

文章编号: 1000-8020(2016)06-0897-09

·论著·

## 高脂饲料诱导的胰岛素抵抗小鼠肝脏组织差异表达 microRNAs 的鉴定及生物信息学分析

于曼丽 王文栋 饶小娇 郝敏 吴亚柳 常晓彤<sup>1</sup>  
河北北方学院临床检验诊断学重点实验室 张家口 075000



**摘要:**目的 采用茎环-逆转录实时荧光定量 PCR 方法,鉴定高脂饲料诱导的胰岛素抵抗小鼠肝脏组织中差异表达的 microRNAs(miRNAs),即 miR-1897-3p、miR-690 和 miR-7a-5p,并预测分析 miRNAs 调控的靶基因和功能,探讨胰岛素抵抗与差异表达的 miRNAs 的相关性。方法 30 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组和高脂饲料诱导的胰岛素抵抗模型组,设计茎环引物和实时荧光定量 PCR 特异引物,建立茎环-逆转录 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 方法,检测小鼠肝脏组织中 miR-1897-3p、miR-690 和 miR-7a-5p 的表达。统计学分析小鼠 miR-1897-3p、miR-690 和 miR-7a-5p 表达的差异。利用生物信息学软件预测 miRNAs 调控的靶基因,分析靶基因富集的基因功能(gene ontology,GO)和涉及到的信号转导通路及其靶基因蛋白的相互作用。结果 经实时荧光定量 PCR 鉴定分析,与对照组相比,胰岛素抵抗组小鼠肝脏组织中 miR-1897-3p、miR-690、miR-7a-5p 表达下调( $P < 0.05$ )。生物信息学分析结果显示,有 16 种靶基因被两种差异表达的 miRNAs 调控,其中有 8 个靶基因可与 4 种以上的蛋白质相互作用,Rac1、Rhoa、Prkcz、Tgfr2、Itch 和 Ube2d3 蛋白位于网络的中心节点,且它们与胰岛素信号通路相关或存在交联。结论 肝脏 miR-1897-3p、miR-690 和 miR-7a-5p 可能参与了胰岛素抵抗的病理生理过程,其机制可能通过调节靶基因的表达,影响了胰岛素信号通路的正常级联反应。

**关键词:** 胰岛素抵抗 微小 RNAs 实时荧光定量 PCR 生物信息学  
中图分类号: Q593.1 Q578 S816.8 文献标志码: A

## Identification and bioinformatics analysis of differentially expressed microRNAs in mice liver tissues with a high fat diet-induced insulin resistance

YU Manli, WANG Wendong, RAO Xiaojiao, HAO Min, WU Yaliu, CHANG Xiaotong  
Key Laboratory of Clinical Diagnostics, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

**Abstract: Objective** To identify the expression levels of miR-1897-3p, miR-690 and miR-7a-5p in mice liver tissues with a high fat diet-induced insulin resistance using a stem-loop reverse transcriptional real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method, and predict microRNAs(miRNAs)-regulated target genes and their functions to investigate the relationship between insulin resistance and differentially expressed miRNAs. **Methods** The total of 30 liver tissue samples were obtained from 15 normal control mice and 15 test mice with a high fat diet-induced insulin resistance. The stem-

基金项目: 河北省自然科学基金(No. C2011405015); 河北北方学院创新人才培育项目(No. CXRC1316)

作者简介: 于曼丽,女,硕士研究生,研究方向: 脂代谢障碍相关疾病的分子机制与临床应用, E-mail: 2213986524@qq.com

<sup>1</sup> 通信作者: 常晓彤, E-mail: changxt1212@vip.sina.com

loop reverse transcriptional primers and the primers of real-time PCR were designed to establish a RT-qPCR method, and then the expression levels of miR-1897-3p, miR-690 and miR-7a-5p of 30 liver tissue samples were detected and analyzed. Using bioinformatics methods, the target genes of differentially expressed miRNAs were predicted, and then enriched gene ontology (GO), related signal pathways and target gene protein-target gene protein interactions were analyzed, respectively. **Results** Compared with control group, the expression levels of miR-1897-3p, miR-690 and miR-7a-5p detected by RT-qPCR in the group with a high-fat diet-induced insulin resistance were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), which exhibited the similar pattern of down regulation to the previous microarray results. Bioinformatics analysis results showed that a total of 16 target genes were regulated by two differentially expressed miRNAs. Among of the 16 target gene protein, 8 proteins had interactions with  $\geq 4$  proteins. Rac1, Rhoa, Prkcz, Tgfb2, Itch and Ube2d3 protein were located in the central node of the network, and they were associated or cross-linking with insulin signaling pathway. **Conclusion** miR-1897-3p, miR-690 and miR-7a-5p in liver tissues may be involved in the physiopathologic process of insulin resistance, which may be affect the normal insulin signaling pathway cascade by regulating the expression of target genes.

