

## 研究论文

# 皮下白色脂肪组织局部过表达 miR-429 海绵改善肥胖及相关代谢紊乱

姚柳<sup>1, #, \*</sup>, 修雯靖<sup>1, #</sup>, 叶晨吉<sup>2</sup>, 贾新宇<sup>1</sup>, 董雯蕙<sup>1</sup>, 王春灵<sup>1</sup>

<sup>1</sup>天津医科大学生理学与病理生理学系, 天津 300070; <sup>2</sup>新乡医学院, 河南省医用组织再生重点实验室, 新乡 453000

**摘要:** 肥胖是世界范围内严重的健康问题。能量代谢失衡是肥胖以及相关能量代谢性疾病发生的重要原因。我们前期研究发现抑制 miR-429 可增加米色脂肪细胞解偶联蛋白-1 的表达, 但皮下白色脂肪组织局部抑制 miR-429 是否影响饮食导致的肥胖及相关代谢紊乱尚不清楚。本研究旨在探讨皮下白色脂肪组织局部过表达 miR-429 海绵(sponge)对肥胖及相关代谢紊乱的影响。分别给予 C57BL/6 小鼠双侧腹股沟脂肪垫定点注射对照腺相关病毒和表达 miR-429 海绵的腺相关病毒, 1 周后, 高脂饮食喂养 10 周构建肥胖动物模型, 检测小鼠体重、脂肪重、血糖、血脂以及肝脏脂质的变化。结果显示, 与对照组相比, 皮下白色脂肪组织过表达 miR-429 海绵减轻了小鼠体重和脂肪重量, 改善空腹血糖水平以及葡萄糖耐量, 降低血浆胆固醇水平, 并且缓解肝脏脂质沉积。机制探究发现抑制 miR-429 可显著上调脂肪细胞和脂肪组织中解偶联蛋白-1 的表达。以上结果表明, 局部抑制皮下白色脂肪组织中的 miR-429 可能通过上调解偶联蛋白-1 的表达改善肥胖及相关代谢紊乱, miR-429 是肥胖及相关代谢紊乱的潜在治疗靶点。

**关键词:** 高脂饮食; miR-429; 皮下白色脂肪组织; 肥胖; 脂代谢

## Local overexpression of miR-429 sponge in subcutaneous white adipose tissue improves obesity and related metabolic disorders

YAO Liu<sup>1, #, \*</sup>, XIU Wen-Jing<sup>1, #</sup>, YE Chen-Ji<sup>2</sup>, JIA Xin-Yu<sup>1</sup>, DONG Wen-Hui<sup>1</sup>, WANG Chun-Jiong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology and Pathophysiology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; <sup>2</sup>Henan Key Laboratory of Medical Tissue Regeneration, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China

**Abstract:** Obesity is a worldwide health problem. An imbalance in energy metabolism is an important cause of obesity and related metabolic diseases. Our previous studies showed that inhibition of miR-429 increased the protein level of uncoupling protein 1 (UCP1) in beige adipocytes; however, whether local inhibition of miR-429 in subcutaneous adipose tissue affects diet-induced obesity and related metabolic disorders remains unclear. The aim of this study was to investigate the effect of local overexpression of miR-429 sponge in subcutaneous adipose tissue on obesity and related metabolic disorders. The control adeno-associated virus (AAV) or AAV expressing the miR-429 sponge was injected into mouse inguinal white adipose tissue. Seven days later, the mice were fed a high-fat diet for 10 weeks to induce obesity. The effects of the miR-429 sponge on body weight, adipose tissue weight, plasma glucose and lipid levels, and hepatic lipid content were explored. The results showed that the overexpression of miR-429 sponge in subcutaneous white adipose tissue reduced body weight and fat mass, decreased fasting blood glucose and plasma cholesterol levels, improved glucose tolerance, and alleviated hepatic lipid deposition in mice. Mechanistic investigation showed that the inhibition of miR-429 significantly upregulated the expression of UCP1 in adipocytes and adipose tissue. These results suggest that local inhibition of miR-429 in subcutaneous white adipose tissue ameliorates obesity and related metabolic disorders potentially by up-regulating UCP1, and miR-429 is a potential therapeutic target for the treatment of obesity and related metabolic disorders.

**Key words:** high-fat diet; miR-429; subcutaneous white adipose tissue; obesity; lipid metabolism

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82070305, 82270448, 82370637).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. Tel: +86-22-83336591; E-mail: [yaoliu@tmu.edu.cn](mailto:yaoliu@tmu.edu.cn)

随着人们生活水平的提高以及饮食习惯的改变,肥胖逐渐成为人类健康的严重威胁。肥胖可以诱发脂肪肝、2型糖尿病、动脉粥样硬化等代谢性疾病<sup>[1]</sup>。能量摄取和消耗失衡是肥胖以及相关能量代谢性疾病发生的重要原因。白色脂肪组织是人体含量最多的脂肪组织,主要分布在皮下、内脏和骨髓,参与脂肪的储存和动员。在肥胖情况下,皮下脂肪组织不能进一步扩张以储存多余的能量,导致其它组织的脂质异位沉积<sup>[2-4]</sup>。肥胖可通过促进白色脂肪细胞线粒体断裂和功能障碍,抑制能量消耗,导致体重增加和代谢功能障碍<sup>[5,6]</sup>。在线粒体中,解偶联蛋白1 (uncoupling protein 1, UCP1)通过将氧化磷酸化与ATP解偶联,从而增加能量消耗与产热<sup>[7]</sup>。皮下脂肪组织UCP1表达增多可促进能量消耗,改善肥胖及相关的代谢紊乱<sup>[8]</sup>。

