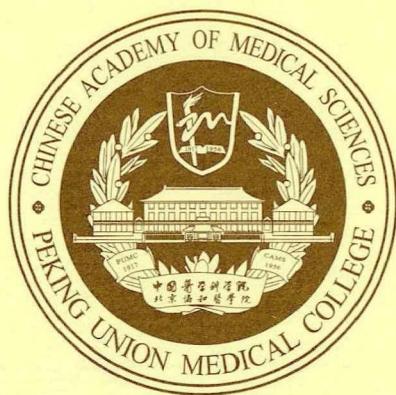


北京協和醫學院
中國醫學科學院

碩士研究生學位論文



北京協和醫學院研究生院

学校代码: 10023

学 号: S2020009043

硕士学位论文

(专业学位)

小鼠体内 LncRNA11 维持脂肪代谢正常的分子机制 研究

Molecular Mechanism Study of LncRNA11 to Maintain Normal Lipid Metabolism in Mice

所 院 : 药用植物研究所

姓 名 : 许赛君

指导教师: 谢勇、张彬

导师小组: 谢勇、许扬、张彬

学科专业: 药学

研究方向: 代谢综合征发病机制和药物发现

完成日期: 2023 年 4 月 8 日

目 录

前言.....	7
第一章 LncRNA11 的组织分布及与原代脂肪细胞分化相关性.....	10
引言.....	10
1 实验材料.....	10
2 实验方法.....	12
3 实验结果.....	14
讨论.....	16
第二章 LncRNA11 缺陷对小鼠代谢及脂肪组织的影响.....	17
引言.....	17
第一节 构建 LncRNA11 缺陷小鼠模型.....	18
1 实验材料.....	18
2 实验方法.....	19
3 实验结果.....	20
第二节 LncRNA11 缺陷对小鼠脂肪组织和代谢水平的影响.....	22
1 实验材料.....	22
2 实验方法.....	23
3 实验结果.....	27
第三节 LncRNA11 缺陷对高脂饮食诱导小鼠脂质代谢的影响.....	35
1 实验材料.....	35
2 实验方法.....	35
3 实验结果.....	36
讨论.....	39
第三章 LncRNA11 调控小鼠脂肪组织代谢的分子机制研究.....	41
引言.....	41
第一节 转录组学结合生物信息学方法发现 LncRNA11 调控的关键 基因通路.....	42
1 实验材料.....	42
2 实验方法.....	42
3 实验结果.....	43
第二节 RNA 免疫沉淀方法发现 LncRNA11 的相互作用蛋白 hnRNPA1.....	47
1 实验材料.....	47
2 实验方法.....	48
3 实验结果.....	51

第三节 hnRNPA1 蛋白过表达对脂肪细胞分化和代谢的影响	52
1 实验材料	52
2 实验方法	53
3 实验结果	56
第四节 蛋白免疫共沉淀方法发现与 lncRNA11-hnRNPA1 复合物相互作用的蛋白质 PKM	61
1 实验材料	61
2 实验方法	62
3 实验结果	64
讨论	66
总结和展望	69
参考文献	70
文献综述(英文版已发表) LncRNAs 对脂代谢和相关疾病的调控作用	77
参考文献	85
附录一 LncRNA11 缺陷诱发 BAT 中表达变化的氧化磷酸化基因 ...	94
附录二 LncRNA11 缺陷诱发 BAT 中表达变化的产热基因	96
附录三 hnRNPA1 真核表达质粒图谱	98
附录四 过表达 hnRNPA1 诱发表达变化的产热基因	99
附录五 过表达 hnRNPA1 诱发表达变化的氧化磷酸化基因	101

英文缩略词表

英文名称	英文缩写	中文名称
Acetyl-Coenzyme A carboxylase	ACC	乙酰辅酶 A 羧化酶
Acyl-Coenzyme A oxidase	ACOX	酰基辅酶 A 氧化酶
Brown adipose tissue	BAT	棕色脂肪组织
Carnitine palmitoyltransferase 1 alpha	CPT1 α	肉碱棕榈酰转移酶 1 α
Carnitine palmitoyltransferase 1 beta	CPT1 β	肉碱棕榈酰转移酶 1 β
CCAAT/Enhancer binding protein alpha	CEBP α	CCAAT 增强子结合蛋白 α
Cell death-inducing DFFA-like effector A	CIDEA	细胞死亡诱导 DFFA 样效应蛋白 A
Co-Immunoprecipitation	Co-IP	免疫共沉淀
Cytochrome C oxidase subunit 5A	COX5A	细胞色素 C 氧化酶亚基 5A
Cytochrome C oxidase subunit 7B	COX7B	细胞色素 C 氧化酶亚基 7B
Cytochrome C oxidase subunit 8B	COX8B	细胞色素 C 氧化酶亚基 8B
Type 2 deiodinase	Dio2	II 型脱碘酶
Elongation of very long chain fatty acids-like 3	ELOVL3	超长链脂肪酸 3 延长酶
Epididymal white adipose tissue	eWAT	附睾白色脂肪组织
Fatty acid binding protein 4	FABP4 (aP2)	脂肪酸结合蛋白 4
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	hnRNPA1	异质核糖核蛋白 A1
Inguinal subcutaneous white adipose tissue	iWAT	腹股沟白色脂肪组织
Lipoprotein lipase	LPL	脂蛋白脂肪酶
Long noncoding RNA	LncRNA	长链非编码 RNA
Peroxisome proliferative activated receptor gamma coactivator 1 alpha	PGC1 α	过氧化物酶体增殖激活受体 γ 辅激 活因子 1 α
Peroxisome proliferator activated receptor gamma	PPAR γ	过氧化物酶体增植物激活受体 γ
PR domain containing 16	PRDM16	PR 结构域蛋白 16
Pyruvate kinase	PK	丙酮酸激酶
Pyruvate kinase M	PKM	丙酮酸激酶 M

英文缩略词表

RNA immunoprecipitation	RIP	RNA 免疫沉淀
Uncoupling protein 1	UCPI	解偶联蛋白 1
3-isobutyl-1-methylxanthine	IBMX	3-异丁基-1-甲基黄嘌呤
Dexamethasone	DEX	地塞米松
Triiodothyronine	T3	三碘甲酰原氨酸

摘要

肥胖诱发很多代谢性疾病,已成为威胁人类公共卫生健康的重大隐患。脂肪组织在人体代谢和能量稳态中发挥重要作用,一旦脂肪代谢异常即可诱发肥胖。人体内主要含有2类脂肪组织:白色脂肪组织以游离脂肪酸的形式储存脂质,棕色脂肪组织利用葡萄糖和脂肪酸通过非颤栗产热为机体抵御寒冷,脂肪组织通过储存脂肪并将其代谢产生热量供给生命活动,可以消耗异常蓄积的脂肪,由此可见,保证脂肪正常代谢可以抑制肥胖发生。已有研究报道了长链非编码RNA(lncRNAs)能够抑制脂肪蓄积,这些lncRNAs可能成为肥胖治疗的新靶标。

lncRNAs是一类不编码蛋白质的基因转录产物,可通过与DNA/RNA/蛋白质相互作用调控细胞发育和多种疾病过程。最近的转录组测序研究发现了白色脂肪和棕色脂肪组织中存在lncRNAs特异性表达,这些lncRNAs调控脂肪代谢的作用机制尚不清楚。研究基于脂肪组织注释的lncRNA数据集,发现了*GM44386*基因编码一个富含于棕色脂肪组织的lncRNA,将其命名为lncRNA11,对其开展了调控脂肪代谢的作用机制研究,实施研究方法和结果如下:

1. 基于生物信息学方法确认了lncRNA11在棕色和白色脂肪组织中为高表达状态。然后利用CRISPR/CAS9技术成功培育了*GM44386*基因敲除C57BL/6J小鼠。对野生型和基因敲除的小鼠,分别用正常饲料喂养8周以及高脂喂养12周,对比每种饲养方式小鼠的生理功能差异,发现了lncRNA11缺陷对小鼠代谢水平和脂肪组织发育造成显著影响,出现如下表型:正常饲养条件下表现出皮下脂肪细胞扩张、胰岛素抵抗等;高脂饲料饲养条件下肝脏出现了严重的脂质蓄积;两种饲养条件都有脂肪细胞线粒体的质量和结构被严重破坏,导致产热能力受损现象。表明lncRNA11是保持小鼠脂肪组织正常发育和代谢必不可少的分子。

2. 利用转录组学和生物信息学分析方法发现了lncRNA11缺陷诱发小鼠脂肪代谢紊乱的机制。lncRNA11缺陷诱发棕色脂肪组织中产热和脂肪酸代谢通路被抑制,同时白色脂肪组织PI3K-Akt等代谢通路被激活,由此导致脂肪代谢紊乱。另外发现白色脂肪组织中与转录产生mRNA过程相关的基因表达量下调,而后利用RNA免疫沉淀和高分辨质谱分析方法,发现了与lncRNA11形成复合体的蛋白质:异质核糖核蛋白(hnRNPA1),它是一种调控RNA发挥其功能的蛋白质。

3. 开展了lncRNA11-hnRNPA1复合体在脂肪细胞诱导分化成熟过程中的作用机制研究。发现在前脂肪细胞3T3-L1中过表达hnRNPA1诱发了促进脂肪细胞成熟化相关基因的表达上调,明显降低了细胞内脂质蓄积量。转录组学研究结果也显示hnRNPA1蛋白过表达促进了与线粒体再生相关基因的表达,激活了细胞的产热和

氧化磷酸化等代谢通路。利用 Co-IP 和高分辨质谱发现了与 hnRNPA1 形成复合体的蛋白质：丙酮酸激酶 M (PKM)。已知 PKM 是丙酮酸激酶的同工酶，作为糖酵解过程中的关键限速酶，促进线粒体中的葡萄糖代谢。因此，lncRNA11-hnRNPA1 复合物通过诱导 PKM 的表达，促进脂肪组织中线粒体内的糖酵解，满足了产热蛋白 UCP1 解偶联进程中对 ATP 的需求量，从而减少 ROS 的产生而实现保护线粒体结构和产热代谢功能正常。

总之，本研究首次发现了 *GM44386* 基因的转录产物 lncRNA11 的新功能，它与 hnRNPA1 形成复合体，该复合体通过与 PKM 形成三元复合体，抑制了脂肪细胞线粒体生物功能紊乱而维持了脂肪的正常代谢。因此，维持 lncRNA11 在脂肪组织中含量正常是创制治疗肥胖药物的新思路。