**Key words:** insulin resistance, microRNAs, real-time PCR, bioinformatics

肥胖被认为是 21 世纪公共卫生的最大威胁,肥胖相关的胰岛素抵抗是糖尿病等多种疾病起始进程的早期事件,与血脂障碍、高血压、葡萄糖耐受不良和内皮组织功能紊乱相关<sup>[1]</sup>。

微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一类进化上高度保守的单链非编码 RNA 分子,通常由 19~22 个核苷酸构成,其主要通过抑制靶基因的翻译过程,在转录后水平负性调控基因表达。近几年,国内外学者相继报道 miRNAs 可以影响体内的多种代谢过程,包括糖脂代谢、胰岛素分泌和炎症反应<sup>[2-3]</sup>。肝脏作为胰岛素作用的主要靶器官在肥胖诱导的胰岛素抵抗中发挥着重要作用<sup>[4]</sup>。本课题组前期研究结果显示,高脂饲料诱导的胰岛素抵抗小鼠 3 种微小 RNA,即 miR-1897-3p、miR-690 和 miR-7a-5p 表达下调。为了验证基因芯片筛查结果的准确性,本研究建立茎环-逆转录 SYBR Green I 荧光染料实时荧光定量 PCR 方法鉴定上述 3 种差异表达的 miRNAs,并对其进行生物信息学分析,探讨高脂饲料诱导的胰岛素抵抗与肝脏差异表达的 miRNAs 的相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

动物组织总 RNA 提取试剂 TRIZOL (Cat 号 03408)、逆转录试剂 FastQuant RT Kit (with gDNase) (Cat 号 KR106-02)、实时荧光定量 PCR

试剂 SuperReal PreMix Plus (SYBR Green I) 试剂盒 (Cat 号 FP205-02) 均为天根生化科技(北京)有限公司产品。Rotor-Gene Q 实时荧光定量 PCR 仪(德国 QIAGEN 公司);低温高速离心机(美国 Thermo 公司);倍易型血糖仪(美国强生公司)。

### 1.2 实验动物与分组处理

SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,21 日龄,体重 ( $12.5 \pm 0.5$ ) g,购自北京大学医学部实验动物科学部,许可证号 SCXK(京)2012-0004,实验过程中对动物的饲养及取材均遵守实验动物管理及保护的相关规定。30 只小鼠随机分为 2 组,每组 15 只,对照组喂饲普通基础饲料,高脂饲料诱导的胰岛素抵抗模型组给予高脂饲料。基础饲料包含普通面粉 20%、玉米面粉 40%、豆粉 20%、大麦麸皮 6%、骨粉 5%、面粉 8%、鱼肝油 1%;高脂饲料包含基础饲料 53%、猪油 10%、奶粉 5%、鸡蛋 11%、白糖 5%、黄豆 16%;两种饲料均由河北北方学院动物室提供。小鼠饲养温度 20~24℃,相对湿度 50%~60%,光照节律为明/暗 12 h 交替,小鼠自由摄食饮水。

待两组小鼠体重的差异有统计学意义时,进行葡萄糖耐量实验 (glucose tolerance test, GTT) 和胰岛素耐量实验 (insulin tolerance test, ITT),观察小鼠胰岛素抵抗的发生。(1)葡萄糖耐量实验:小鼠禁食 12 h,称量体重,尾静脉采血,测空腹血糖值;腹腔注射 50% 葡萄糖注射液 2 g/kg,应用

血糖仪分别测量 30、60、90 和 120 min 时尾静脉血糖值。(2) 胰岛素耐量实验: 小鼠行 GTT 一周后, 进行 ITT 实验。小鼠禁食 12 h, 称体重, 尾静脉取血, 测量空腹血糖值, 腹腔注射葡萄糖 2 g/kg, 随后注射胰岛素 0.75 U/kg, 应用血糖仪分别测量 15、30、60、90 和 120 min 时尾静脉血糖值。

胰岛素抵抗模型建立成功后乙醚麻醉、后颈椎脱臼处死小鼠, 迅速收集新鲜肝脏组织, 液氮速冻, -80 °C 冰箱保存。每组随机选取 3 只小鼠的肝脏组织标本, 进行芯片筛查, 确定 3 种微小 RNA, 即 miR-1897-3p、miR-690 和 miR-7a-5p 表达下调。再对所有小鼠肝脏组织标本行实时荧光定

量 PCR 验证差异表达的 miRNAs。

### 1.3 逆转录及 PCR 引物设计与合成

在 miRbase 数据库 (<http://www.mirbase.org>) 中获得 mmu-miR-1897-3p (MIMAT0007865)、mmu-miR-690 (MIMAT0003469) 和 mmu-miR-7a-5p (MIMAT0000677) 的基因序列, 在 Genbank 中获得内参 Rnu6 (ENSMUSG00000095132) 的序列, 采用 Primer 5.0 软件设计引物, 并在 NCBI 中分析引物的特异性。逆转录所使用的茎环引物、PCR 上下游引物均由宝锐通生物科技(北京)有限公司合成。茎环引物、差异 miRNAs 特异性引物和内参对照 U6 基因引物序列见表 1、表 2。

表 1 茎环引物

Table 1 Stem loop primers

基因	茎环引物
miR-1897-3p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCTCACC
miR-690	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTTTGGT
miR-7a-5p	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACAACA

表 2 实时荧光定量 PCR 引物

Table 2 Real-time fluorescence quantitative PCR primers

基因	上游引物	下游引物
miR-1897-3p	TCGTTCTGTCCGGTGAGGTC	CGCAGGGTCCGAGGTATTC
miR-690	AAAGGCTAGGCTCACAACCAAAG	CGCAGGGTCCGAGGTATTC
miR-7a-5p	GTGGAAGACTAGTGATTTTGTGTGT	CGCAGGGTCCGAGGTATTC
U6	ATTGGAACGATACAGAGAAGATTAGC	TGGAACGCTTACGAATTTG

### 1.4 肝脏组织中总 RNA 提取

采用 TRIZOL 法提取小鼠肝脏组织中的总 RNA, 按试剂盒说明书操作。

### 1.5 RNA 定量和质检

小鼠肝脏组织总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳显示, 5S、18S、28S 条带完整, 28S 条带的荧光强度是 18S 的 2 倍, 无基因组 DNA 污染; 用 SMA4000 测定每个样本 RNA 的浓度和纯度, 结果显示每个样本 RNA  $A_{260}/A_{280}$  在 1.8 ~ 2.0 之间。证明提取的 RNA 样本质量和纯度符合实验要求。

### 1.6 cDNA 合成

提取的总 RNA 样本参照 FastQuant RT Kit (with gDNase) 试剂盒说明书合成 cDNA, 采用说明书推荐的样本 RNA 50 ng ~ 2 μg 使用 20 μL 反应体系, 基因组 DNA 去除体系: 2 μL 5 × gDNA Buffer, 1 μL RNA 样本, 7 μL RNase-Free dd H<sub>2</sub>O, 混匀后简短离心, 于 42 °C 孵育 3 min, 然后置于冰上放置。反转录反应体系: 10 × Fast RT Buffer 2 μL, RT Enzyme 1 μL, Stem loop primers (10 μm/L) 2 μL, U6 Reverse primer (10 μm/L) 2 μL, RNase-Free dd H<sub>2</sub>O 3 μL, 混匀后将此体系加入到 gDNA 去除体系中, 充分混匀, 42 °C 孵育 15 min,

95 °C 孵育 3 min 后放于冰上, 得到的 cDNA 产物稀释 15 倍用于实时荧光定量 PCR 实验。

### 1.7 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测小鼠肝脏中 miRNA 表达

实时荧光定量 PCR 通过 Rotor-Gene Q 运行, 采用试剂盒推荐的 20 μL 反应体系, 同一个样本设 3 个重复孔: 2 × SuperReal PreMix Plus 10 μL, Forward primer (10 μm/L) 0.6 μL, Reverse primer (10 μm/L) 0.6 μL, cDNA 模板 1 μL, RNase-free dd H<sub>2</sub>O 7.8 μL, 同时设置阴性对照孔。反应条件: 95 °C 15 min 预变性; 95 °C 变性 10 s, 61 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 27 s, 采集荧光信号, 共 40 个循环。

重复性实验结果显示每个样本复孔间的变异系数 < 3%, 说明实验重复性良好, 实验体系稳定可靠。3 种 miRNAs 和内参 U6 的溶解曲线均呈现单峰, 没有引物二聚体或其他非特异峰存在, 说明 PCR 扩增产物特异性良好。

### 1.8 数据的处理

实时荧光定量 PCR 采用 Cr 即  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法处理数据, 用来验证 3 种 miRNAs 在小鼠肝脏中的差异表达, 步骤如下: (1) 计算各样本某个 miRNA 和其内参 U6 的 Ct 值, 并算其差值, 即  $\Delta Ct = Ct$

目的基因 - Ct U6 内参基因; (2) 计算对照组、胰岛素抵抗组的  $\Delta Ct$  平均值; (3) 胰岛素抵抗组  $\Delta Ct$  平均值减去对照组  $\Delta Ct$  平均值, 得到  $\Delta\Delta Ct$  值; (4) 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式计算两组样本中不同 miRNAs 之间的相对表达量。

1.9 靶基因预测与功能显著性分析

利用 Targetscan 靶基因预测数据库 ([http://www.targetscan.org/vert\\_50/](http://www.targetscan.org/vert_50/)), 预测差异表达的 miRNAs 的靶基因。基于 GO (gene ontology) 数据库 (<http://geneontology.org/>) 对靶基因进行分析, 得到基因聚类项目。基于 KEGG (kyoto encyclopedia of gene and genomes) 数据库 (<http://www.kegg.jp/>) 分析差异表达 miRNAs 的靶基因可能富集的生物学信号通路, 并利用 STRING 10.0 (<http://www.string-db.org/>) 进行蛋白质-蛋白质相互作用分析。

1.10 统计学分析

实验数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组数据比较采用独立样本 *t* 检验, 多组数据比较采用单因素方差分析进行组间比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

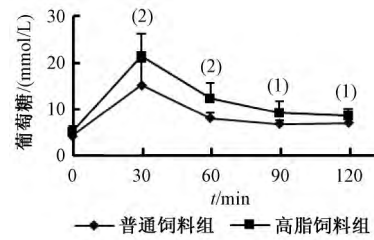
2 结果

2.1 小鼠一般情况

实验期间, 各组小鼠生长良好。与普通饲料组相比, 高脂饲料组小鼠在第 12 周时体重明显增加 [(28.29  $\pm$  1.30) g vs (30.05  $\pm$  1.67) g,  $P < 0.05$ ]; 28 周后, GTT 和 ITT 结果显示, 高脂饲料组小鼠调节血糖能力受损、对胰岛素的敏感性降低。