微小RNA (microRNA, miRNA)是一类天然生成的小型非编码RNA,通过结合靶mRNA的3'-非翻译区(3'-UTRs),引起翻译抑制或降解,从而发挥其生物学功能<sup>[9]</sup>。miRNA在脂肪形成、代谢和肿瘤发生等多种病理生理过程中发挥着不可替代的作用。研究表明,miR-155、miR-196、miR-82及miR-203等miRNA可以调控棕色脂肪细胞生成和米色脂肪细胞形成<sup>[10-13]</sup>。我们前期研究发现,寒冷刺激可通过下调皮下白色脂肪组织中miR-429的水平,促进Yes相关蛋白(Yes-associated-protein, YAP)表达;YAP表达水平的提高促进了米色脂肪形成。进一步研究发现在米色脂肪细胞中抑制miR-429显著增加了UCP1的表达<sup>[14]</sup>。但在皮下白色脂肪中抑制miR-429是否对饮食诱导的肥胖及相关代谢紊乱具有改善作用仍未知。

本研究采用皮下白色脂肪组织局部注射腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)的方法,在C57BL/6小鼠皮下脂肪组织中局部过表达miR-429海绵(sponge),研究其对高脂饮食诱导的肥胖及血脂、血糖及肝脏脂质沉积的影响,以期改善高脂饮食引起的肥胖及代谢紊乱提供一种新的方法及理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

油红O购自Sigma;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;甘油三酯(triglyceride, TG)及胆固醇

(cholesterol, CHOL)测定试剂盒购自北京中生北控生物科技股份有限公司。

### 1.2 动物实验

SPF级8周龄C57BL/6雄性小鼠,体重20~25g,分成两组,分别对腹股沟脂肪垫定点注射表达miR-429海绵的AAV(AAV-miR-429 sponge)和对照AAV,病毒注射一周后自由采食45%高脂饮食(江苏美迪森)。定期称取小鼠体重。高脂饮食喂养10周后,给小鼠进行葡萄糖耐量实验,并对小鼠进行麻醉取血安乐死以后留取相应组织。取脂肪组织称重并进行H&E染色,取肝脏组织切片后进行油红O染色,取肝脏组织进行肝脏脂质提取,并测定CHOL和TG含量。本实验的研究方案和实验动物使用均符合天津医科大学动物伦理规范。

### 1.3 AAV-miR-429 sponge构建

AAV-miR-429 sponge由上海吉凯基因化学技术有限公司构建,载体为GV412。miR429-3P-sponge序列为:5'-ACGGCATTACGACCAGTATTACTTCACGGCATTACGACCAGTATTACTTCACGGCATTACGACCAGTATTACTTCACGGCATTACGACCAGTATTACTTCACGGCATTACGACCAGTATTACTTCACGGCATTACGACCAGTATTACTTCACGGCATTACGACCAGTATTACTTC-3'。对照AAV用不包含miR429-3P-sponge的空载体构建。

### 1.4 腹股沟脂肪垫定点注射AAV

提前配制AAV生理盐水溶液( $1.0 \times 10^{10}$  v.g./25  $\mu$ L生理盐水),置于冰上备用。8周龄野生型C57BL/6小鼠腹腔注射阿佛丁(1.2%, PBS配制, 30  $\mu$ L/g体重)以麻醉小鼠。在小鼠皮下脂肪即腹股沟区域涂脱毛膏脱毛,并用75%酒精消毒。将小鼠仰躺,在脂肪垫部位剪开一个5~8 mm的切口,用镊子轻提且空悬小鼠外皮,将腹股沟白色脂肪组织(inguinal white adipose tissue, iWAT)暴露于视野中。注意不要移动脂肪垫的位置。用注射器将AAV多点注射入脂肪垫中。在注射过程中,用钝镊子轻轻提着腹股沟脂肪垫组织,防止溶液流出。之后,将小鼠外皮缝合。另一侧腹股沟脂肪垫采用同样的方法注射。

### 1.5 葡萄糖耐量实验

早晨9点左右开始小鼠禁食6 h。按照2 g/kg体重给小鼠腹腔注射30%葡萄糖/PBS溶液,即注射体积( $\mu$ L) = 体重(g)  $\times$  20 / 3。分别在注射葡萄糖后0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min和120 min测量并记录小鼠血糖值。

## 1.6 H&E 染色

取脂肪组织的石蜡切片, 依次浸泡环保型脱蜡透明剂 10 min、新鲜环保型透明剂 10 min、100% 酒精 10 min 后, 再分别浸润 100%、95%、85%、75% 酒精 5 min 以完全脱蜡。之后用苏木素染色 1 min, 自来水返蓝后, 伊红染色 30 s 后, 用上行梯度酒精分色, 即 75%、85%、95% 酒精各浸 5 s 后, 100% 酒精浸 3 min, 换新鲜 100% 酒精再浸 3 min; 放入环保型脱蜡透明剂中浸 5 min, 换新鲜环保型脱蜡透明剂再浸 5 min; 使用中性树脂进行封片, 放于 37 °C 烘箱烘干后, 用徕卡倒置显微镜进行拍摄。

## 1.7 油红 O 染色

将肝脏组织冰冻切片室温平衡 15 min, 4% 多聚甲醛固定 10 min; PBS 洗 3 次; 油红 O 染色 30 min; 最后用 50% 甘油封片, 避光保存, 使用光学生物显微镜观察或拍照。