关键词：长链非编码 RNA，棕色脂肪组织，胰岛素抵抗，线粒体，丙酮酸激酶 M

Abstract

Obesity causes many metabolic diseases and has become a major hidden danger for human public health. Adipose tissue plays an important role in metabolism and energy homeostasis of human body, and abnormal adipose metabolism can induce obesity. The human body contains two main types of adipose tissue: White adipose tissue stores lipids in the form of free fatty acids, while brown adipose tissue burns off glucose and fatty acids to resist cold through non-shivering thermogenesis. Adipose tissue can consume abnormally stored fat and generate heat for life activities, thus ensuring normal fat metabolism can inhibit the occurrence of obesity. It has been reported that long non-coding RNA (lncRNAs) can inhibit fat accumulation, and these lncRNAs may represent new targets for obesity treatment.

lncRNAs are a class of non-protein-coding gene transcription that can regulate cell development and various disease processes through DNA / RNA / protein interactions. Recent transcriptome sequencing studies have found specific lncRNAs in white adipose tissue and brown adipose tissue, but the mechanism of these lncRNAs regulating fat metabolism remains unclear. Based on the lncRNA data set annotated by adipocytes, we found *GM44386* encodes a lncRNA, which is rich in brown adipocytes. We named it lncRNA11 and carried out research on its mechanism of regulating fat metabolism. The research methods and results are as follows:

1. We confirmed the high expression of lncRNA11 in brown and white adipose tissue based on bioinformatics methods. Then, we bred *GM44386* knockout C57BL/6J mice using CRISPR/ CAS9 technology. Wild-type and knockout mice were fed normal diet for 8 weeks and high-fat diet for 12 weeks, respectively. By comparing the differences in physiological functions of each feeding-mode mice, we found lncRNA11 defects significantly affected the metabolic level and adipose tissue development of mice, showing the following phenotypes: subcutaneous adipocyte dilatation and insulin resistance happened in mice with normal feeding, and severe hepatic lipid accumulation occurred in high-fat diet mice. The quality and structure of adipocyte mitochondria were seriously damaged, resulting in impaired thermogenesis. These determined the role of lncRNA11 in normal adipocyte development and metabolism of mice.

2. The mechanism of lipid metabolism disorder induced by lncRNA11 defects in mice was discovered by transcriptomics and bioinformatic analysis. lncRNA11 defects

caused the inhibition of thermogenesis and fatty acid metabolism pathways in brown adipose tissue, while the PI3K-Akt and other metabolic pathways in white adipose tissue were activated, these eventually resulted in lipid metabolism disorders in mice. In addition, we found the expression of proteins associated with mRNA processing in white adipose tissue was down-regulated. Then, RNA immunoprecipitation and high resolution mass spectrometry were used to identify a protein that forms a complex with lncRNA11: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNPA1), a protein that regulates RNA processing and function.

3. We carried a study on the mechanism of lncRNA11-hnRNPA1 complex in adipocytes differentiation and maturation. We found that overexpression of hnRNPA1 in 3T3-L1 preadipocytes upregulated the expression of genes associated with adipocyte maturation, and significantly reduced the intracellular lipid accumulation. Transcriptomic assay showed that hnRNPA1 overexpression promoted the expression of genes related to mitochondrial regeneration and activated metabolic pathways such as thermogenesis and oxidative phosphorylation. Continuing with Co-IP and high resolution mass spectrometry, we identified a protein pyruvate kinase M (PKM), which forms a complex with hnRNPA1. PKM is known to be an isoenzyme of pyruvate kinase, and it promotes glucose metabolism in mitochondria as a key rate-limiting enzyme during glycolysis. Therefore, lncRNA11-hnRNPA1 complex can promote mitochondria glycolysis in adipose tissue by inducing the expression of PKM, and this provides ATP for UCP1 uncoupling and reduces the production of ROS, and eventually protects mitochondrial structure and thermogenic function.

In conclusion, this study for the first time discovered the new function of lncRNA11, the transcriptional product of *GM44386* gene. Mechanistically, we found lncRNA11 forms a complex with hnRNPA1 and PKM. This complex can inhibit the biological dysfunction of adipocyte mitochondria and maintain the normal metabolism of fat. Therefore, keeping the normal content of lncRNA11 in adipose tissue is a new insight for the development of anti-obesity drugs.

KEY WORDS: Long noncoding RNA, brown adipose tissue, insulin resistance, mitochondria, PKM

前言

肥胖已成为全球流行性疾病，是引起死亡的第五大风险因素。世界卫生组织调查发现从 1975 年到 2016 年，全球 5-19 岁儿童和青少年中超重或肥胖的患病率从 4% 增加到 18%，增加了四倍多^[1-4]。在我国，儿童、青少年以及成人中的超重和肥胖率呈现迅速增加趋势，《中国居民营养与慢性病状况报告（2020 年）》公布了我国成年人的超重和肥胖率为 50.7%，青少年的超重和肥胖率达到 19%，预计到 2025 年，我国超重和肥胖人数将超 2.65 亿^[5]。超重和肥胖是导致如心血管疾病、二型糖尿病、骨关节炎、某些癌症等非传染性疾病的主要风险因素^[6-9]，为了保障人民健康，探明肥胖发生机制和发现防治方法是迫切需要开展的研究课题。

目前治疗肥胖的方法主要有改变生活方式（饮食和运动）和药物治疗。已上市药物大多数是通过靶向作用于进食回路的外周和神经中枢系统，从而抑制机体的摄食欲望或者抑制肠道对于脂肪酸的吸收，此类药物可能诱发神经系统信号传递紊乱导致情绪障碍等不良反应，治疗效果不佳^[10]。因此要实现创制肥胖的特效新药，首先要发现新的药物作用靶点。

肥胖表现为异常或过量的脂肪积累，世界卫生组织定义身体质量指数（BMI）超过 25 为超重，超过 30 为肥胖。脂肪组织是储存脂质的主要场所，人体内主要含有 2 类脂肪组织：白色脂肪组织（WAT）和棕色脂肪组织（BAT）。WAT 存在于不同的解剖部位，具有不同的代谢功能。内脏 WAT 主要用于储存过量脂肪，皮下 WAT 除了储存脂质还是一种内分泌器官，正常情况下可分泌瘦素、脂联素等脂肪因子以及羟基脂肪酸支链脂肪酸酯（FAHFAs）等活性脂质分子，功能紊乱失调时则分泌更多的促炎因子和胰岛素拮抗分子，如白细胞介素-6（IL-6）、白细胞介素-8（IL-8）、视黄醇结合蛋白 4（RBP4）^[11]。研究发现 RBP4 表达量升高可诱导单核细胞、树突状细胞、巨噬细胞中的炎症导致抗原呈递和免疫系统的激活，诱发胰岛素抵抗^[12]。

WAT 具有一定的扩张能力，体内过度蓄积的脂质可导致脂肪细胞扩大（肥大性肥胖）或新的脂肪细胞数量代偿性增加（增生性肥胖），肥大性肥胖被认为与炎症、胰岛素抵抗和 2 型糖尿病等代谢性疾病的发展密切相关^[13]，而增生性肥胖中皮下脂肪组织的扩张可以有效地预防高热量膳食引起的代谢并发症^[14]。研究发现内脏脂肪组织扩张的肥胖者比同样肥胖但是偏重于皮下脂肪组织扩张的人患糖尿病和心血管疾病的风险更大^[15]。因此认为在高热量饮食摄入后，促进皮下脂肪组织的发育对于抵抗肥胖和相关代谢性疾病有关键意义。另外，WAT 具有很高的生理可塑性，研究表明寒冷或 β -肾上腺素能受体激动剂可以增强脂肪细胞中的脂肪分解，导致“棕色样”脂肪细胞的出现，这些脂肪细胞中解偶联蛋白 1（UCP1）含量较高，表

现出与棕色脂肪细胞相似的代谢特征，这对于能量代谢是有益的^[16]。

棕色脂肪组织 (BAT) 在成年人体内含量极少，在新生儿和冬眠动物体内较多。正电子发射计算机断层显像 (PET/CT) 扫描证实在成人锁骨、腋窝、子宫颈和锥体旁都分布着棕色脂肪组织。与 WAT 相比，BAT 中毛细血管丰富，细胞中含有大量线粒体，线粒体通过高表达解偶联蛋白 1 (UCP1)，解偶联 ATP 生成中的氧化磷酸化产热，脂质在棕色脂肪中主要用作线粒体氧化磷酸化和产热的燃料，这一过程取决于 UCP1 活性，是哺乳动物非颤栗性产热的重要方式^[17]。

从能量代谢的角度看，肥胖是由于能量的摄入超过能量的消耗，增加能量消耗已经被证明是非常有效的减肥方式^[18, 19]。机体摄入的能量除了一部分用于生理需要，大部分用于代谢过程或在产热过程中丧失，机体饮食或响应环境温度变化而耗散的能量定义为适应性产热，这种适应性产热主要发生在骨骼肌和棕色脂肪组织 (BAT) 的线粒体中，受到精细调节^[20]。骨骼肌主要是通过颤栗产热，而棕色脂肪组织是非颤栗产热的主要方式，在啮齿动物中，BAT 的产热潜力极大，体重为 350-400 g 的冷适应大鼠，3 g BAT 的耗氧量大约是基础代谢率的 2 倍^[21]，在小鼠中诱导棕色脂肪组织产热可以保护小鼠免于高脂饮食诱导的肥胖^[22]。研究发现，成年人的棕色脂肪含量少，但是具有潜在活性，活性 BAT 的量随着年龄增长而降低，在 64 岁以上的超重成人中很少观察到，这表明年龄相关性肥胖可能与 BAT 活性的降低有关^[23-25]。因此，从棕色脂肪组织的调控网络中，有望发现治疗肥胖症的新靶点。

目前，大量研究已经揭示脂肪的发育和产热过程是一个由转录级联反应控制的复杂过程，过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 和 CCAAT 增强子结合蛋白 α (CEBP α) 被认为是成脂过程的关键调控因子，PPAR γ 的功能是诱导数百个参与脂质和葡萄糖代谢的靶基因表达包括线粒体生物合成和脂肪因子分泌相关基因，CEBP α 的功能是维持 PPAR γ 的表达以及调节脂肪细胞基因亚群，后者调节包括脂联素分泌、胰岛素依赖性葡萄糖摄取等过程^[17, 26]。目前使用的抗糖尿病药物噻唑烷二酮类 (TZDs) 的部分作用机制正是基于此，通过内源性激活 PPAR γ 促进脂肪分化，从而改善糖尿病患者的胰岛素敏感性和血糖控制能力 (其副作用如骨折风险增加等限制其使用，需要开发新的胰岛素增敏剂)^[27]。另外研究发现强效 PPAR γ 配体如罗格列酮可以诱导白色脂肪细胞棕色化，表现为线粒体中 UCP1 表达量升高，氧消耗和脂质氧化显著增加，该过程可能是由于 PPAR γ 配体相关的线粒体基因被诱导表达，包括解偶联蛋白 1 (*Ucp1*)、细胞色素 C 氧化酶亚基 8A (*Cox8a*)、细胞色素 C 氧化酶亚基 7B (*Cox7b*) 等^[28]。