由图 1 可见, 给药前, 两组小鼠空腹血糖无显著差异。与普通饲料组比较, 高脂饲料组小鼠腹腔注射葡萄糖后 30 和 60 min 时的血糖显著升高

( $P < 0.01$ ) 90 和 120min 时血糖仍高于普通饲料组 ( $P < 0.05$ )。

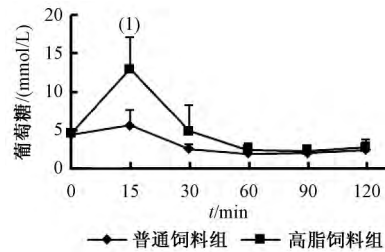


(1)  $P < 0.05$ , (2)  $P < 0.01$

图 1 葡萄糖耐量实验结果

Figure 1 Glucose tolerance test

由图 2 可见, ITT 实验结果显示, 与普通饲料组比较, 高脂饲料组血糖在 15 min 时维持在较高水平, 差异有极显著统计学意义 ( $P < 0.01$ )。在 30 和 60 min, 两组间胰岛素降糖作用差异无统计学差异, 但高脂饲料组比普通饲料组小鼠胰岛素降糖作用有降低趋势。提示高脂饲料组小鼠对胰岛素的敏感性明显低于普通饲料组。



(1)  $P < 0.01$

图 2 小鼠胰岛素耐量实验

Figure 2 Insulin tolerance test

2.2 小鼠肝脏组织中基因表达情况

经实时荧光定量 PCR 验证分析, 与对照组小鼠相比, 高脂饲料诱导的胰岛素抵抗组小鼠肝脏组织中 miR-1897-3p、miR-690、miR-7a-5p 表达下调 ( $P < 0.01$ ), 见表 3。

表 3 小鼠肝脏中 miRNAs 相对定量结果

Table 3 Relative quantitative results of miRNAs in mice liver

组别	miR-1897-3p			miR-690			miR-7a-5p		
	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
对照组	-6.39 $\pm$ 0.3	0	1	1.07 $\pm$ 0.6	0	1	1.01 $\pm$ 0.5	0	1
胰岛素抵抗组	-4.12 $\pm$ 0.2 <sup>(1)</sup>	2.27	0.2	3.59 $\pm$ 0.38 <sup>(1)</sup>	2.52	0.17	2.26 $\pm$ 0.23 <sup>(1)</sup>	1.25	0.42

注: 与对照组比较, (1)  $P < 0.01$

2.3 差异表达 miRNAs 靶基因预测及富集的 GO 与信号通路

靶基因预测和 GO 分析结果如表 4 所示, 差异表达的 3 种 miRNAs 均被预测可作用于多个靶基因, miR-1897-3p 有 745 个靶基因, miR-690 有

1425 个靶基因, miR-7a-5p 有 3114 个靶基因; GO 分类表明这些靶基因大多数属于分子功能中的蛋白结合类和细胞组分中的膜蛋白类。从生物学过程看, 3 种差异表达 miRNAs 的靶基因大多数参与了转录调控。

表 4 靶基因的数量和主要的 GO 分类

Table 4 Number of target genes and mainly GO classification

miRNAs	登录号	靶基因数量	GO 类别		
			生物过程	细胞组分	分子功能
mmu-miR-1897-3p	MIMAT0007865	745	GO: 0006355	GO: 0016020	GO: 0005515
mmu-miR-690	MIMAT0003469	1425	GO: 0006355	GO: 0016020	GO: 0005515
mmu-miR-7a-5p	MIMAT0000677	3114	GO: 0006355	GO: 0016020	GO: 0005515

KEGG 信号通路分析结果显示,差异表达的 miRNAs 靶基因富集于多条信号通路(表 5)。在 KEGG 信号通路中,有 16 种靶基因被两种 miRNAs 调控(表 6)。进一步分析这 16 个靶基因

的蛋白质互作网络,发现有 8 个靶基因可与 4 种以上的蛋白质相互作用; Rac1、Rhoa、Prkcz、Tgfr2、Itch 和 Ube2d3 位于网络的中心节点,移除它们,网络结构将被破坏(图 3)。