## 1.8 肝脏脂质的提取及测定

切取约 30 mg 肝脏组织, 精确称量, 记录重量; 将肝脏组织于 1 mL 萃取液(氯仿: 甲醇=2: 1)中匀浆; 静置 16 h; 加入蒸馏水 300  $\mu$ L, 12000 g 离心 10 min; 吸取下层有机相, 氮气吹干; 用含 5% Trion X-100 的溶液溶解吹干的有机相; 用 TG 及 CHOL 测定试剂盒测定肝脏组织中 TG 及 CHOL 的含量。

## 1.9 Western blot

提取肝脏组织和原代肝细胞总蛋白, 用 10% SDS-PAGE 分离, 然后转移到硝酸纤维素膜上, 用抗 UCP1 (1:1000)和  $\beta$ -actin (1:5000)抗体在 4 °C 下孵育过夜。 $\beta$ -actin 为内参。

## 1.10 实时荧光定量 PCR

将脂肪组织匀浆, 提取总 RNA, 利用 miRNA 逆转录试剂盒进行逆转录, 然后进行实时荧光定量 PCR。每个 PCR 体系包括: 5  $\mu$ L 2  $\times$  SYBR Premix、0.2  $\mu$ L 上游引物(5'-TAATACTGTCTGGTAATGCCGT-3')、0.2  $\mu$ L 下游引物(5'-GATCGCCCTTCTACGTCGTAT-3')、4  $\mu$ L cDNA、5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。U6 为内参。

## 1.11 3T3-L1 前脂肪细胞培养、诱导分化及 miR-429 inhibitor 处理

3T3-L1 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养。待细胞接触抑制 2 天后, 加含有甲基异丁基黄嘌呤(0.5 mmol/L)、地塞米松(1  $\mu$ mol/L)和胰岛素(1  $\mu$ g/mL)的诱导培养基诱导分化 2 天, 随后细胞培养于含 1  $\mu$ g/mL 胰岛素的维持培养液中以诱导其向白色脂肪细胞分化。在诱导分化的第 5 天, 转染

miR-429 inhibitor (5'-ACGGCAUUACCAGACAGU-AUUA-3')或阴性对照。第 7 天, 收集细胞进行后续 UCP1 的蛋白表达检测。

## 1.12 数据分析

数据均以 mean  $\pm$  SEM 表示, 采用 GraphPad Prism 8.0 软件分析、作图。首先采用 Shapiro-Wilk 正态性检验分析数据正态性。对于符合正态分布的数据, 两独立样本均数比较采用 Student's *t* 检验, 小鼠体重增加量的统计分析和葡萄糖耐量实验采用 two-way ANOVA 分析。对于不符合正态分布的数据, 使用 Mean-Whitney 检验进行两组间比较分析。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 皮下白色脂肪组织局部过表达 miR-429 海绵降低了脂肪组织中 miR-429 的水平

我们对 C57BL/6 小鼠双侧 iWAT 垫进行多点注射 AAV-miR-429 sponge 和对照 AAV (每个脂肪垫注射病毒量为  $1.0 \times 10^{10}$  v.g./25  $\mu$ L)。AAV 注射 1 周后, 给予两组小鼠高脂饮食喂养 10 周。首先对脂肪组织中 miR-429 的水平进行了检测, 结果显示皮下白色脂肪组织局部过表达 miR-429 海绵显著降低了脂肪组织中 miR-429 的水平(图 1A, B)。

## 2.2 抑制皮下白色脂肪组织中的 miR-429 降低了高脂饮食喂养小鼠的体重和 iWAT 重量

进一步的研究发现注射 AAV-miR-429 sponge 的小鼠, 其体重增长低于对照小鼠(图 2A)。称取皮下脂肪组织重量, 发现注射 AAV-miR-429 sponge 的小鼠附睾白色脂肪组织(epididymal white adipose tissue, eWAT)重量没有明显变化, iWAT 重量显著低于对照组(图 2B, C)。对 iWAT 进行 H&E 染色发现, 注射 AAV-miR-429 sponge 的小鼠脂肪细胞面积小于对照组(图 2D)。以上结果表明, 注射 AAV-miR-429 sponge 降低了高脂饮食喂养小鼠的体重和皮下白色脂肪组织重量。

## 2.3 抑制皮下白色脂肪组织中的 miR-429 改善肥胖引起的空腹血糖水平升高和葡萄糖耐量受损

高脂饮食引起的脂肪和体重增加通常与葡萄糖耐量和胰岛素敏感性降低有关。我们对两组小鼠的空腹血糖水平进行了检测, 结果显示注射 AAV-miR-429 sponge 的小鼠空腹血糖水平显著低于对照组小鼠(图 3A); 同时, 注射 AAV-miR-429 sponge 改善了高脂饮食引起的葡萄糖耐量受损(图 3B)。以上结果表明, 抑制皮下脂肪组织中的 miR-429 改善了