长链非编码 RNA (lncRNA) 是特定基因的转录产物，不能在核糖体中实现编码合成蛋白质。lncRNAs 的表达受到多水平调节因素影响，包括染色质重排、转录调节和翻译调节，并且以不同的方式介导转录调节，包括信号转导、蛋白质-蛋白质相互作用支架、分子诱饵以及基因组或转录组中靶元件的向导等^[29]。目前，lncRNAs

已被证明参与脂肪形成、分化等不同阶段,如在脂肪形成分化的早期阶段, lncRNAs 被发现影响有丝分裂克隆扩增期 (MCE) 相关蛋白和早期调节因子 CEBP β/σ 的表达^[30]。在晚期阶段, lncRNAs 在多个水平上影响成脂转录因子 PPAR γ 的表达,如 Plnc1 通过抑制 DNA 甲基化直接调节 PPAR γ ^[31], NEAT1 诱导 PPAR γ 的 mRNA 剪接, 导致其 mRNA 降解^[32]。研究已经将 lncRNAs 与肥胖表型和肥胖模型相关联,如 Xu 等人证明 SRA 基因敲除小鼠能够抵抗高脂诱导的肥胖表型,表现为脂肪含量减少,脂肪肝和葡萄糖耐量改善^[33]。另外, RNA 测序等高通量技术通过筛选肥胖患者和瘦型患者脂肪组织中的全基因转录组,已鉴定出多种脂肪发育代谢特异性相关 lncRNAs^[34]。

本课题组前期研究根据脂肪组织注释的 lncRNA 数据集发现了在棕色脂肪组织中特异性高表达的一种 lncRNA^[35],并将其命名为 lncRNA11,其作用机制尚不清楚,于是开展了其调控脂肪代谢作用机制研究。通过敲除 *GM44386* 基因构建 lncRNA11 缺陷小鼠,探究小鼠 lncRNA11 缺失对脂肪组织和代谢表型的影响,并对 lncRNA11 缺陷小鼠和正常小鼠的脂肪组织进行转录组测序和生物信息学分析,从转录组水平上探究 lncRNA11 调控脂肪代谢机制;而后通过 RNA 免疫沉淀实验结合高分辨质谱技术,发现了与 lncRNA11 相互作用的蛋白质:异质核糖核蛋白 A1(hnRNPA1),在 3T3-L1 前脂肪细胞内研究了 lncRNA11-hnRNPA1 复合物调控脂肪细胞成熟化进程中的作用机制,发现了 lncRNA11 抑制脂肪代谢紊乱的新机制。

第一章 LncRNA11 的组织分布及与原代脂肪细胞分化相关性

引言

长链非编码 RNA 是一类独特的转录物，由于缺乏功能性开放阅读框，多数不具有编码蛋白质的能力，但其通过与 DNA、RNA 或蛋白质相互作用，具有重要的调控功能^[29]。大量研究证实，lncRNAs 参与了细胞发育和多种疾病的调控过程如心血管疾病、肝脏疾病、肾脏疾病以及肥胖等代谢性疾病^[36]。

研究表明 lncRNAs 在各类组织中的表达具有组织特异性，说明其与组织的功能特异性密切相关^[37]。特别是围绕其在脂肪组织发育和功能调控中的研究近期有许多新的发现。Sun Lei 等人利用转录组测序（RNA-seq）和染色质免疫共沉淀测序（CHIP-seq）技术在棕色脂肪组织（BAT）、腹股沟白色脂肪组织（iWAT）、附睾白色脂肪组织（eWAT）中鉴定了约 1500 个 lncRNAs，包括 127 个在 BAT 分化过程中特异性诱导表达的 lncRNAs，其中，Lnc BATE1 被发现通过与异质核糖核蛋白 U（hnRNPU）结合调控棕色脂肪的发育和产热功能^[38]。另外，Zhao xuyun 等定义了一种新的棕色脂肪 lncRNA1（Blnc1），发现 Blnc1 与内源性蛋白 EBF2 在细胞中形成核糖核蛋白转录复合物协同诱导脂肪组织中 UCP1 等产热程序的表达^[39]。Xiong yan 等人报道了 lncRNA（AK079912）富含于棕色脂肪组织且调控脂肪组织线粒体功能和脂肪产热代谢过程，在皮下脂肪中的异位表达能激发皮下脂肪细胞中产热核心蛋白 UCP1 的表达。这些研究揭示了 lncRNAs 在脂肪发育和产热代谢中的重要调控作用^[40]。目前除少数脂肪组织特异性 lncRNAs 的功能比较明确，大部分 lncRNAs 在脂肪细胞分化和产热中的功能和调控机制都未知，值得深入研究。

本研究基于已发表的脂肪组织注释 lncRNAs 数据集，发现 *GM44386* 基因的转录产物是一种 lncRNA，将其命名为 lncRNA11。本章节探究了 lncRNA11 在二月龄小鼠不同组织中的分布情况，以及其在脂肪原代细胞分化成熟过程中的表达情况。

1 实验材料

1.1 实验动物

2 月龄 SPF 级雄性 C57 BL/6J 小鼠，体重：18 - 22 g，购自北京维通利华生物科技股份有限公司【合格证号：SCXK（京）2020-0010】。所有实验动物操作程序均按照中国医学科学院北京协和医学院动物伦理委员会标准进行，伦理审查编号：SLXD - 20211222017。

1.2 实验仪器

表 1-1 实验仪器设备

名称	厂家	型号
PCR 仪	Eppendorf	Mastercycler® X50
荧光定量 PCR 仪	Roche	Lightcycler® 96
微量分光光度计	Thermo Scientific	Nanodrop 2000
高速台式冷冻离心机	湖南湘仪	TGL-16
涡旋振荡器	海门市其林贝尔	QL-901
双人单面超净工作台	苏州净化	SW-CJ-2D 型
细胞培养箱	Thermo Scientific	311
精密电子分析天平	上海海康电子仪器厂	FA214
立式蒸汽灭菌锅	合肥华泰医疗设备	LX-C50 L 型
恒温水浴锅	力辰科技	HH-1
电动离心机	北京医用离心机厂	LDZ4-0.8
电子显微镜	OLYMPUS	CKX31

1.3 实验试剂

表 1-2 实验试剂

名称	厂家	货号
RNAiso Plus	宝日医生物技术有限公司	9109
异丙醇（分析纯）	国药集团化学试剂有限公司	80109218
三氯甲烷（分析纯）	国药集团化学试剂有限公司	10006818
乙醇（分析纯）	天津北联	20220410
PrimeScript™ RT Master	宝日医生物技术有限公司	RR036A
TB Green Premix Ex Taq II	宝日医生物技术有限公司	RR420A
PBS（1×）	索莱宝生物科技有限公司	No.P1020
DMEM 高糖培养基	Gibco	C11995500BT
青霉素链霉素溶液	HyClone	SV30010
0.25% 胰酶	HyClone	SH30042.01
胎牛血清	Gibco	10091148
胶原酶	SIGMA-ALDRICH	C-0130
3-isobutyl-1-methylxanthine	SIGMA-ALDRICH	17018
Dexamethasone	SIGMA-ALDRICH	D1756
重组人胰岛素	索莱宝生物科技有限公司	IR1490
Triiodothyronine	SIGMA-ALDRICH	T2877
DMSO	索莱宝生物科技有限公司	D8371

不完全培养基配制：每 50 mL 高糖培养基加入 500 μ L 双抗，备用。

细胞完全培养基配制：每 45 mL 高糖培养基加入 5 mL 血清、500 μ L 双抗，备用。

诱导液配制：IBMX 粉末用 DMSO 溶解为 58 mg/mL 的储存液；DEXA 粉末用乙醇溶解为 2.2 mg/mL 的储存液，利用不完全培养基稀释成 44 μ g/mL 的储存液；人源胰岛素粉末用 HCL (0.02 mol/L) 稀释成 1 mg/mL 的储存液。在完全培养基中加入诱导因子 IBMX、DEXA、Insulin 储存液，混匀，最终配成各诱导因子 IBMX、DEXA、Insulin 终浓度为 0.5 mM、1 μ M、10 mg/mL 的诱导液。

分化液配制：T3 粉末用 NaOH (1 mol/L) 溶解成 1 mg/mL 的储存液。在完全培养基中加入分化因子 T3、Insulin 储存液，混匀，配制成分化因子 T3、Insulin 终浓度为 0.1 nM、5 μ g/mL 的分化液。

2 实验方法

2.1 RT-qPCR 检测 lncRNA11 在 C57 BL/6J 小鼠各组织中的表达水平

2.1.1 C57 BL/6J 小鼠各组织分离取材

C57 BL/6J 小鼠适应性饲养一周（饲养室温度：20 $^{\circ}$ C，饲养室湿度：45 \pm 15%，昼夜明暗交替：12 h/12 h，自由饮水、饮食），适应性饲养结束后，将小鼠脱颈椎处死，酒精喷洒消毒，剖开小鼠腹腔，快速剪取小鼠体内脾、肝、肺、肾、心组织、骨骼肌、腹股沟脂肪组织、肩胛处的棕色脂肪组织和脑组织，放入提前标记的去酶管，液氮中速冻，存放于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱待用。

2.1.2 RNA 提取

称取大约 0.1 g 各组织置于 1.5 mL 去酶离心管中，每管中加入 1 mL Trizol 试剂，冰上剪碎研磨，每管加 200 μ L 氯仿提取 RNA，涡旋、静置、离心，转移水相，加入等体积异丙醇沉淀 RNA，颠倒、静置、离心，去上清液，加入 75%乙醇（乙醇：DEPC 水 = 3: 1），洗涤 RNA 2-3 次、离心、弃废液、倒置、晾干，每管加入 DEPC 水溶解 RNA。利用超微量分光光度计检测 RNA 浓度。

2.1.3 RNA 反转录

采用 20 μ L 反应体系，在标记的 0.1 mL 去酶管中加入 4 μ L 5 \times Primescript RT Master 和 16 μ L RNA-DEPC 水，保证每管中 RNA 质量为 2000 ng，混匀反应体系，放入 PCR 仪中反转录（反应程序：37 $^{\circ}$ C 15 min，85 $^{\circ}$ C 5 s，4 $^{\circ}$ C 5 min），结束待 cDNA 样品冷却至室温，每管加入 60 μ L dd H₂O 稀释。

2.14 RT-qPCR 检测基因表达水平:

首先在八连排管中配制反应溶液, 基因引物序列如表 1-3, 反应体系如表 1-4:

