计。

1.2 方法

1.2.1 患者的分组情况:将体质指数(body mass index, BMI)高于24 kg/m²患者纳入肥胖组, BMI在18~24 kg/m²范围内人群纳入对照组^[8]。肥胖组53例,对照组72例。排除高血压、糖尿病、心脑血管疾病、恶性肿瘤患者。阑尾手术过程中取患者腹膜后脂肪组织迅速置于液氮中,然后移至-80℃冰箱中冷冻保存待测。此研究经武汉市普仁医院伦理批

准(2017-053)及受试者知情同意并签署知情同意书。

1.2.2 人前体脂肪细胞的培养及分化诱导:将细胞接种于6孔板(细胞为 1×10^5 个/mL),添加完全PAM培养基,置于CO₂培养箱中培养(CO₂浓度为5%,温度设置为37℃),待细胞单层汇合后,更换培养基为添加0.5 mmol/L的IBMX+1 μmol/L地塞米松+5 μg/mL胰岛素的DMEM培养基,4 d后更换为含1%青链霉素与5 μg/mL胰岛素的DMEM培养基,培养细胞至分化成功。收集此过程中第0、1、3、5、7、9、12天时的细胞样品,通过RT-qPCR检测各个时间点细胞 hsa_circ_0017650,每个时间点均设置6个复孔。

1.2.3 油红O染色以及RT-qPCR观测脂质形成:收集诱导过程中第0、6、12天时的细胞样本,弃培养基,PBS清洗,甲醛固定,蒸馏水漂洗,油红O试剂盒染色,镜下观察细胞脂滴形成情况,拍照保存。

RT-qPCR检测CCAAT增强子结合蛋白α(C/EBPα)、脂肪酸结合蛋白(FABP4/ap2)和脂蛋白脂酶(LPL)等3种白色脂肪基因表达水平,判断脂肪细胞是否分化成熟。C/EBPα、FABP4/ap2和LPL引物序列(表1)。具体操作方法参见1.2.4。

1.2.4 RT-qPCR检测各时间点前体脂肪细胞以及患者腹膜后脂肪组织 hsa_circ_0017650 的表达:用Trizol试剂提取人前体脂肪细胞及患者腹膜后白色脂肪组织中RNA,将RNA反转录为cDNA。按PCR试剂盒说明书中的反应体系加样。Hsa_circ_0017650与内参重组人核糖体磷蛋白P0(recombinant human

ribosomal phosphoprotein P0, RPLP0)的引物序列由上海生工设计(表2),反应条件:95℃预变性10 min;95℃变性15 s,60℃退火1 min,72℃延伸30 s,40个循环,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算人前体脂肪细胞及患者腹膜后脂肪组织中 hsa_circ_0017650 相对表达量。

1.3 统计学分析

用SPSS 22.0软件对研究数据分析,计量资料以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2组间不同因子表达水平比较采用 t 检验(对照组与肥胖组,第0天与1、3、5、7、9、12天),多个时间点 hsa_circ_0017650 表达水平比较采用单因素重复测量方差分析;hsa_circ_0017650与BMI、TG、LDL-C等指标间的相关性采用Pearson相关性分析。

2 结果

2.1 人前体脂肪细胞的分化鉴定

随着时间的延长,人前体脂肪细胞由梭形变为椭圆形或圆形,体积逐渐增大,第零天时不着色,第6天时可见少量橘红色脂肪滴,第12天时可见大小不一的橘红色脂肪滴增多(图1)。与第0天相比,培养第12天时C/EBPα、FABP4/ap2和LPL mRNA水平均升高($P < 0.001$)(表3)。

2.2 人前体脂肪细胞分化过程中各时间点 hsa_circ_0017650 表达差异

与分化第0天相比,第1、3、5、7、9、12天 hsa_circ_0017650 表达均升高,第3天 hsa_circ_0017650 表达水平最高,随后略有下降($P < 0.05$)(表4)。

表1 C/EBPα、FABP4/ap2和LPL引物序列

Table 1 C/EBPα, FABP4/ap2 and LPL primer sequences

gene	forward primer(5'-3')	reverse primer(5'-3')
C/EBPα	GGAAGAAACGACTGGGAGC	CGACTAGACGCTATCTGTGATT
FABP4/ap2	GACCTGGAAACTCGTCTCCA	CATGACACATTCGACCACCA
LPL	GGACCTAACTTCGAGTATGCAGAA	CCCTCTGGTGAATGTGTGTAAGA
GAPDH	TGCTGAGTATGTCGTGGAG	GTCTTCTGAGTGGCAGTGAT

表2 Hsa_circ_0017650及内参引物序列

Table 2 Hsa_circ_0017650 and internal reference primer sequences

gene	forward primer(5'-3')	reverse primer(5'-3')
hsa_circ_0017650	AAGACCTTCCTTACCC	GCAACAGCTTTGCCTC
RPLP0	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGCTGATGGGATTTTC

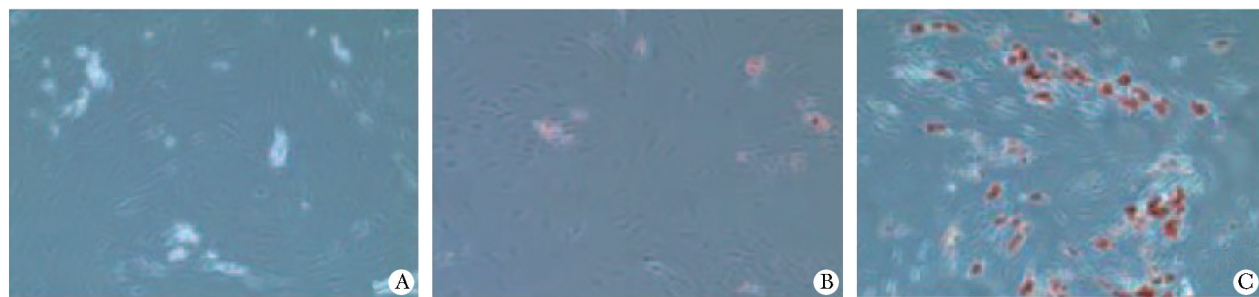


图1 分化第0天(A)、6天(B)、12天(C)时油红O的染色

Fig 1 Oil Red O staining at day 0 (A), day 6 (B), and day 12 (C) of differentiation ($\times 400$)

表3 诱导分化第0天与第12d时C/EBP α 、FABP4/ap2、LPL水平比较

Table 3 Comparison of C/EBP α , FABP4/ap2, LPL mRNA levels on day 0 and day 12 of induction of differentiation

training time/day	C/EBP α	FABP4/ap2	LPL
0	1.02 \pm 0.12	1.01 \pm 0.12	1.02 \pm 0.12
12	18.37 \pm 2.29*	10.38 \pm 1.28*	15.34 \pm 1.92*

* $P < 0.001$ compared with 0 day.

表4 诱导不同时间点时 hsa_circ_0017650 表达情况

Table 4 Expression of hsa_circ_0017650 at different time points

training time/day	hsa_circ_0017650
0	1.02 \pm 0.13
1	2.47 \pm 0.30*
3	27.38 \pm 3.42*
5	15.62 \pm 1.95*
7	16.24 \pm 2.03*
9	18.37 \pm 2.29*
12	16.24 \pm 2.21*

* $P < 0.001$ compared with 0 day.

2.3 体质量正常与肥胖人群一般资料比较

与对照组相比,肥胖组 BMI、腰臀比、TC、TG 和 LDL-C 水平明显升高($P < 0.001$)(表5)。

2.4 体质量正常与肥胖人群腹膜后白色脂肪组织中 hsa_circ_0017650 表达差异

与对照组相比,肥胖组腹膜后白色脂肪组织中 hsa_circ_0017650 水平显著升高(1.02 \pm 0.12 vs 7.24 \pm 0.89)($P < 0.001$)。

表5 2组年龄、BMI、腰臀比、血脂水平比较

Table 5 Comparison of age, BMI, waist hip ratio and blood lipid level between the two groups

index	control group ($n = 72$)	obesity group ($n = 53$)
age/year	37.4 \pm 4.7	38.0 \pm 4.7
BMI	20.19 \pm 2.52	33.52 \pm 4.13*
waist to hip ratio	0.86 \pm 0.11	0.97 \pm 0.12*
TC/(mmol/L)	4.08 \pm 0.51	4.72 \pm 0.59*
TG/(mmol/L)	1.35 \pm 0.16	1.96 \pm 0.24*
HDL-C/(mmol/L)	1.12 \pm 0.14	1.15 \pm 0.13
LDL-C/(mmol/L)	2.72 \pm 0.34	4.24 \pm 0.53*

* $P < 0.001$ compared with control group.

2.5 肥胖患者 hsa_circ_0017650 表达与 BMI、TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 表达相关性

Hsa_circ_0017650 与 BMI、TG 和 LDL-C 呈正相关($r = 0.554, 0.569, 0.618, P < 0.001$)。

3 讨论

去除白色脂肪可以减少代谢功能障碍^[9-10],是治疗肥胖的方向之一。近来研究显示,circRNA 在肥胖患者体内异常表达,在脂质形成、脂肪酸代谢中发挥重要作用^[6,13]。CircRNA 在前体脂肪细胞形成中发挥调控作用,明确 circRNA 与前体脂肪细胞分化的关系可为肥胖的深入研究提供依据。

通过 circRNA 微阵列检测内脏脂肪组织与脂肪细胞中 circRNA 表达谱,发现 hsa_circ_0017650 差异表达^[6],RT-qPCR 结果也验证了 hsa_circ_0017650 在脂肪组织、脂肪细胞中异常表达。CircRNA 与 lncRNA 类似,均可通过招募 miRNA 调控靶基因的表达而发挥作用^[11]。miR-370 位于人第 14 号染色体,在维持肝细胞功能中具有意义,miR-370 可调节