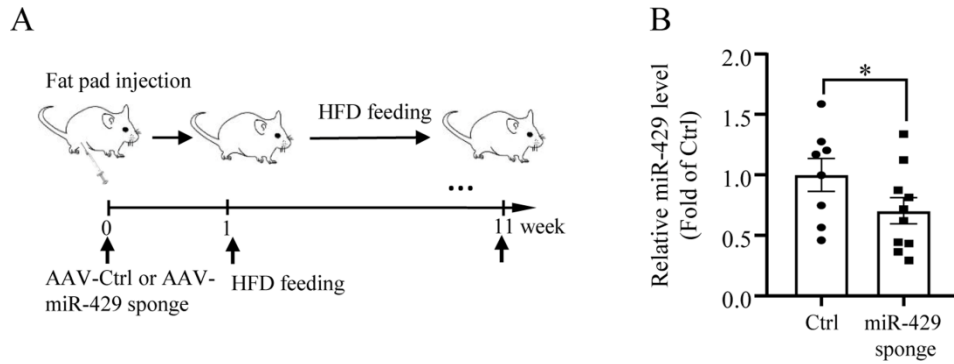


图 1. 腹股沟脂肪组织过表达 miR-429 海绵抑制了脂肪组织中 miR-429 的表达

Fig. 1. Overexpression of miR-429 sponge in inguinal white adipose tissue (iWAT) inhibited miR-429 level in adipose tissue. Male C57BL/6 mice (8-week-old) were injected with adeno-associated virus (AAV)-Ctrl or AAV-miR-429 sponge to iWAT 7 days before the mice were fed with a high-fat diet (HFD) for 10 weeks. *A*: Animal model diagram. *B*: Relative miR-429 level in iWAT. Data are mean  $\pm$  SEM ( $n = 8-10$ ).  $^*P < 0.05$ .

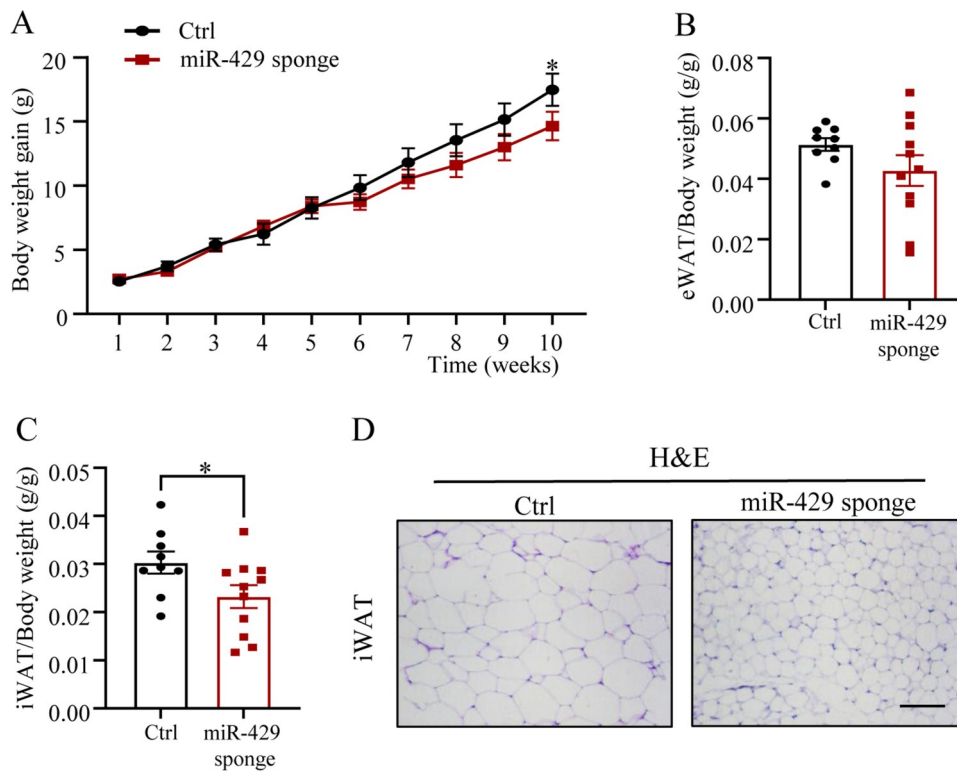


图 2. 腹股沟脂肪组织过表达 miR-429 海绵减轻了高脂饮食喂养小鼠的体重和腹股沟脂肪重量

Fig. 2. Overexpression of miR-429 sponge in inguinal white adipose tissue (iWAT) decreased body and iWAT weight of high-fat diet (HFD)-fed mice. *A*: Body weight gain of these mice. *B*, *C*: Ratios of epididymal white adipose tissue (eWAT) to body weight and iWAT to body weight. *D*: Representative H&E staining for iWAT. Scale bar, 100  $\mu$ m. Data are mean  $\pm$  SEM ( $n = 9-11$ ).  $^*P < 0.05$  vs corresponding control groups.

肥胖引起的葡萄糖代谢紊乱。

#### 2.4 抑制皮下脂肪组织中的 miR-429 降低了高脂饮食喂养小鼠的血浆 CHOL 水平

肥胖可促进血脂紊乱。血浆 CHOL 水平升高可增加动脉粥样硬化等代谢性疾病的发病风险。为了

明确 miR-429 对血浆脂质水平的影响，我们接着检测了血浆 CHOL 和 TG 水平，发现注射 AAV-miR-429 sponge 的小鼠血浆 CHOL 水平明显降低，而 TG 水平没有明显变化(图 4A, B)。因此，抑制 miR-429 降低高脂饮食喂养小鼠的血浆 CHOL 水平。