表 1-3 基因引物序列

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
<i>18s</i>	CATGCAGAACCCACGACAGTA	CCTCACGCAGCTTGTTGTCTA
<i>GM44386</i>	GGACAAGTTGCTCCTTCCTT	CAGAAGGCTTGTGTGTCAGA
<i>Ucp1</i>	AGGCTTCCAGTACCATTAGGT	CTGAGTGAGGCAAAGCTGATT

表 1-4 荧光定量 PCR 反应体系

Component	Volume (μL)
TB Green Premix Ex Taq II	6.25
Former	0.25
Primer	0.25
cDNA	3
dd H ₂ O	2.75
Total	12.5

混匀 PCR 反应体系, 置于荧光定量 PCR 仪中, 设置反应程序, 如下:

表 1-5 荧光定量 PCR 反应程序

Program	Step	Cycle
Preincubation	95 °C for 30 s	1
3 Step Amplification	95 °C for 10 s	40
	55 °C for 30 s	
	72 °C for 15 s	
	95 °C for 10 s	
Melting	65 °C for 60 s	1
	97 °C for 1 s	

2.2 检测 C57 BL/6J 小鼠脂肪原代细胞诱导分化过程中相关基因的表达情况

2.2.1 取 C57 BL/6J 小鼠脂肪原代细胞

十二孔板每孔加入 1 mL PBS (1% P/S), 小鼠脱颈椎处死, 浸入 75%酒精消毒, 用无菌剪小心分离剪取棕色脂肪组织和腹股沟白色脂肪组织, 在十二孔板的 PBS 液中清洗后放至纸巾上吸干水分, 转移至 1.5 mL 无菌离心管中剪碎至无明显

颗粒状，再转移至 15 mL 离心管，每管加入 3 ml 胶原酶溶液 (1.5 mg/mL)，混匀，37 °C 水浴，消化 13 min，完全培养基终止消化，1000 rpm 离心 5 min，转移底部细胞沉淀至新的无菌离心管，加完全培养基，吹散，接种至十二孔板，放入细胞培养箱培养 (37 °C, 5% CO₂)，24 h 后换上新鲜培养基，每隔 48 h 更换一次培养基。

2.22 脂肪原代细胞诱导分化

待细胞生长状态良好，密度达到 30%-40% 时，更换新鲜配制诱导液，48 h 后继续更换第二次诱导液，诱导 4 天，更换新鲜配制分化液，分化 4 天，显微镜下观察到细胞内部含有大量脂滴，表明脂肪原代细胞分化成熟。

2.23 检测脂肪原代细胞中相关基因表达水平

从脂肪原代细胞进入诱导分化过程开始，收集 0、2、4、6、8 天的细胞，十二孔板每孔加入 500 μL Trizol 试剂，冰上孵育 5 min，吹散细胞，收集到 1.5 mL 去酶管中，每管加入 100 μL 氯仿，按照 3.12-3.14 方法提取细胞中总 RNA，检测原代细胞在诱导分化第 0、2、4、6、8 天时 lncRNA11、UCP1 的转录水平。

2.3 统计学分析

利用 Graphpad Prism 6.0 对实验数据进行统计学分析，结果表示为 Mean ± SEM。数据采用单因素方差分析，组间 *T* 检验。 $P < 0.05$ 认为具有统计学差异。

3 实验结果

3.1 lncRNA11 在棕色脂肪组织中特异性高表达

利用 RT-qPCR 检测手段检测 lncRNA11 在普通 2 月龄 C57 BL/6J 小鼠各组织器官中的表达水平，结果显示该基因在脑、肾、心、肌肉、脂肪组织中广泛表达，以在脾中的表达量为标准，lncRNA11 在肝脏中的表达量是脾中的 3.26 倍，在肺中的表达量是脾中的 3.4 倍，在脑中的表达量是脾中的 15 倍，在肾脏中的表达量是脾中的 115 倍，在肌肉中的表达量是脾中的 212 倍，在心脏中的表达量是脾中的 738 倍，在棕色脂肪中的表达量是脾中的 1500 倍，在皮下脂肪中的表达量是脾中的 40 倍，结果表明其在棕色脂肪组织中表达量最高。

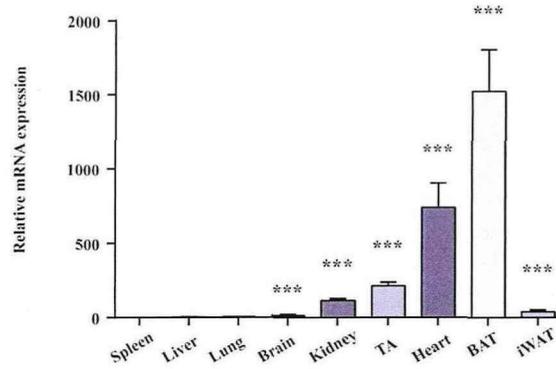


图 1-1 lncRNA11 在 2 月龄 C57 BL/6J 小鼠各组织器官中的表达水平。n = 6。*** $P < 0.001$ ，以脾脏中的表达水平为参照。

3.2 lncRNA11 表达量与脂肪细胞分化相关

本研究取 C57 BL/6J 幼鼠脂肪原代细胞诱导分化成成熟脂肪细胞，收集诱导分化第 0、2、4、6 和 8 天的细胞，检测细胞中 lncRNA11 和关键产热蛋白 UCP1 的转录水平。结果发现 lncRNA11 的转录水平随着脂肪原代细胞分化过程逐渐升高，其在棕色脂肪原代细胞分化末期的转录水平为分化第 0 天的 2.66 倍，在皮下脂肪原代细胞分化末期的转录水平为分化第 0 天的 1.74 倍。同时分化过程中关键产热蛋白 UCP1 的转录水平也显著升高，UCP1 在棕色脂肪原代细胞分化末期的转录水平为分化第 0 天的 20.6 倍，在皮下脂肪原代细胞分化末期的转录水平为分化第 0 天的 2.16 倍。这表明，lncRNA11 的表达水平与脂肪细胞的分化相关。

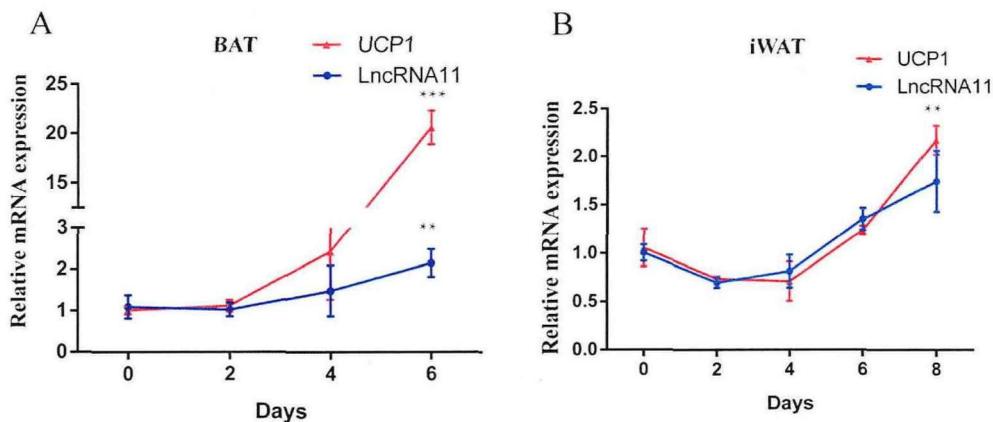


图 1-2 lncRNA11 和 UCP1 随脂肪细胞分化过程的表达变化趋势。(A) lncRNA11 和 UCP1 随棕色脂肪原代细胞分化过程的表达水平。(B) lncRNA11 和 UCP1 随腹股沟白色脂肪原代细胞分化过程的表达水平。n = 6。** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，分化天数 vs. 分化 0 天。

讨论

过量的脂肪积累是肥胖诱发糖尿病、心脑血管疾病和某些癌症等严重疾病的重要因素。目前在转录层面对脂肪组织的形成和代谢进行了充分研究，脂肪形成是一个由转录级联反应控制的复杂过程，其中 PPAR γ 和 CEBP α 是脂肪分化调控网络中的关键转录因子^[26, 41]。LncRNAs 是近年来发现的一类新兴调控因子，能够与转录因子结合从表观遗传学层面调控脂肪组织发育和产热功能^[42]。研究证明存在棕色脂肪组织特异性表达的 lncRNAs，如 Blnc1、lnc-BATE1，调控棕色脂肪发育和产热功能^[38, 39]，lncRNA11 是通过转录组测序技术鉴定出的在棕色脂肪组织特异性表达的 lncRNA，它是否同样在棕色脂肪组织中发挥相似的调控作用尚未可知。

本章研究首先通过 RT-qPCR 技术检测 lncRNA11 在二月龄 C57 BL/6J 小鼠不同组织中的转录水平，验证了转录组测序结果，数据显示 lncRNA11 在脑、肾、心、肌肉、脂肪组织中均有表达，特别是在心肌、骨骼肌以及棕色脂肪组织中的表达水平显著高于其它组织。提取小鼠脂肪原代细胞诱导分化成熟，检测 lncRNA11 在这个过程中的表达水平变化，结果发现随着细胞分化，lncRNA11 伴随脂肪细胞中 UCP1 蛋白表达量逐渐升高。UCP1 是一类在棕色脂肪细胞和部分类棕色脂肪细胞中特异性表达的解偶联蛋白，脂肪细胞在 UCP1 介导的产热基因程序作用下将葡萄糖和脂质中的化学能转化为热能^[17]。研究发现健康人身体中含有大量 UCP1 高表达脂肪细胞，而在肥胖患者和老年人体内 UCP1 表达活性较低，激活脂肪细胞中 UCP1 介导的产热基因程序表达可以增加全身能量消耗，提高胰岛素敏感性^[25, 43, 44]。因此探索促进脂肪细胞发育和 UCP1 产热基因程序表达的调控因子对于肥胖患者改善过度脂肪蓄积有重要意义。LncRNA11 在心肌、骨骼肌和棕色脂肪组织中高表达，而这些组织均富含线粒体，尤其是棕色脂肪组织含有丰富的线粒体，而线粒体是 UCP1 表达和产热的主要场所^[45]。LncRNA11 是否参与调控脂肪组织发育和产热功能有待进一步探究。