表 5 差异表达的 miRNAs 和 KEGG 信号通路

Table 5 Differential expressed miRNAs and KEGG pathway

miRNAs	登录号	通路名称	靶基因数	P
mmu-miR-1897-3p	04144	Endocytosis	12	0.00576
	04120	Ubiquitin mediated proteolysis	6	0.0108
	04360	Axon guidance	7	0.0194
	04350	TGF-beta signaling pathway	4	0.0143
	00310	Lysine degradation	5	0.000249
	03018	RNA degradation	5	0.033
	00600	Sphingolipid metabolism	3	0.00751
	02010	ABC transporters	3	0.0381
	00410	beta-Alanine metabolism	1	0.0305
mmu-miR-690	04144	Endocytosis	19	0.00576
	04120	Ubiquitin mediated proteolysis	16	0.0108
	04360	Axon guidance	12	0.0194
	04350	TGF-beta signaling pathway	10	0.0143
	00310	Lysine degradation	8	0.000249
	03018	RNA degradation	8	0.033
	00600	Sphingolipid metabolism	7	0.00751
	02010	ABC transporters	6	0.0381
	00410	beta-Alanine metabolism	5	0.0305
mmu-miR-7a-5p	00430	Taurine and hypotaurine metabolism	3	0.0495
	05200	Pathways in cancer	80	0.000000917
	04010	MAPK signaling pathway	62	0.0000231
	04810	Regulation of actin cytoskeleton	54	0.0000903
	04510	Focal adhesion	44	0.001
	04722	Neurotrophin signaling pathway	42	0.00000077
	04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	41	0.00023
	04020	Calcium signaling pathway	39	0.00205
	04910	Insulin signaling pathway	35	0.000207
	04514	Cell adhesion molecules (CAMs)	35	0.00178
	04062	Chemokine signaling pathway	35	0.037
	04120	Ubiquitin mediated proteolysis	34	0.000788
	04310	Wnt signaling pathway	34	0.00339
05152	Tuberculosis	34	0.035	
05160	Hepatitis C	33	0.000838	
04380	Osteoclast differentiation	32	0.0001	
05145	Toxoplasmosis	30	0.00224	
04660	T cell receptor signaling pathway	30	0.000208	
05142	Chagas disease (American trypanosomiasis)	30	0.0000255	
04110	Cell cycle	28	0.00846	

续表 5

miRNAs	登录号	通路名称	靶基因数	P
mmu-miR-7a-5p	04912	GnRH signaling pathway	27	0.00031
	04360	Axon guidance	27	0.0227
	05222	Small cell lung cancer	27	0.0000271
	04270	Vascular smooth muscle contraction	26	0.0186
	04012	ErbB signaling pathway	26	0.0186
	04670	Leukocyte transendothelial migration	26	0.0123
	04724	Glutamatergic synapse	25	0.0493
	04650	Natural killer cell mediated cytotoxicity	25	0.0353
	04664	Fc epsilon RI signaling pathway	25	0.000047
	05212	Pancreatic cancer	25	0.00000448
	04620	Toll-like receptor signaling pathway	25	0.00231
	05146	Amoebiasis	24	0.0268
	04370	VEGF signaling pathway	23	0.000161
	05220	Chronic myeloid leukemia	22	0.000295
	04512	ECM-receptor interaction	21	0.00591
	04666	Fc gamma R-mediated phagocytosis	20	0.0252
	05214	Glioma	20	0.000417
	05215	Prostate cancer	20	0.0201
	05218	Melanoma	20	0.00141
	04621	NOD-like receptor signaling pathway	20	0.0000567
	04070	Phosphatidylinositol signaling system	19	0.00883
	04662	B cell receptor signaling pathway	19	0.00659
	05210	Colorectal cancer	19	0.000943
	05410	Hypertrophic cardiomyopathy ( HCM)	18	0.0333
	04622	RIG-I-like receptor signaling pathway	18	0.00502
	04520	Adherens junction	17	0.0256
	04920	Adipocytokine signaling pathway	16	0.0244
	00514	Other types of O-glycan biosynthesis	15	0.000412
	05221	Acute myeloid leukemia	15	0.00918
	05223	Non-small cell lung cancer	15	0.00646
	05014	Amyotrophic lateral sclerosis ( ALS)	14	0.0183
	00860	Porphyryn and chlorophyll metabolism	13	0.00208
	00140	Steroid hormone biosynthesis	13	0.0347
	04150	mTOR signaling pathway	13	0.0261
	00040	Pentose and glucuronate interconversions	12	0.00101
	04930	Type II diabetes mellitus	12	0.0373
	00500	Starch and sucrose metabolism	12	0.0277
	00565	Ether lipid metabolism	10	0.0213
	00053	Ascorbate and aldarate metabolism	10	0.00162
	04710	Circadian rhythm-mammal	9	0.00167
	04140	Regulation of autophagy	9	0.045
	00910	Nitrogen metabolism	8	0.0095
04964	Proximal tubule bicarbonate reclamation	6	0.0485	

表 6 在 KEGG 信号通路中被两种 miRNAs 调控的靶基因<sup>(1)</sup>  
 Table 6 KEGG analyses of targeted genes of expressed miRNAs

基因号	基因名称	miRNAs 登录号
11848	Rhoa	MIMAT0003469; MIMAT0000677
12632	Cfl2	MIMAT0003469; MIMAT0000677
13841	Epha7	MIMAT0003469; MIMAT0000677
14985	H2-M10.1	MIMAT0007865; MIMAT0000677
16396	Itch	MIMAT0003469; MIMAT0000677
18762	Prkcz	MIMAT0003469; MIMAT0000677
19353	Rac1	MIMAT0003469; MIMAT0000677
20346	Sema3a	MIMAT0007865; MIMAT0000677
21813	Tgfb2	MIMAT0003469; MIMAT0000677
22193	Ube2e3	MIMAT0003469; MIMAT0000677
27401	Skp2	MIMAT0003469; MIMAT0000677
50995	Uba2	MIMAT0003469; MIMAT0000677
56752	Aldh9a1	MIMAT0007865; MIMAT0000677
59026	Huwe1	MIMAT0003469; MIMAT0000677
66105	Ube2d3	MIMAT0007865; MIMAT0000677
76980	Ube2ql1	MIMAT0007865; MIMAT0000677