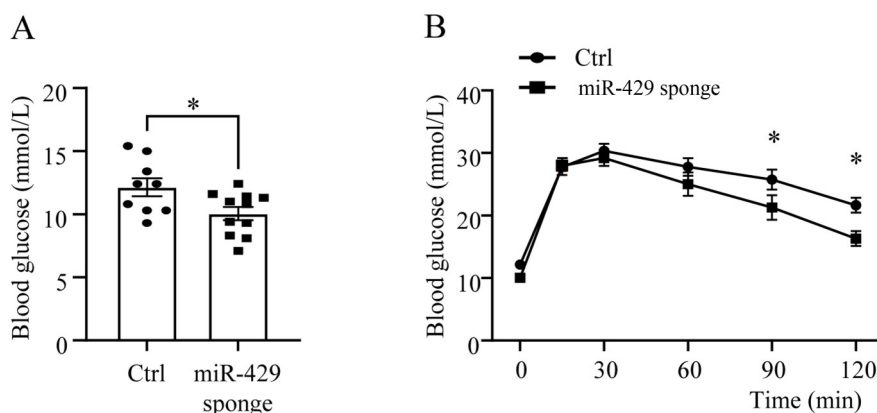


图 3. 腹股沟脂肪组织过表达 miR-429 海绵改善高脂饮食喂养小鼠的葡萄糖耐量

Fig. 3. Overexpression of miR-429 sponge in inguinal white adipose tissue (iWAT) improved glucose tolerance of high-fat diet (HFD)-fed mice. A: Fasting blood glucose level. B: Glucose tolerance test. Data are mean  $\pm$  SEM ( $n = 9-11$ ). \* $P < 0.05$ .

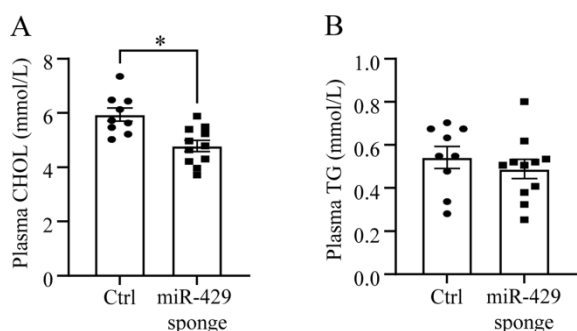


图 4. 腹股沟脂肪组织过表达 miR-429 海绵降低了血浆胆固醇水平

Fig. 4. Overexpression of miR-429 sponge in inguinal white adipose tissue (iWAT) decreased plasma cholesterol (CHOL) level in high-fat diet (HFD)-fed mice. A: Plasma CHOL level. B: Plasma triglyceride (TG) level. Data are mean  $\pm$  SEM ( $n = 9-11$ ). \* $P < 0.05$ .

## 2.5 抑制皮下脂肪组织中的 miR-429 缓解了肥胖引起的肝脏脂质沉积

肥胖和过度的体重增加可促进外周组织，特别是肝脏的脂质沉积。为此，我们对肝脏的脂质沉积情况进行了分析，通过油红 O 染色发现，注射 AAV-miR-429 sponge 显著减轻了高脂饮食引起的肝脏脂质沉积(图 5A)。进一步对肝脏中脂质水平进行检测，发现注射 AAV-miR-429 sponge 不影响肝脏 CHOL 水平，但显著降低了肝脏 TG 水平(图 5B, C)。此外，血浆 ALT 的水平无明显改变(图 5D)。以上结果表明，抑制 miR-429 缓解了肥胖引起的肝脏脂质沉积。

## 2.6 抑制皮下脂肪组织和脂肪细胞中的 miR-429 上调了 UCP1 的表达

UCP1 是调节机体产热和能量代谢的关键靶点。

我们前期的研究表明抑制 miR-429 可显著增加米色脂肪细胞 UCP1 蛋白水平<sup>[14]</sup>。为了明确在白色脂肪组织中抑制 miR-429 改善肥胖的潜在机制，我们检测了小鼠腹股沟脂肪组织中 UCP1 的表达，结果显示用 miR-429 海绵抑制 miR-429 显著增加了高脂喂养情况下白色脂肪组织 UCP1 的表达(图 6A, B)。此外，在 3T3-L1 细胞诱导分化的白色脂肪细胞中用 miR-429 inhibitor 抑制 miR-429 表达，同样发现 UCP1 蛋白水平显著增加(图 6C, D)。以上证据表明，UCP1 水平增加是过表达 miR-429 海绵改善肥胖及相关代谢紊乱的重要机制。

## 3 讨论

肥胖是世界范围内的健康问题，其可造成一系列代谢紊乱，包括血脂紊乱、糖代谢异常、脂肪肝等。miR-429 是 miR-200 家族的成员，在脂肪形成中发挥了重要作用。已发表研究及相关数据库表明 miR-429 的表达受到了高脂饮食的调控。GEO 数据集 GSE216923 表明，高脂饮食喂养小鼠白色脂肪组织中 miR-429 水平高于正常饮食小鼠(expression value 70.85 vs 3.8)<sup>[15]</sup>。Chao 等发现高脂饮食喂养鸡的腹部脂肪中 miR-429 显著高于低脂喂养组<sup>[16]</sup>。以上研究提示，高脂饮食喂养可增加白色脂肪组织中 miR-429 的水平。我们前期研究发现 miR-429 水平在寒冷刺激下降低，过表达 miR-429 抑制了米色脂肪形成<sup>[14]</sup>。基于以上证据，我们此项研究聚焦在 miR-429 海绵对肥胖及相关代谢紊乱的改善作用。

脂肪组织是葡萄糖稳态和脂质稳态的重要整合者。肥胖(过多的脂肪)和脂肪营养不良(过少的脂肪)