第二章 LncRNA11 缺陷对小鼠代谢及脂肪组织的影响

引言

世界卫生组织定义肥胖是指体内出现异常或过度脂肪堆积,其判断指标为 BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, 针对亚洲人群,肥胖临界点为 BMI = 28 kg/m^2 。事实上,肥胖症是一种代谢紊乱疾病,传统观点认为肥胖的发生主要原因是能量稳态失调,多余的能量储存在脂肪细胞中,导致脂肪组织病理性扩张^[46],脂肪细胞储存脂质超载,容易造成脂类物质异位积聚在组织或器官中引发局部炎症或组织代谢功能受损,导致肥胖症者出现与代谢失调相关的其它合并症,如肥胖引发胰岛素抵抗导致胰岛功能恶化诱发二型糖尿病,更严重的如睡眠呼吸暂停综合征、脂肪性肝炎、肾小球硬化、胆结石等^[47]。

脂肪组织是一个分布在全身的动态器官,与肥胖等代谢紊乱性疾病的发生发展密切相关。研究表明哺乳动物体内至少含有两类主要的脂肪组织:棕色脂肪组织和白色脂肪组织。棕色脂肪组织主要参与能量消耗,其含有丰富的线粒体,高表达解偶联蛋白 1 (UCP1),发生线粒体呼吸与 ATP 合成解偶联,将呼吸链电子传递过程中的 H^+ 电位差转换成热能,提供产热维持机体核心体温^[45]。白色脂肪组织主要以甘油三酯 (TG) 的形式储存脂质,可以通过脂肪细胞扩大和细胞增殖分化储存多余能量^[44]。脂肪细胞扩大与炎症、代谢紊乱密切相关,相反,促进脂肪组织分化发育有利于抵抗肥胖和相关代谢疾病。另外,皮下脂肪组织具有高度可塑性,在肾上腺素、冷刺激、运动等作用下可转分化为类棕色脂肪细胞(米色脂肪细胞),表现为 UCP1 表达量升高,产热活性增加,称为棕色化^[48,49]。棕色脂肪组织和米色脂肪组织在体内的代谢特征相似,都能摄取葡萄糖和脂肪酸,参与调节全身糖脂代谢过程,这类脂肪组织可以清除甘油三酯、释放细胞因子和减轻胰岛素抵抗,表现出对肥胖和糖尿病等代谢性疾病的改善作用^[48]。因此,了解棕色脂肪组织耗能产热和白色脂肪组织发育分化的生物学过程并寻找相关的调控基因,有利于设计新的靶点和治疗策略对抗肥胖及其诱发的代谢紊乱相关疾病。

前期实验研究已经确定 LncRNA11 在棕色脂肪组织中特异性高表达,且其表达水平随着脂肪原代细胞分化而逐渐升高。为进一步探究其是否参与调控脂肪组织分化和代谢过程,本章研究中构建了 GM44386 基因敲除小鼠,选取同窝野生型小鼠和基因敲除小鼠,分别用正常饲料喂养 8 周以及高脂喂养 12 周,对比每种饲养方式小鼠的生理功能差异,通过检测小鼠的相关代谢指标系统研究 LncRNA11 缺陷对小鼠脂肪组织和代谢功能的影响。

第一节 构建 lncRNA11 缺陷小鼠模型

1 实验材料

1.1 实验动物

GM44386 基因敲除小鼠由北京唯尚立德生物科技有限公司构建【合同编号：FW20170805-01ZED】，和生产【合格证号：SCXK（京）2020-0010】。所有实验动物操作程序均按照中国医学科学院北京协和医学院动物伦理委员会标准进行，伦理审查编号：SLXD-20210314017。

1.2 实验试剂

表 2-1 实验试剂

名称	厂家	货号
EDTA	国药集团化学试剂有限公司	H2241926
NaOH	国药集团化学试剂有限公司	10019762
MightyAmp™ Genotyping Kit	宝日医生物技术有限公司	R074A
Tris-HCl	索莱宝科技有限公司	T8230
西班牙琼脂糖	贝晶生物科技有限公司	BY-R0100
50×TAE	博奥拓达科技有限公司	Top0751
核酸染料	博奥龙生物科技有限公司	BF07001
DNA Loading buffer	Novoprotein	No:DM099
DNA marker	博奥龙生物科技有限公司	BDIT0039

碱液配制：称取 50 g NaOH，加入 20 mL EDTA 溶液（0.5 mol/L），再加入 1 L dd H₂O，混匀。

中和液配制：称取 315.2 g Tris-HCl 粉末，加入 1 L dd H₂O，混匀，调 pH 值为 5.0。

1.3 实验仪器

表 2-2 实验仪器设备

名称	厂家	型号
恒温金属浴	LEOPARD	G1200
PCR 仪	Eppendorf	Mastercycler® X50
水平电泳槽	美国伯乐	1704486
紫外分析仪	其林贝尔	GL-3120

2 实验方法

2.1 LncRNA11 缺陷小鼠的构建

根据 *GM44386* 基因的基因组序列结构, 设计 CRISPR 靶点: 如下图, *GM44386* 基因具有两个外显子, 将 exon1-2 删除后, lncRNA11 失去功能。因此在 lncRNA11-201 的 exon1-2 两边的两端设计 cas9 靶点, 实现将 lncRNA11-201 敲除。根据 *GM44386* 基因组序列设计靶点 lncRNA11-L-g2 (5'-TATTTGATTGATTATCCCTGG-3') 和 lncRNA11-R-g2 (5'-GGATCATCCATGGTGTAAAGG-3')。将 gRNA 与 spCas9 蛋白一起显微注射小鼠受精卵, 对出生后 2 周龄小鼠进行基因型分析、鉴定和基因测序, 获得 lncRNA11 片段敲除的小鼠。

基因型检测 PCR 引物 *GM44386-F*: 5'-GAAGATACCCCTCCCCAATC-3', *GM44386-R1* : 5'-GAGCTTGGGATCCCTCATTG-3' , *GM44386-R2* : 5'-CATAATAGCGAGCCTGTCT-3'。发生片段敲除后预期 PCR 片段大小为 400 bp-500 bp 左右, 测序引物选择 *GM44386-F2*: 5'-CAGCCTGGACTAAGAAGAA-3', *GM44386-R2*: 5'-GCAATTACAGGCATGAGTC-3'。将 lncRNA11 缺陷小鼠与野生型小鼠交配, 出生的小鼠两周龄后进行基因型鉴定, 建立稳定遗传的 F1 代小鼠。

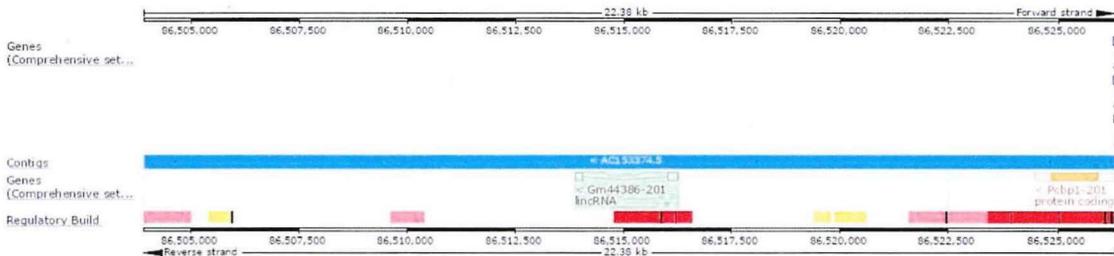


图 2-1 基因组序列结构

2.2 PCR 鉴定小鼠基因型

剪取 1 到 2 周龄小鼠的耳朵或指甲于标记的 1.5 mL 去酶离心管中, 每管加入 75 μ L 预先配制的碱液, 置于金属浴中 100 $^{\circ}$ C 加热 30 分钟, 取出, 晾至室温, 每管继续加入 75 μ L 预先配制的中和液, 振荡, 离心取上清液, 得到 DNA 样品。

在标记 8 连排中配制 DNA 扩增溶液, 体系如下表:

表 2-3 DNA 扩增体系

Component	Volume (μ L)
DNA 样品	1.25
Enzyme	0.5
Primer (F + R)	1.5
2 \times PCR Buffer	12.5

dNTP	5
dd H ₂ O	4.25
Total	25

将混匀体系置于 PCR 仪中，设定反应程序如下表：

表 2-4 PCR 反应扩增程序

Program	Step	Cycle
Stage 1	94 °C for 2 min	1
Stage 2	98 °C for 10 s	35
	60 °C for 30 s	
	68 °C for 20 s	
Stage 3	68 °C for 10 min	1
	16 °C for 5 min	

扩增反应结束后，取出样品，每管加入 6.125 μ L Loading Dye (5 \times)，用移液枪吹匀，4 °C 存放待用。

取锥形瓶配制琼脂糖凝胶溶液 (0.9 g 琼脂糖加入 90 mL 1 \times TAE 溶液)，混匀，微波中高火加热 2 分钟，溶解后取出，加入 9 μ L 核酸染料，晃匀，倒入模具中，静置 20 分钟，待其凝固，凝胶放入电泳槽中，每孔加入 10 μ L DNA 样品，边缘孔加入 4 μ L DNA marker，将仪器连接电源，设置 130 v，20 分钟，电泳结束后，取出凝胶，放于紫外分析仪中检测，记录实验结果。

2.3 RT-qPCR 检测基因敲除小鼠脂肪组织中的 lncRNA11 转录水平

取野生型 (WT) 和敲除型 (KO) 小鼠，禁食一夜，脱颈椎处死，快速剪取小鼠的 BAT、iWAT、eWAT 组织，置于标记的去酶管中，按照第一章 3.12-3.14 方法检测脂肪组织中 lncRNA11 和 UCPI 的转录水平。

2.4 统计学分析

利用 Graphpad Prism 6.0 对实验数据进行统计学分析，结果表示为 Mean \pm SEM。数据采用单因素方差分析，组间 *T* 检验。 $P < 0.05$ 认为具有统计学差异。

3 实验结果

3.1 LncRNA11 缺陷小鼠的鉴定

利用 2 对引物对鼠尾基因进行扩增，核酸电泳鉴定小鼠的基因型，发生片段敲

除后预期 PCR 片段大小为 400-500bp 左右, 如图 1.1 所示, 编号 21、22、25、27 号为 *GM44386* 基因片段敲除小鼠, 编号 23、24、26 号为野生型小鼠。通过突变型小鼠的测序峰图分析, 突变型的 DNA 序列在 ACACCATGGATG 前缺失 2560bp, 出现片段删除。