注: (1) mmu-miR-1897-3p 登录号 MIMAT0007865; mmu-miR-690 登录号 MIMAT0003469; mmu-miR-7a-5p 登录号 MIMAT0000677

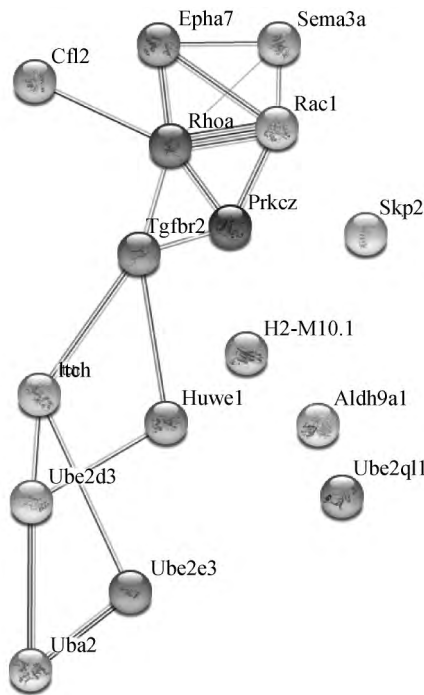


图 3 16 个靶基因的相互作用网络

Figure 3 The interaction network of 16 target genes

### 3 讨论

肥胖可引发胰岛素抵抗, 提高了 2 型糖尿病、肝脂肪变性和癌症等疾病的发病风险。其发病机制复杂, 可能与炎症反应、氧化应激、肠道菌群失调相关<sup>[5-6]</sup>。

已知 miRNAs 是基因表达的关键调节因素, 既往研究发现多种 miRNAs 的表达具有组织特异性或发育不同阶段的时间特异性, 提示 miRNAs 在许多生物学过程中有重要调控作用。2004 年, POY 等<sup>[7]</sup> 首次发现胰岛细胞特异性的 miR-375 能够调控胰岛素的分泌, 可能参与了 2 型糖尿病的病理过程, 据此, miRNAs 很快成为代谢性疾病的研究热点, 一些 miRNAs 已经被证实参与了糖、脂代谢及糖尿病的发生<sup>[8]</sup>。本研究前期实验发现, 高脂饲料诱导的胰岛素抵抗小鼠, 胰岛素作用的靶器官肝脏组织中 miR-1897-3p、miR-690 和 miR-7a-5p 表达下调。本实验采用茎-环逆转录实时荧光定量 PCR 方法<sup>[9]</sup> 验证了 3 种差异表达的基因。实验中, 经过实验条件的优化, 建立的实时荧光相对定量 PCR 检测方法内参基因和目的基因扩增效率一致, 特异性好, 具有良好的准确性和重现性, 确保了 miRNAs 定量的准确性。茎-环逆转录实时荧光定量 PCR 实验结果显示, 与正常对照组相比, 胰岛素抵抗小鼠 miR-1897-3p、miR-690 和 miR-7a-5p 三种 miRNAs 表达均下调, 与基因芯片结果一致。已有文献报道, 在急性肾损伤早期阶段, miR-1897-3p 与靶基因细胞周期依赖激酶底物 1 (cyclin-dependent kinase substrate 1, Nucks1) 的表达密切相关, 其通过调节 Nucks1 信号, 在炎症反应、细胞凋亡过程中起重要作用<sup>[10]</sup>; miR-690 的作用较为广泛, 可能参与了类固醇合成、成骨细胞分化、神经的保护作用和皮肤损伤修复等, 与糖代谢的研究发现, 在高糖作用下, 胰岛 β 细胞系 MIN6 中 miR-690 表达下调<sup>[8]</sup>, 可能参与了胰岛素的产生和分泌; miR-7a-5p 在大鼠哺乳期乳腺组织中表达下调, 可能与脂代谢相关基因的调节相关<sup>[11]</sup>。而 miR-1897-3p、miR-690 和 miR-7a-5p 在肥胖相关的胰岛素抵抗中的功能尚未报道。

通过对靶基因预测、GO 分类和 KEGG 信号通路进行分析, 发现差异表达的 3 种 miRNAs 均可作用于多个靶基因, 这些靶基因作用广泛, 但大多数属于分子功能中的蛋白结合类和细胞组分中的膜蛋白类, 从生物学过程看, 3 种差异表达 miRNAs 的靶基因大多数参与了转录调控; 在 KEGG 信号通路中, 有 16 种靶基因被两种 miRNAs 调控, 分析这 16 个靶基因的蛋白质互作网络, 其中有 8 个靶基因可与 4 种以上的蛋白质相互作用, Rac1、Rhoa、Prkcz、Tgfb2、Itch 和 Ube2d3 位于网络的中心节点。RAS 相关 C3 肉毒杆菌底物 1 (RAS-related C3 botulinum substrate 1,