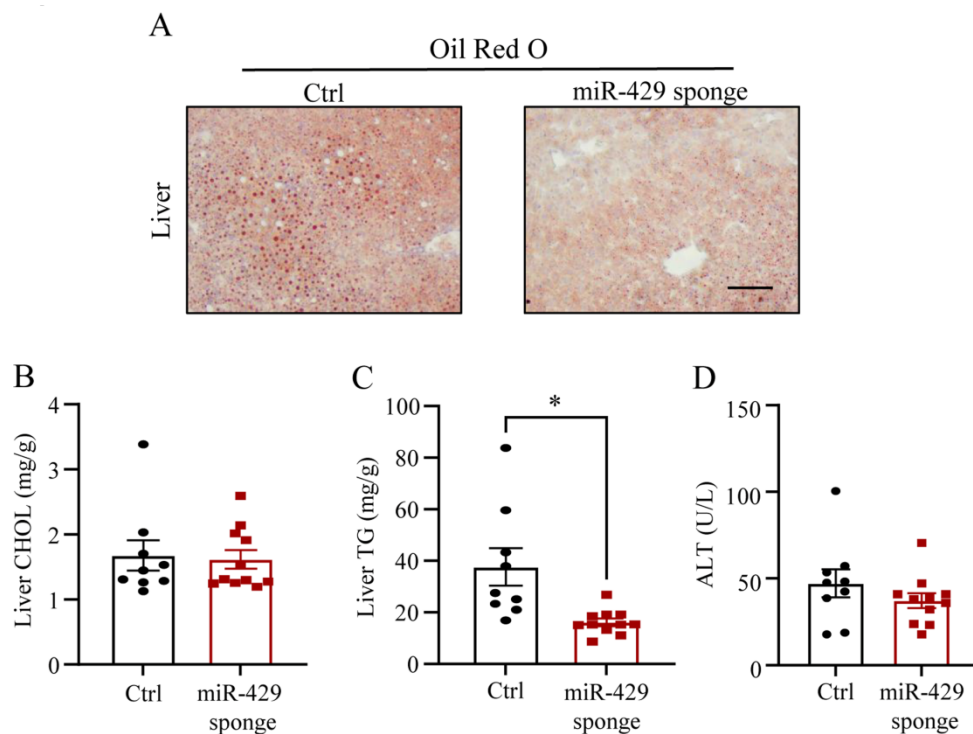


图 5. 腹股沟脂肪组织过表达 miR-429 海绵改善肥胖导致的肝脏脂代谢紊乱

Fig. 5. Overexpression of miR-429 sponge in inguinal white adipose tissue (iWAT) ameliorated hepatic steatosis of high-fat diet (HFD)-fed mice. *A*: Representative oil red O staining for lipid deposition in liver. Scale bar, 100  $\mu$ m. *B*, *C*: Hepatic cholesterol (CHOL) and triglyceride (TG) contents. *D*: Plasma alanine transaminase (ALT) level. Data are mean  $\pm$  SEM ( $n = 9-11$ ). \* $P < 0.05$ .

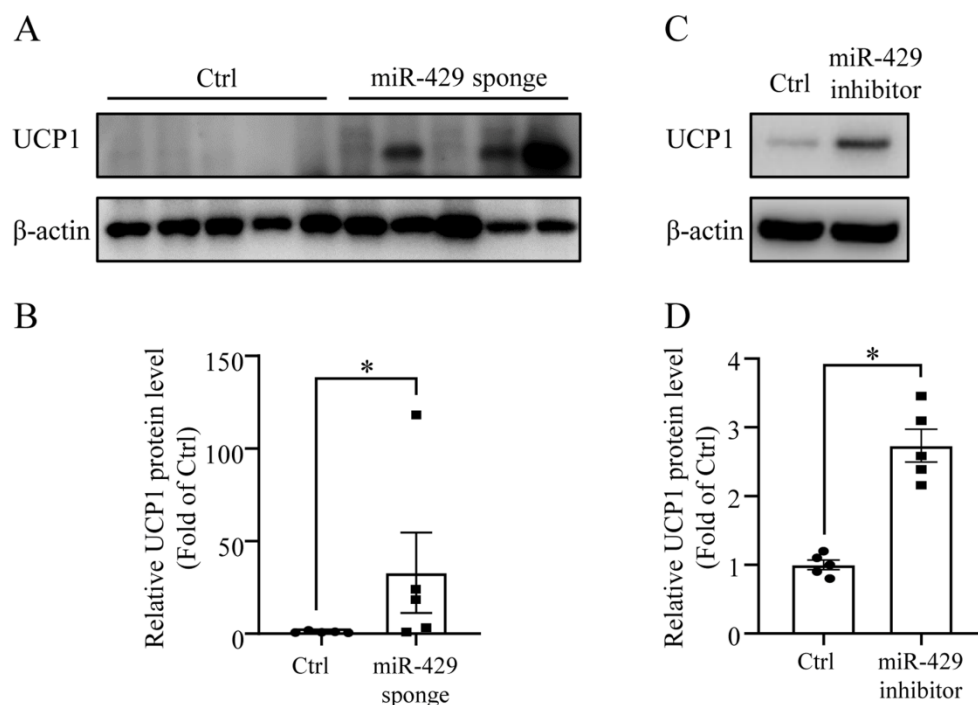


图 6. 抑制腹股沟脂肪组织和白色脂肪细胞中 miR-429 均增加 UCP1 蛋白水平

Fig. 6. Inhibition of miR-429 significantly upregulated the expression of uncoupling protein-1 (UCP1) in adipocytes and adipose tissue. *A*, *B*: Inhibition of miR-429 in inguinal white adipose tissue (iWAT) increased UCP1 level. The protein level of UCP1 was determined by Western blot. *C*, *D*: 3T3-L1 adipocytes were transfected with miR-429 inhibitor or negative control for 48 h. The protein level of UCP1 was determined by Western blot. Data are mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). \* $P < 0.05$ .