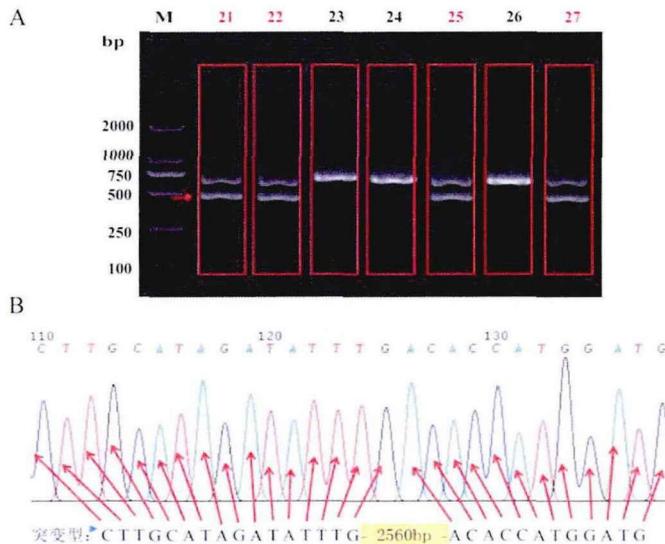


图 2-2 通过 PCR-核酸电泳鉴定小鼠基因型。(A) F1 代小鼠 *GM44386* 基因的 PCR 胶图。(B) 突变型基因序列的测序峰图显示小鼠基因片段敲除。

3.2 基因敲除小鼠脂肪组织中的 *lncRNA11*、UCP1 转录水平

利用 RT-qPCR 检测手段检测野生型和 *lncRNA11* 缺陷小鼠体内脂肪组织中 *lncRNA11*、UCP1 的转录水平, 结果表明在 *lncRNA11* 缺陷小鼠脂肪组织 *lncRNA11* 转录水平极低, 符合基因敲除的目标。同时检测脂肪组织关键产热蛋白 UCP1 的转录水平, *lncRNA11* 缺陷小鼠脂肪组织中 UCP1 的转录水平相比野生型显著降低。

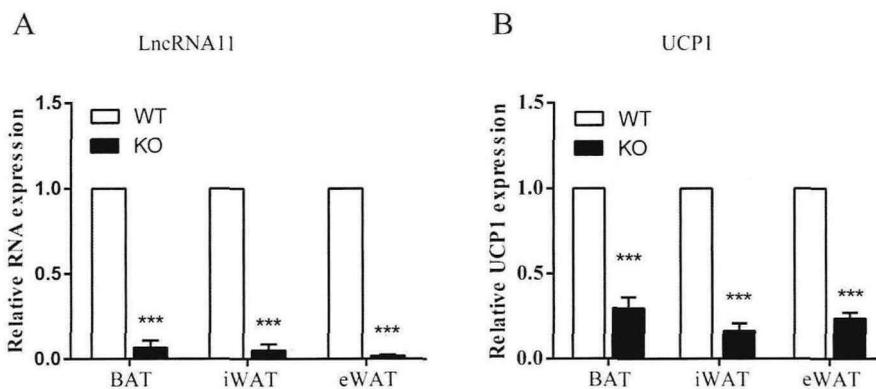


图 2-3 基因敲除小鼠体内脂肪组织的 *lncRNA11*、UCP1 转录水平。(A) *lncRNA11* 转录水平 ($n=6$)。 (B) UCP1 转录水平。 $n=6$ 。 *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, 野生型小鼠 (WT) vs. *lncRNA11* 缺陷小鼠 (KO)。

第二节 LncRNA11 缺陷对小鼠脂肪组织和代谢水平的影响

在本章第一节中，成功培育了 LncRNA11 缺陷小鼠，并利用 RT-qPCR 技术验证小鼠脂肪组织中 LncRNA11 表达缺失。本节选取同窝野生型和 LncRNA11 缺陷小鼠，测定其体重、体脂、GTT、ITT 和呼吸代谢水平等相关表型，评估 LncRNA11 缺陷对小鼠脂肪代谢的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物

8 周龄同窝野生型和 LncRNA11 缺陷小鼠，所有实验动物操作程序均按照中国医学科学院北京协和医学院动物伦理委员会标准进行，伦理审查编号：SLXD-20220426014。

1.2 实验试剂

表 2-5 实验试剂

名称	厂家	货号
线粒体压力试剂盒	Agilent 公司	103015-100
4%组织细胞固定液	索莱宝	No.P1110
SDS-PAGE 凝胶试剂盒	康为世纪	CW0022S
蛋白酶抑制剂	大连美仑生物	MB2678
RIPA 裂解液	碧云天	P0013B
5×Loading buffer	康为世纪	CW0028
Protein Marker	金斯瑞生物科技	M00624-250
电泳缓冲液	康为世纪	CW0045S
转膜缓冲液	康为世纪	CW0044S
封闭液	碧云天	P0252
TBST	康为世纪	CW0043S
丽春红染液	碧云天	P0022
ECL 发光液	大连美仑生物	MA0186-1
抗 GAPDH 抗体	Abcam	Ab9485
抗 UCPI 抗体	Abcam	Ab10983
抗 FABP4 抗体	Abcam	Ab92501
抗 CEBP α 抗体	Abcam	Ab40764
抗 β -actin 抗体	易科拜德	EXP0041F

HRP 羊抗鼠二抗	柏奥易杰	BE0102
HRP 鼠抗兔二抗	柏奥易杰	BE0101

1.3 实验仪器

表 2-6 实验仪器设备

名称	厂家	型号
体脂仪	Bruker	LF50/90
血糖仪	鱼跃	580
Seahorse 代谢仪	Agilent	Seahorse XFe24
动物代谢分析系统	Panlab	Oxylet Pro
Leica 切片机	强生	RM2135
Leica 包埋机	强生	EG1160
全景扫描仪	Aperio 公司	CS2
透射电子显微镜	日本电子株式会社	JEM-1400plus
超声波清洗器	昆山市超声仪器有限公司	KQ-50B
连续波长酶标仪	Tecan 公司	Infinite M1000
荧光倒置显微镜	Nikon	Ts2R
垂直电泳仪	Bio-rad	1658001
转印槽	Bio-rad	1703930
翘摆摇床	Kylin-Bell	TS-8
水平脱色摇床	北京市六一仪器厂	WD-9405B
多功能成像分析系统	上海琴翔	Genosens 1500

2 实验方法

2.1 LncRNA11 缺陷小鼠脂肪原代细胞的呼吸代谢水平检测

利用 Seahorse 能量代谢仪检测基因敲除小鼠脂肪原代细胞的呼吸代谢水平。

脂肪原代细胞提取：按照第一章实验方法 2.21 分别提取基因敲除小鼠和野生型小鼠的棕色脂肪原代细胞、腹股沟白色脂肪原代细胞，接种至十二孔板，于细胞培养箱培养（37 °C，5% CO₂）。细胞长至 70%密度时，加入胰酶消化细胞，停止消化后离心，加入培养基重悬并计数，细胞终密度稀释为 6×10⁴ 个/mL。将细胞接种至 XF24 板中，留出 4 个背景孔不加液体，XF24 板于细胞培养箱（37 °C，5% CO₂）培养过夜，使细胞贴壁。

水化探针板：探针板相同位置留出 4 个背景孔，剩余每孔加入 1 mL 校正缓冲液，放于培养箱（37 °C，无 CO₂）中水化过夜。

配制分析培养基：利用分析基础培养基加入 L-谷氨酰胺、丙酮酸钠、葡萄糖配制成分析工作培养基，含 L-谷氨酰胺 2 mmol/L、丙酮酸钠 1 mmol/L、葡萄糖 25 mmol/L，调 pH 值为 7.4，4 °C 避光保存。

细胞呼吸代谢水平测定：隔天从细胞培养箱中取出细胞贴壁 XF24 板，吸除原培养基，并用分析培养基洗涤细胞孔 2 次，培养基更换为 37 °C 预热的分析工作培养基。继续放入 37 °C、无 CO₂ 培养箱中平衡 1 h。同时配制 A、B、C 药液，预实验后确定 A、B、C 工作液浓度为：A 液 10 μm/L、B 液 10 μm/L、C 液 5 μm/L。拿出水化探针板，A 孔加入 50 μL A 液，B 孔加入 62 μL B 液，C 孔加入 69 μL C 液，放入仪器平衡 25 min，平衡完毕后放入细胞贴壁 XF24 板，操作程序测定细胞的呼吸代谢水平。

2.2 LncRNA11 缺陷小鼠的呼吸代谢水平检测

利用动物代谢分析系统检测小鼠的呼吸代谢水平，首先将小鼠放置于 Oxylet Pro-代谢笼中，适应 24 h，自由饮水饮食，12 h/12 h 明暗循环。适应期结束后，连续 24 h 实时监测小鼠的呼吸熵，气体变化（氧气、二氧化碳、水蒸汽），以及小鼠的进食量、饮水量、运动情况。实验结束后对小鼠的基础耗氧量和二氧化碳生成量进行统计分析。

2.3 小鼠葡萄糖耐量检测

正式实验前一周对小鼠进行掐尾适应训练，避免小鼠在实验过程中出现应激性高血糖。实验前一天换上干净垫料，小鼠饥饿 14 h。实验当天，剪尾取血，测定小鼠血糖（0 min），随后立即给小鼠灌胃葡萄糖溶液（0.2 g/mL），剂量为 2 g/kg，随后计时并记录小鼠灌胃葡萄糖后 15、30、45、60、90、120 min 时小鼠的血糖值。

2.4 小鼠胰岛素耐量检测

正式实验前一周对小鼠进行掐尾适应训练，避免小鼠在实验过程中出现应激性高血糖。实验前一天换上干净垫料，小鼠饥饿 14 h。实验当天，剪尾取血，测定小鼠血糖（0 min），随后给小鼠灌胃葡萄糖溶液（0.2 g/mL），剂量为 2 g/kg，再立即对小鼠腹腔注射胰岛素（0.75 U/kg），计时并记录小鼠灌胃葡萄糖后 15、30、45、60、90、120 min 时小鼠的血糖值。

2.5 小鼠体脂率检测

提前一晚打开体脂仪，预热过夜。开机平衡仪器后，将小鼠放入测定笼具桶中，利用调节杆卡住小鼠，使其不能自由移动，将测定桶放置到仪器中，操作控制面板程序，利用核磁共振原理测定小鼠体成分。

2.6 小鼠组织分离取材

2 周龄同窝小鼠进行基因型鉴定后, 分开饲养于标准鼠笼中, 每周记录小鼠体重, 称重前小鼠禁食不禁水 12 h。6 周后, 处死小鼠, 快速剪取小鼠体内脾、肝、肺、肾、心组织、骨骼肌、脑组织、腹股沟白色脂肪组织和肩胛处的棕色脂肪组织称重记录, 脂肪样本取一小部分切成 2-5 mm² 大小放入电镜固定液中, 剩下的取一半固定在 4% 多聚甲醛溶液中, 一半置于去酶管中冻存于 -80 °C 冰箱。

2.7 小鼠脂肪组织 HE 染色

脂肪组织在 4% 多聚甲醛中固定 48 h, 冲洗掉组织固定液后, 石蜡包埋切片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇溶液水洗, 苏木素染细胞核 5 min, 水洗后, 氨水返蓝, 自来水冲洗, 伊红染细胞质 3 min, 梯度乙醇洗脱, 二甲苯脱水透明化, 中性树胶封片, 即可在显微镜下观察, 采集分析图像。