Rac1) 属于 Rho GTP 酶超家族成员,为浆膜相关的小 GTP 酶,Rac1 可能与胰岛素信号通路中的重要信号转导子蛋白激酶 B(Akt) 存在交互作用,参与了肌肉细胞胰岛素刺激的葡萄糖摄取的调节作用<sup>[12-13]</sup>。miR-576-5p 可抑制 Rac1,使饱和脂肪酸对 JNK 的刺激减弱,缓解脂肪毒性,在预防肝脏疾病方面有重要作用<sup>[14]</sup>。Ras 同源基因家族成员 A(ras homolog gene family member A,Rhoa) 的活化可提高 Rho 激酶的活性,诱导抑制性的胰岛素受体底物 1(IRS-1) 丝氨酸位点磷酸化增多,促进脂质诱导的肌肉胰岛素抵抗<sup>[15]</sup>。蛋白激酶 C 亚型 Zeta(protein kinase C isoforms zeta,Prkcz) 为钙和甘油二酯非依赖的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,已知骨骼肌葡萄糖的吸收通过胰岛素信号调节,而 Prkcz 可被 Akt2 激活,从而磷酸化下游葡萄糖转运蛋白,促进葡萄糖的吸收<sup>[16]</sup>。转化生长因子- $\beta$  受体 2(transforming growth factor- $\beta$  receptor II,Tgfr2) 是转化生长因子- $\beta$  I(transforming growth factor- $\beta$  I,TGF- $\beta$ 1) 的受体,Tgfr2 结合 TGF- $\beta$ 1 能够促进脂肪来源的脂肪间质细胞分化,改善靶器官对胰岛素的敏感性,有研究表明,长期抑制 miR-21 可使 Tgfr2 表达水平上调,进而调节体脂含量,降低肥胖程度<sup>[17]</sup>。Itch 是一种 E3 泛素蛋白连接酶,在免疫和非免疫细胞中能够控制几种炎症信号通路,它可能通过调整浸润于脂肪组织的巨噬细胞类型,影响肥胖状态下机体的炎症状态,诱导胰岛素抵抗的发生<sup>[18]</sup>;miR-486 可通过直接抑制多个 NF- $\kappa$ B 的负性反馈环路(其中包括 Itch),保持 NF- $\kappa$ B 的活性<sup>[19]</sup>。泛素结合酶 E2D3(ubiquitin-conjugating enzyme E2D3,Ube2d3) 是泛素蛋白酶体系统的关键组成成分,新近研究发现,Ube2d3 的变化和妊娠期糖尿病患者空腹血糖升高相关<sup>[20]</sup>。据已有的文献,发现 Rac1、Rhoa、Prkcz、Tgfr2、Itch 和 Ube2d3 蛋白均与胰岛素信号通路相关或存在交联。

综上,肝脏 miR-4897-3p、miR-690 和 miR-7a-5p 可能参与了胰岛素抵抗的病理生理过程,其机制可能通过调节 Rac1、Rhoa、Prkcz、Tgfr2、Itch 和 Ube2d3 的表达,影响了胰岛素信号通路的正常级联反应。本研究通过检测肝脏组织 miRNAs,丰富了胰岛素抵抗中 miRNAs 差异表达谱,为进一步研究胰岛素抵抗中 miRNAs 作用及机制打下基础。

#### 参考文献

- [1] RANJANI H, MEHREEN T S, PRADEEPA R, et al. Epidemiology of childhood overweight & obesity in India: a systematic review [J]. Indian J Med Res, 2016, 143(2): 160-174.
- [2] ZHOU Tong, MENG Xianhong, CHE Hui, et al. Regulation of insulin resistance by multiple miRNA via targeting the GLUT4 signalling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(5): 2063-2078.
- [3] YANG Y, WANG J K. The functional analysis of MicroRNAs involved in NF- $\kappa$ B signaling [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(9): 1764-1774.
- [4] HONARDOOST M, SAROOKHANI M R, AREFIAN E, et al. Insulin resistance associated genes and miRNAs [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 174(1): 63-80.
- [5] 张岩,陈晓亭,宋惠珠,等.肥胖所导致的胰岛素抵抗分子机制的研究进展[J].检验医学,2014,29(7):774-778.
- [6] LEE B C, LEE J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(3): 446-462.
- [7] POY M N, ELIASSON L, KRUTZFELDT J, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion [J]. Nature, 2004, 432(7014): 226-230.
- [8] TANG Xiaoqing, MUNIAPPAN L, TANG Guiliang, et al. Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic  $\beta$  cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription [J]. RNA, 2009, 15(2): 287-293.
- [9] ZHANG Honghe, WANG Xianjun, LI Guoxiong, et al. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in gastric carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(20): 2883-2888.
- [10] BELLINGER M A, BEAN J S, RADER M A, et al. Concordant changes of plasma and kidney microRNA in the early stages of acute kidney injury: time course in a mouse model of bilateral renal ischemia-reperfusion [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93297.
- [11] ZHANG Chunlei, ZHAO Yulong, WANG Yanhong, et al. Deep RNA sequencing reveals that microRNAs play a key role in lactation in rats [J]. J Nutr, 2014, 144(8): 1142-1149.
- [12] SATOH T. Rho GTPases in insulin-stimulated glucose uptake [J]. Small Gtpases, 2014, 5(1): e28102.
- [13] SYLOW L, KLEINERT M, PEHMØLLER C, et al. Akt and Rac1 signaling are jointly required for insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle and downregulated in insulin resistance [J]. Cell Signal, 2014, 26(2): 323-331.
- [14] SORONEN J, YKI-JÄRVINEN H, ZHOU You, et