都与胰岛素抵抗和高血糖有关。当热量摄入长期超过能量消耗时, 脂肪组织扩张以容纳多余的能量。如果在此期间脂肪细胞分化不充分, 不能产生足够的新脂肪细胞, 则现有的脂肪细胞会发生肥大和功能失调, 表现为炎症和胰岛素抵抗<sup>[17]</sup>。本研究发现与高脂饮食引起的肥胖小鼠相比, 抑制 miR-429 降低了小鼠空腹血糖水平, 改善了小鼠葡萄糖耐受。这表明抑制皮下脂肪组织中的 miR-429 改善了肥胖引起的糖代谢紊乱。同时, 脂质组学研究表明肥胖与脂质代谢功能障碍之间存在关联<sup>[18]</sup>。脂肪组织是体内 TG 和 CHOL 的重要储存库<sup>[19]</sup>。本研究发现, 抑制 miR-429 显著降低了肥胖小鼠血浆 CHOL 水平, 不影响血浆 TG 水平。肥胖状态下脂肪组织功能障碍, 脂肪炎症、脂肪因子分泌异常等可导致肝脏脂质沉积<sup>[19]</sup>。本研究结果表明, 抑制 miR-429 在改善肥胖的同时减轻了肝脏的脂质沉积。

我们前期研究结果表明, 在米色脂肪形成过程中, miR-429 水平降低, 增加了其靶基因 YAP 的蛋白水平。YAP 通过 TEAD 促进 UCP1 表达<sup>[14, 20]</sup>, 参与米色脂肪形成。但在棕色脂肪组织中, 寒冷刺激不能改变 miR-429 的水平<sup>[14]</sup>。我们进一步研究发现, 在米色脂肪细胞中抑制 miR-429 增加了 UCP1 的表达<sup>[14]</sup>, 这提示抑制皮下脂肪组织中的 miR-429 可能通过增加能量消耗改善肥胖及相关代谢紊乱。相关研究表明脂肪组织 UCP1 的表达增加可通过多种途径改善肥胖及相关代谢紊乱。UCP1 缺失小鼠肝脏中 TG 堆积增加<sup>[21]</sup>。靶向脂肪组织递送甲状腺激素通过增加脂肪组织的 UCP1 表达和产热, 改善肥胖以及包括肝脏脂代谢紊乱、血脂紊乱等在内的肥胖相关代谢性紊乱<sup>[22]</sup>。UCP1 阳性的脂肪细胞通过拮抗琥珀酸-琥珀酸受体 1 信号通路来对抗肝脏炎症和病理, 以及改善糖耐受<sup>[23]</sup>。在本研究中, 我们对小鼠 iWAT 以及 3T3-L1 细胞诱导分化的白色脂肪细胞中 UCP1 的表达进行检测, 发现抑制 miR-429 显著增加了高脂喂养情况下白色脂肪组织以及脂肪细胞中 UCP1 的表达。以上证据表明, UCP1 水平增加是 miR-429 海绵改善肥胖及相关代谢紊乱的重要机制。我们前期研究表明 miR-429 可靶向 YAP 从而抑制 UCP1 的表达<sup>[14]</sup>。有研究报道, miR-429 通过下调其靶基因 LPIN1 促进脂肪形成<sup>[16]</sup>。因此, miR-429 可能还存在其他靶点参与对 UCP1 的调节及机体脂代谢紊乱, 需要我们今后开展工作进行进一步探索。

多项研究表明皮下脂肪组织递送药物可有效改

善肥胖及相关代谢性疾病。已有研究探讨经皮下脂肪组织递送给药, 包括  $\beta$ 3-肾上腺素能受体激动剂 (CL316243)、甲状腺激素 (T3)、罗格列酮 (ROSI)、胆酸等, 结果表明其促进褐变, 从而增加产热, 改善肥胖<sup>[24-26]</sup>。本研究通过皮下脂肪组织局部注射 AAV 的方式过表达 miR-429 海绵改善了肥胖及相关代谢紊乱, 为治疗肥胖及相关代谢紊乱提供了新的思路。

综上所述, 本研究在前期研究基础上, 研究了皮下脂肪组织局部过表达 miR-429 海绵对肥胖及相关代谢紊乱的影响, 发现局部抑制皮下白色脂肪组织中的 miR-429 可能通过上调 UCP1 的表达改善肥胖及相关代谢紊乱, miR-429 是肥胖及相关代谢紊乱的潜在治疗靶点。

## 参考文献

- 1 Engin A. *The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome*. Adv Exp Med Biol 2017; 960: 1-17.
- 2 Goossens GH. *The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance*. Physiol Behav 2008; 94(2): 206-218.
- 3 Rosen ED, Spiegelman BM. *What we talk about when we talk about fat*. Cell 2014; 156(1-2): 20-44.
- 4 Stinkens R, Goossens GH, Jocken JW, Blaak EE. *Targeting fatty acid metabolism to improve glucose metabolism*. Obes Rev 2015; 16(9): 715-757.
- 5 Xia W, Veeragandham P, Cao Y, Xu Y, Rhyne TE, Qian J, Hung CW, Zhao P, Jones Y, Gao H, Liddle C, Yu RT, Downes M, Evans RM, Rydén M, Wabitsch M, Wang Z, Hakozaki H, Schöneberg J, Reilly SM, Huang J, Saltiel AR. *Obesity causes mitochondrial fragmentation and dysfunction in white adipocytes due to RalA activation*. Nat Metab 2024; 6(2): 273-289.
- 6 Heden TD, Franklin MP, Dailey C, Mashek MT, Chen C, Mashek DG. *ACOT1 deficiency attenuates high-fat diet-induced fat mass gain by increasing energy expenditure*. JCI Insight 2023; 8(18): e160987.
- 7 Chouchani ET, Kazak L, Spiegelman BM. *New advances in adaptive thermogenesis: UCP1 and beyond*. Cell Metab 2019; 29(1): 27-37.
- 8 Lim J, Park HS, Kim J, Jang YJ, Kim JH, Lee Y, Heo Y. *Depot-specific UCP1 expression in human white adipose tissue and its association with obesity-related markers*. Int J Obes (Lond) 2020; 44(3): 697-706.
- 9 Bartel DP. *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell 2004; 116(2): 281-297.
- 10 Arner P, Kulyte A. *MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity*. Nat Rev Endocrinol 2015; 11(5): 276-288.