2.8 小鼠脂肪组织 UCP1 免疫组化染色

脂肪组织石蜡包埋切片, 烤片脱蜡后, 水洗, 封闭, 透化, 微波抗原修复, 放入湿盒内, 免疫组化笔在组织周围画上疏水屏障, BSA 封闭 30 min (37 °C), PBS 洗 3 次, 一抗孵育过夜 (4 °C), PBS 洗 3 次, 二抗孵育 2 h (37 °C), PBS 洗 3 次, 利用 DAB 溶液显色 10 min, 苏木素复染, 水洗, 二甲苯脱水透明化, 封片, 显微镜下观察, 采集分析图像。

2.9 透射电镜观察小鼠脂肪组织线粒体结构

脂肪组织室温避光固定 72 h, 去固定液, PBS 漂洗 3 次, 1% 的渗透酸溶液固定 1 h, 去固定液, PBS 漂洗 3 次, 梯度脱水处理, 包埋剂渗透包埋, 加热聚合过夜, 超薄切片, 染色, 透射电镜下观察, 采集分析图像。

2.10 RT-qPCR 检测小鼠脂肪组织产热基因的转录水平

实验操作同第一章 3.12-3.14, 引物序列如下表:

表 2-7 基因引物序列

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
<i>18s</i>	CATGCAGAACCCACGACAGTA	CCTCACGCAGCTTGTTGTCTA
<i>Ucp1</i>	AGGCTTCCAGTACCATTAGGT	CTGAGTGAGGCAAAGCTGATTT
<i>Prdm16</i>	CCAAGGCAAGGGCGAAGAA	AGTCTGGTGGGATTGGAATGT
<i>Pparg</i>	TCGCTGATGCACTGCCTATG	GAGAGGTCCACAGAGCTGATT
<i>Pparg1α</i>	TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT	CCACTTCAATCCACCCAGAAAG

<i>Dio2</i>	AATTATGCCTCGGAGAAGACCG	GGCAGTTGCCTAGTGAAAGGT
<i>Cidea</i>	TGACATTCATGGGATTGCAGAC	GGCCAGTTGTGATGACTAAGAC
<i>aP2</i>	AAGGTGAAGAGCATCATAACCCT	TCACGCCTTTCATAACACATTCC
<i>Cox5a</i>	GCCGCTGTCTGTTCCATTC	GCATCAATGTCTGGCTTGTGAA
<i>Cox7b</i>	TTGCCCTTAGCCAAAAACGC	TCATGGAAACTAGGTGCCCTC
<i>Cox8b</i>	TGTGGGGATCTCAGCCATAGT	AGTGGGCTAAGACCCATCCTG
<i>Elovl3</i>	TTCTCACGCGGGTTAAAAATGG	GAGCAACAGATAGACGACCAC

2.11 Western blot 检测小鼠脂肪组织相关产热蛋白的表达

利用蛋白印迹法检测 *GM44386* 基因敲除对小鼠脂肪组织相关产热蛋白:UCP1、FABP4、CEBP α 表达水平的影响。

提取脂肪组织总蛋白: 脂肪组织切取 0.1 g 左右, 置于标记的去酶管中, 加入 500 μ L 裂解液 (RIPA: 蛋白酶抑制剂 = 100: 1), 冰上剪碎研磨, 冰水中超声 45 min, 4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm, 离心 5 min, 转移上清液到新的离心管中, 利用 BCA 试剂盒按照说明书进行蛋白质浓度定量, 剩余部分加入 5 \times loading buffer, 金属浴 100 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 取出放凉至室温, 5000 rpm 离心, -20 $^{\circ}$ C 储存。

制胶: 清洗配胶模具, 按照制胶试剂盒说明书, 配制 10%分离胶溶液, 异丙醇压线, 室温凝固 45 min, 弃去异丙醇, 配制上层浓缩胶溶液, 插入梳子, 室温凝固 30 min, 即可使用。

SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 将玻璃板卡入电泳槽中, 加入 1 \times 电泳缓冲液, 拔出梳子, 依次在胶孔中加入 4 μ L Marker, 10 μ L 蛋白样品, 80 v 恒压电泳 30 min, 观察到样品刚至分离胶, 改为 100 v 恒压电泳约 80 min, 观察到溴酚蓝至胶底部后, 停止电泳。

转膜: 准备转膜工具, 配制转膜缓冲液 (10 \times 转膜液: 甲醇: 蒸馏水 = 7: 2: 1), 将 PVDF 膜预先放入甲醇中活化 30 s, 裁出分离胶, 与滤纸、海绵、PVDF 膜于转膜液中平衡 3 min, 转膜夹黑板上依次放上海绵、滤棉、滤纸、胶、PVDF 膜、滤纸、滤棉、海绵, 排除气泡, 盖上转膜夹白板, 固定, 放于转膜槽中, 加入 1 \times 转膜液, 将转膜盒放在冰水中, 连接仪器正负极, 开始转膜, 300 mA 恒流转膜 55 min。

丽春红染色: 取出 PVDF 膜, 剪去左上角标记, 将膜置于 TBST 溶液中漂洗后, 加入丽春红染液, 放在平板摇床上, 染色 3 min。利用清水重复漂洗, 膜上出现清晰的蛋白印迹条带, 表明转膜成功。回收丽春红染液, TBST 漂洗至染色褪去。

封闭: PVDF 膜放入抗体孵育盒中加入快速封闭液浸没, 放置于平板摇床上室温孵育 15 min。

免疫杂交: 回收封闭液, 加入目标蛋白的一抗溶液, 4 $^{\circ}$ C 摇晃孵育过夜。回收一抗, TBST 振荡漂洗 3 次, 加入与一抗同一属性的二抗溶液, 室温摇晃孵育 1 h,

回收二抗，TBST 振荡漂洗 3 次。

显影：配制发光液（A 液：B 液 = 1：1），提前打开相机预冷到 -30 °C，将膜放置在防护板上，保持贴合无气泡，轻轻滴加发光液，均匀覆盖整张膜，将防护板放入暗箱中，运行图像采集分析软件，曝光显影，保存图片，image J 软件扫描灰度，进行定量分析。

2.12 统计学分析

利用 Graphpad Prism 6.0 对实验数据进行统计学分析，结果表示为 Mean ± SEM。数据采用单因素方差分析，组间 *T* 检验。 $P < 0.05$ 认为具有统计学差异。

3 实验结果

3.1 LncRNA11 缺陷对小鼠体重、体脂、脏器系数的影响

为了探究 lncRNA11 对小鼠代谢的影响，本章研究构建了 lncRNA11 缺陷小鼠，对刚出生的同窝野生型和 lncRNA11 缺陷小鼠进行正常饲料饲养 8 周，测定其体重、体脂和组织重量，结果显示野生型和 lncRNA11 缺陷小鼠的体重和体脂率没有显著差别，而 lncRNA11 缺陷小鼠的 BAT 重量相比野生型显著降低，是野生型小鼠 BAT 的 0.79 倍，iWAT 重量显著升高，是野生型小鼠中 iWAT 重量的 1.38 倍。这提示 lncRNA11 缺陷可能影响棕色脂肪组织的发育，并且诱导皮下脂肪堆积。

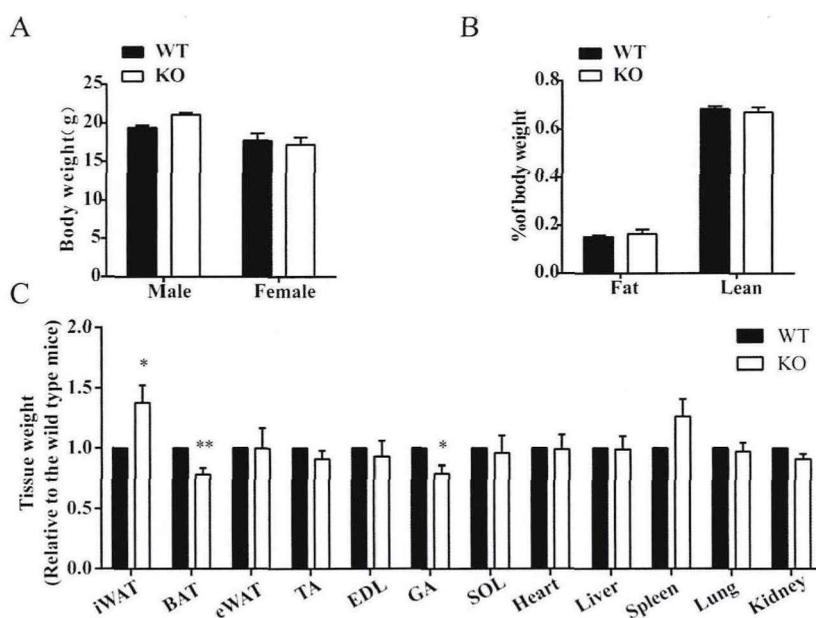


图 2-4 LncRNA11 缺陷对小鼠体重、体脂率和脏器系数的影响。(A) 体重。(B) 体脂。(C) 脏器系数。n = 5。 ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, 野生型小鼠 (WT) vs. LncRNA11 缺陷小鼠 (KO)。

3.2 LncRNA11 缺陷对小鼠胰岛素敏感性的影响

通过口服葡萄糖糖耐量检测和胰岛素耐量检测对 LncRNA11 缺陷小鼠的葡萄糖代谢能力进行了评价。如图 2-5-A 所示, 小鼠灌胃葡萄糖后, 立即检测 2 h 内血糖变化情况, 发现 LncRNA11 缺陷小鼠的血糖升高速度显著高于野生型小鼠, 葡萄糖耐量水平相对野生型小鼠降低。小鼠注射等量胰岛素立即检测 2 h 内血糖变化情况, 发现野生型小鼠的血糖在各时间节点均低于 LncRNA11 缺陷小鼠, 表现出更好的胰岛素抵抗能力, 上述结果表明 LncRNA11 缺陷导致小鼠的胰岛素敏感性下降。