脂代谢能力^[12]; miR-370 可增强猪脂肪细胞的细胞周期并抑制脂肪累积,可能通过下调过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ) 发挥此作用^[13], PPAR 通路在三酰甘油的累积中发挥作用, PPAR 可通过调控下游与脂代谢相关基因的表达,促进脂肪细胞的分化,增加脂肪细胞的数量^[14]。生物信息网站资料分析显示 hsa_circ_0017650 与 miR-370 存在靶向关系。因此初步认定 hsa_circ_0017650 在脂肪细胞分化中发挥作用。油红 O 染色结果显示,经诱导的人前体脂肪细胞第 6 天时可见少量橘红色脂肪滴,第 12 天可见大量的橘红色脂肪滴,且培养第 12 天时白色脂肪特异性因子 C/EBP α 、FABP4/ap2、LPL mRNA 水平升高,提示,成功诱导前体脂肪细胞分化,在此分化过程中, hsa_circ_0017650 水平总体呈增加趋势,分化第 3 天到达顶峰,随后略有下

降,但仍高于人前体脂肪细胞,提示 hsa_circ_0017650 可能参与前体脂肪细胞分化,但其参与机制但仍需进一步验证。

至于 hsa_circ_0017650 是否在患者肥胖中发挥作用仍不得而知,检测结果显示,肥胖患者腹膜后白色脂肪组织中 hsa_circ_0017650 表达水平显著高于对照组,且与 BMI、TC、LDL-C 呈正相关, BMI 是评估人胖瘦指数的指标; TG 是脂肪的重要组成成分,脂肪酸作为 TG 的直接底物,其代谢异常加速了 TG 的合成, TG 水平升高与肥胖关系密切,中心型肥胖患者血清 LDL-C 水平显著高于非肥胖者^[15]。此结果提示 hsa_circ_0017650 可能在肥胖中发挥作用,可能通过调控脂代谢、促进脂肪合成而发挥作用,也可能是由肥胖导致的代谢异常引起的。

综上所述, hsa_circ_0017650 在人脂肪细胞分化过程以及肥胖者体内高表达,与患者肥胖密切相关。

参考文献:

- [1] Osinski C, Gléau LL, Poitou C, *et al.* Type 2 diabetes is associated with impaired jejunal enteroendocrine GLP-1 cell lineage in human obesity [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2021, 45:170-183.
- [2] 胡诗琪, 蓝彦琦, 吴寿岭, 等. 肥胖及其变化对中国华北新发 NAFLD 成年男性患者心血管疾病发病风险的影响[J]. *基础医学与临床*, 2022, 42:788-794.
- [3] Kang NH, Mukherjee S, Jang MH, *et al.* Ketoprofen alleviates diet-induced obesity and promotes white fat browning in mice via the activation of COX-2 through mTORC1-p38 signaling pathway [J]. *Pflügers Arch*, 2020, 472:583-596.
- [4] 王海棠. 外泌体 circRNA_0011487-miR328/PRDM16 途径介导运动促进小鼠白色脂肪棕色化机制研究[D]. 上海: 上海体育学院, 2019, 17-23.
- [5] 李艳辉, 肖诚瑛, 赵蓉, 等. 高脂饮食诱导的肥胖相关子宫内膜病变小鼠模型中 circRNA 表达谱分析及相关 ceRNA 构建[J]. *现代妇产科进展*, 2022, 31:29-36.
- [6] Sun WX, Sun XC, Chu WW, *et al.* CircRNA expression profiles in human visceral preadipocytes and adipocytes [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 21:815-821.
- [7] Zhang XR, Fu XJ, Zhu DS, *et al.* Salidroside-regulated lipid metabolism with down-regulation of miR-370 in type 2 diabetic mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 779:46-52.
- [8] 中华人民共和国卫生部疾病控制司. 中国成人超重和肥胖症预防控制指南[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006, 3-4.
- [9] 李涵, 付婷婷, 张磊, 等. 过氧化物酶增殖物激活受体 γ 激动剂对 24 例肥胖症患者米色脂肪细胞分化的影响[J]. *山东大学学报:医学版*, 2020, 58:8-13.
- [10] 开悦, 刘虎, 王文茜, 等. 高脂饮食诱导肥胖小鼠白色脂肪组织中 IL-33 的表达及意义[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37:524-528.
- [11] Yang WJ, Zhao JD, Zhao Y, *et al.* Hsa_circ_0048179 attenuates free fatty acid-induced steatosis via hsa_circ_0048179/miR-188-3p/GPX4 signaling [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12:23996-24008.
- [12] Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y, *et al.* microRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism [J]. *J Lipid Res*, 2010, 51:1513-1523.
- [13] Chu Y, Yao Y, Zhu Y, *et al.* miR-370 enhances cell cycle and represses lipid accumulation in porcine adipocytes [J]. *Anim Biotechnol*, 2021, 32:334-342.
- [14] 管巧丽, 吴晓云, 李芳, 等. EGCG 通过激活 AMPK, 抑制 PPAR γ 调控 3T3-L1 脂肪细胞中脂滴蓄积[J]. *食品科学*, 2021, 42:152-161.
- [15] 曾斯琴, 吴新怡, 董燕飞, 等. 超重及肥胖成人内脏脂肪指数与代谢指标的相关性[J]. *海南医学*, 2021, 32:1506-1510.