- 11 Kim HJ, Cho H, Alexander R, Patterson HC, Gu M, Lo KA, Xu D, Goh VJ, Nguyen LN, Chai X, Huang CX, Kovalik JP, Ghosh S, Trajkovski M, Silver DL, Lodish H, Sun L. [MicroRNAs are required for the feature maintenance and differentiation of brown adipocytes](#). *Diabetes* 2014; 63(12): 4045-4056.
- 12 Chen Y, Siegel F, Kipschull S, Haas B, Frohlich H, Meister G, Pfeifer A. [miR-155 regulates differentiation of brown and beige adipocytes via a bistable circuit](#). *Nat Commun* 2013; 4: 1769.
- 13 Mori M, Nakagami H, Rodriguez-Araujo G, Nimura K, Kaneda Y. [Essential role for miR-196a in brown adipogenesis of white fat progenitor cells](#). *PLoS Biol* 2012; 10(4): e1001314.
- 14 Ye C, Duan J, Zhang X, Yao L, Song Y, Wang G, Li Q, Wang B, Ai D, Wang C, Zhu Y. [Cold-induced Yes-associated-protein expression through miR-429 mediates the browning of white adipose tissue](#). *Sci China Life Sci* 2021; 64(3): 404-418.
- 15 Li R, Sano T, Mizokami A, Fukuda T, Shinjo T, Iwashita M, Yamashita A, Sanui T, Nakatsu Y, Sotomaru Y, Asano T, Kanematsu T, Nishimura F. [miR-582-5p targets Skp1 and regulates NF-kappaB signaling-mediated inflammation](#). *Arch Biochem Biophys* 2023; 734: 109501.
- 16 Chao X, Guo L, Wang Q, Huang W, Liu M, Luan K, Jiang J, Lin S, Nie Q, Luo W, Zhang X, Luo Q. [miR-429-3p/LPIN1 axis promotes chicken abdominal fat deposition via PPARgamma pathway](#). *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 595637.
- 17 Sorisky A. [Effect of high glucose levels on white adipose cells and adipokines-fuel for the fire](#). *Int J Mol Sci* 2017; 18(5): 944.
- 18 Morigny P, Boucher J, Arner P, Langin D. [Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics](#). *Nat Rev Endocrinol* 2021; 17(5): 276-295.
- 19 Wang M, Gao M, Liao J, Qi Y, Du X, Wang Y, Li L, Liu G, Yang H. [Adipose tissue deficiency results in severe hyperlipidemia and atherosclerosis in the low-density lipoprotein receptor knockout mice](#). *Biochim Biophys Acta* 2016; 1861(5): 410-418.
- 20 Tharp KM, Kang MS, Timblin GA, Dempersmier J, Dempsey GE, Zushin PH, Benavides J, Choi C, Li CX, Jha AK, Kajimura S, Healy KE, Sul HS, Saijo K, Kumar S, Stahl A. [Actomyosin-mediated tension orchestrates uncoupled respiration in adipose tissues](#). *Cell Metab* 2018; 27(3): 602-615.e4.
- 21 Bond LM, Ntambi JM. [UCP1 deficiency increases adipose tissue monounsaturated fatty acid synthesis and trafficking to the liver](#). *J Lipid Res* 2018; 59(2): 224-236.
- 22 Chen K, Cheong LY, Gao Y, Zhang Y, Feng T, Wang Q, Jin L, Honore E, Lam KSL, Wang W, Hui X, Xu A. [Adipose-targeted triiodothyronine therapy counteracts obesity-related metabolic complications and atherosclerosis with negligible side effects](#). *Nat Commun* 2022; 13(1): 7838.
- 23 Mills EL, Harmon C, Jedrychowski MP, Xiao H, Garrity R, Tran NV, Bradshaw GA, Fu A, Szpyt J, Reddy A, Prendeville H, Danial NN, Gygi SP, Lynch L, Chouchani ET. [UCP1 governs liver extracellular succinate and inflammatory pathogenesis](#). *Nat Metab* 2021; 3(5): 604-617.
- 24 Vargas-Castillo A, Fuentes-Romero R, Rodriguez-Lopez LA, Torres N, Tovar AR. [Understanding the biology of thermogenic fat: is browning a new approach to the treatment of obesity?](#) *Arch Med Res* 2017; 48(5): 401-413.
- 25 Peng J, Yuan JP, Wu CF, Wang JH. [Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health](#). *Mar Drugs* 2011; 9(10): 1806-1828.
- 26 Hiradate R, Khalil IA, Matsuda A, Sasaki M, Hida K, Harashima H. [A novel dual-targeted rosiglitazone-loaded nanoparticle for the prevention of diet-induced obesity via the browning of white adipose tissue](#). *J Control Release* 2021; 329: 665-675.