- al. Novel hepatic microRNAs upregulated in human nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Physiol Rep*, 2016, 4(1): e12661.
- [15] TAO Weiwei, WU Jing, XIE Bingxian, et al. Lipid-induced muscle insulin resistance is mediated by GGPPS via modulation of the RhoA/Rho kinase signaling pathway [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(33): 20086-20097.
- [16] LIE S, MORRISON J L, WILLIAMS-WYSS O, et al. Periconceptional undernutrition programs changes in insulin-signaling molecules and microRNAs in skeletal muscle in singleton and twin fetal sheep [J]. *Biol Reprod*, 2014, 90(1): 5.
- [17] SEEGER T, FISCHER A, MUHLY-REINHOLZ M, et al. Long-term inhibition of miR-21 leads to reduction of obesity in db/db mice [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2014, 22(11): 2352-2360.
- [18] MARINO A, MENGHINI R, FABRIZI M, et al. ITCH deficiency protects from diet-induced obesity [J]. *Diabetes*, 2014, 63: 550-561.
- [19] SONG Libing, LIN Chuyong, GONG Hui, et al. miR-486 sustains NF- $\kappa$ B activity by disrupting multiple NF- $\kappa$ B-negative feedback loops [J]. *Cell Res*, 2013, 23(2): 274-289.
- [20] BARI M F, NGO S, BASTIE C C, et al. Gestational diabetic transcriptomic profiling of microdissected human trophoblast [J]. *J Endocrinol*, 2016, 229(1): 47-59.

收稿日期: 2016-06-28

(上接第881页)

在 2.1%~4.0% 加工食品的供能占有所有零食能量的比例在 40.6%~47.7%。结果提示,随着在外就餐和加工食品食用的增加,其带来的高盐、高能量、高脂肪的健康风险不容忽视。

为了预防不良饮食行为可能带来的营养不良<sup>[11-12]</sup>,应加强营养教育,鼓励儿童青少年规律食用正餐;提高零食质量,尽量选用新鲜、低能量、低盐、低脂的食物,如蔬菜、水果、豆制品、乳制品等作为正餐以外的营养补充来源;家庭用餐时,应注意控制烹调油的用量,尽量选择蒸、炖、煮、煎的烹调方式替代油炸方式。

#### 参考文献

- [1] 国家卫生计生委疾病预防控制局. 中国居民营养与慢性病状况报告(2015年) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [2] 孟祥坤, 邹志勇, 尚晓瑞, 等. 儿童青少年饮食行为模式与超重肥胖的关系 [J]. *中国学校卫生*, 2015, 36(5): 648-650.
- [3] WANG Z, ZHAI F, ZHANG B, et al. Trends in Chinese snacking behaviors and patterns and the social-demographic role between 1991 and 2009 [J]. *Asia Pac J Clin Nutr* 2012, 21(2): 253-262.
- [4] 刘爱玲, 段一凡, 胡小琪, 等. 城市儿童零食消费行为 10 年变化分析 [J]. *中国学校卫生* 2011, 32(12): 1415-1417.
- [5] 段一凡, 刘爱玲, 张倩, 等. 城市儿童 1998 年和 2008 年早餐行为比较 [J]. *中国学校卫生* 2011, 32(12): 1417-1419.
- [6] 赵地, 张明明, 王天有, 等. 儿童至成年体质指数变化对成年血压水平的影响 [J]. *临床儿科杂志*, 2008, 26(8): 682-685, 689.
- [7] 中国营养学会. 中国居民膳食指南 [M]. 拉萨: 西藏人民出版社, 2008.
- [8] 胡小琪, 张倩, 张俊黎, 等. 城市儿童 1998 年和 2008 年食物喜好及购买情况比较 [J]. *中国学校卫生* 2011, 32(12): 1412-1414.
- [9] 苏虹, 单晓伟. 中小学生学习行为现状及其影响因素研究进展 [J]. *中华流行病学杂志* 2011, 32(8): 751-755.
- [10] 马冠生. 我国四城市儿童青少年饮食行为的现况调查 [J]. *中国食物与营养* 2001(1): 16-18.
- [11] 薛勇, 陈云, 赵艾, 等. 学龄儿童不良饮食行为对超重和肥胖的影响 [J]. *卫生研究* 2014, 43(5): 764-767.
- [12] 张欢, 罗米扬, 王质蕙, 等. 中国七省农村地区 1~7 岁儿童饮食行为及其与生长发育的关系 [J]. *卫生研究* 2013, 42(3): 375-380.

收稿日期: 2016-08-24