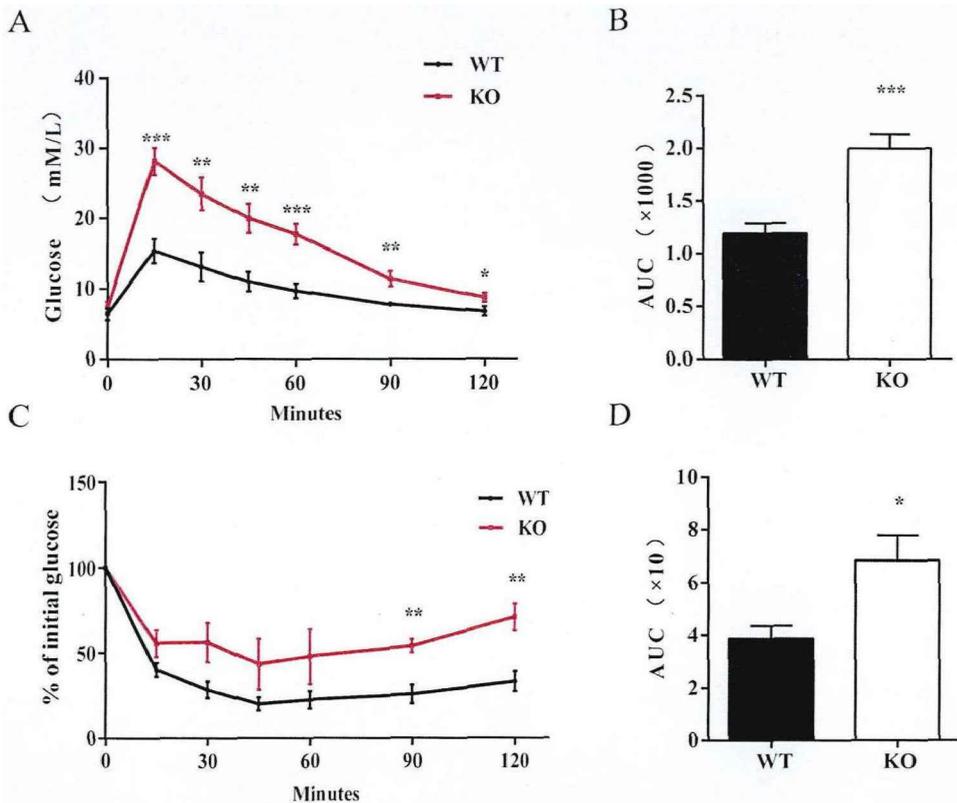


图 2-5 LncRNA11 缺陷小鼠的胰岛素敏感性下降。(A) 口服葡萄糖耐量实验结果。(B) 曲线下面积。(C) 胰岛素耐量实验结果。(D) 曲线下面积。n = 7。*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, 野生型小鼠 (WT) vs. LncRNA11 缺陷小鼠 (KO)。

3.3 LncRNA11 缺陷对小鼠呼吸代谢水平的影响

利用小动物代谢分析系统检测小鼠在室温条件下消耗的 O₂ 量和生成 CO₂ 量评估小鼠的呼吸代谢水平。实验数据显示, LncRNA11 缺陷小鼠白天的 O₂ 消耗速率为 9.82 mL/min/kg, CO₂ 生成速率为 9.15 mL/min/kg, 晚上的 O₂ 消耗速率为 9.57 mL/min/kg, CO₂ 生成速率为 9.29 mL/min/kg; 野生型小鼠白天的 O₂ 消耗速率为 11.94 mL/min/kg, CO₂ 生成速率为 10.23 mL/min/kg, 晚上的 O₂ 消耗速率为 12.57 mL/min/kg, CO₂ 生成速率为 11.4 mL/min/kg。LncRNA11 缺陷小鼠白天和黑夜的氧气消耗速率和 CO₂ 生成速率都显著低于野生型小鼠, 说明 LncRNA11 缺陷小鼠的呼吸代谢水平相比正常小鼠显著下降。

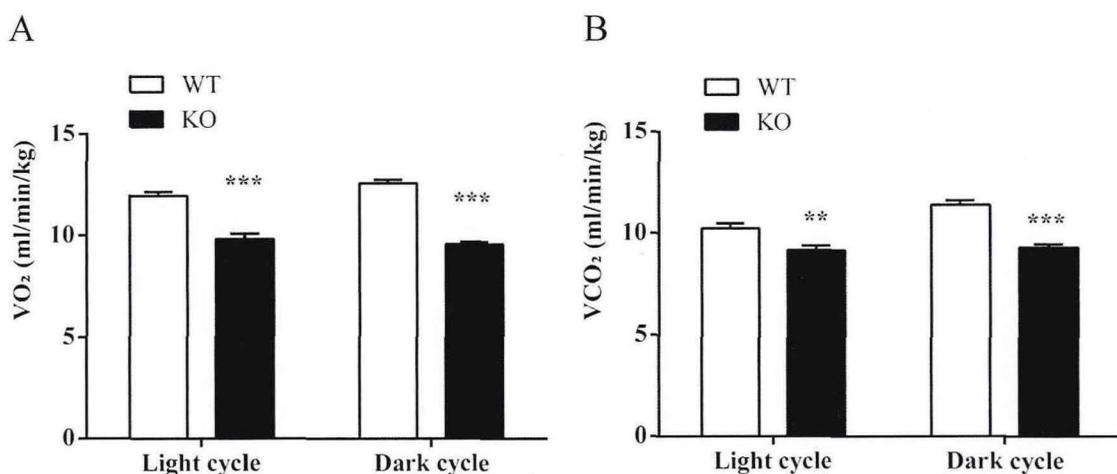


图 2-6 LncRNA11 缺陷小鼠的呼吸代谢水平下降。(A) 氧气消耗速率 (V_{O2})。(B) 二氧化碳释放速率 (V_{CO2})。n = 5。***P < 0.001, **P < 0.01, 野生型小鼠 (WT) vs. LncRNA11 缺陷小鼠 (KO)。

3.4 LncRNA11 缺陷对小鼠脂肪组织的影响

剪取野生型和 LncRNA11 缺陷小鼠的脂肪组织观察、称重，发现 LncRNA11 缺陷小鼠相比于野生型小鼠，皮下脂肪和棕色脂肪的颜色变浅，且皮下脂肪质量升高，棕色脂肪质量下降。利用 H&E 染色和 UCP1 免疫组化染色进一步探究基因敲除对小鼠脂肪组织的影响。H&E 染色观察和半定量分析结果显示 LncRNA11 缺陷导致小鼠棕色脂肪细胞和腹股沟白色脂肪细胞的体积均显著增大，UCP1 免疫组化染色观察和半定量分析结果显示 LncRNA11 缺陷小鼠皮下脂肪中 UCP1 蛋白表达量相比野生型显著减少，棕色脂肪中的 UCP1 蛋白表达量无显著变化。结果表明 LncRNA11 缺陷影响棕色脂肪组织的发育，同时降低 iWAT 中关键产热蛋白 UCP1 的表达量，削弱了其产热能力，增加了 iWAT 中的脂质堆积。

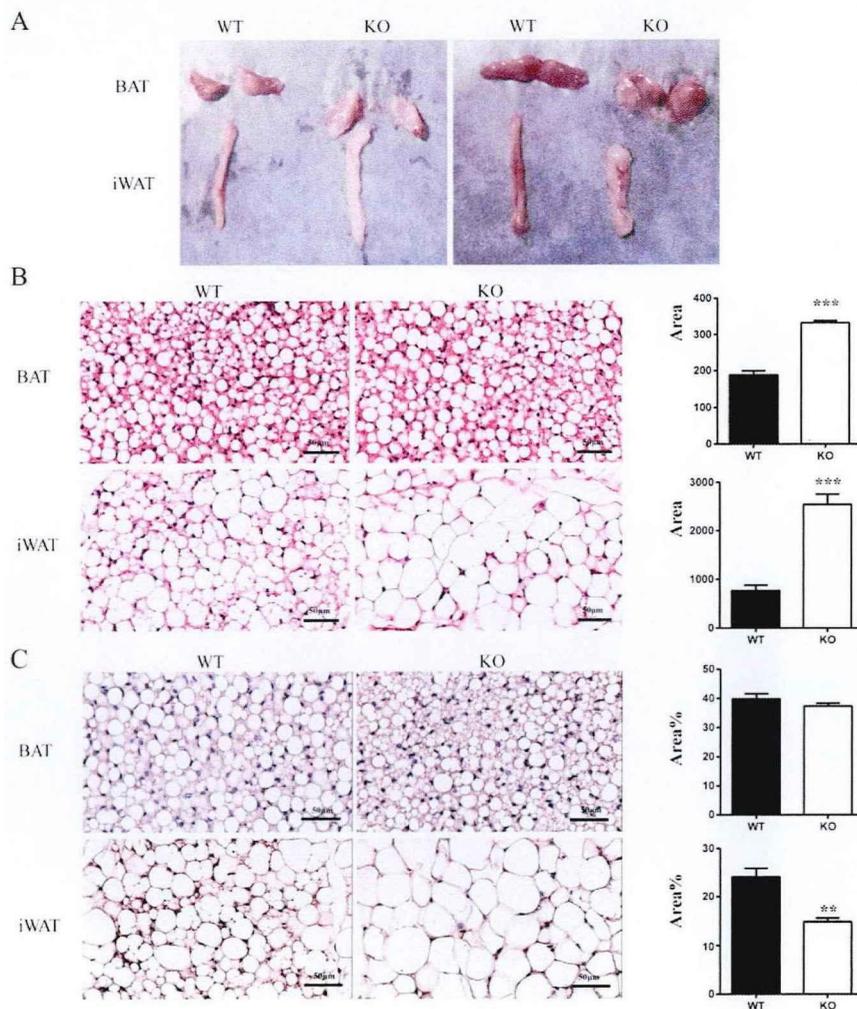


图 2-7 LncRNA11 缺陷对小鼠脂肪组织的影响。(A) 脂肪组织自然光下观察拍照。(B) HE 染色和半定量分析。(C) UCP1 免疫组化染色和半定量分析。Scale bar: 50 μ m, n = 3。*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, 野生型小鼠 (WT) vs. LncRNA11 缺陷小鼠 (KO)。

3.5 LncRNA11 缺陷对小鼠相关产热蛋白转录水平的影响

利用 RT-qPCR 技术检测 *lncRNA11* 缺陷小鼠脂肪组织中产热相关基因的转录水平表达情况。查阅文献，选取关键产热蛋白：脂肪酸结合蛋白（FABP4）、诱导细胞死亡的 DFFA 样效应子（CIDEA）和 II 型脱碘酶（Dio2）；产热基因调控因子：过氧化物酶体增殖物激活受体 γ （PPAR γ ）、PPAR γ 共激活因子 1 α （PGC1 α ）、PR 结构域蛋白 16（PRDM16）。结果显示，在基因敲除小鼠的白色脂肪组织中，包括 UCP1 在内的产热标志蛋白转录水平均显著下降，而棕色脂肪组织中，UCP1 等产热关键蛋白及 PPAR γ 等脂肪分化转录因子的表达均显著下降。以上结果表明 *lncRNA11* 缺陷在转录水平上降低了脂肪组织中分化和产热相关基因的表达。

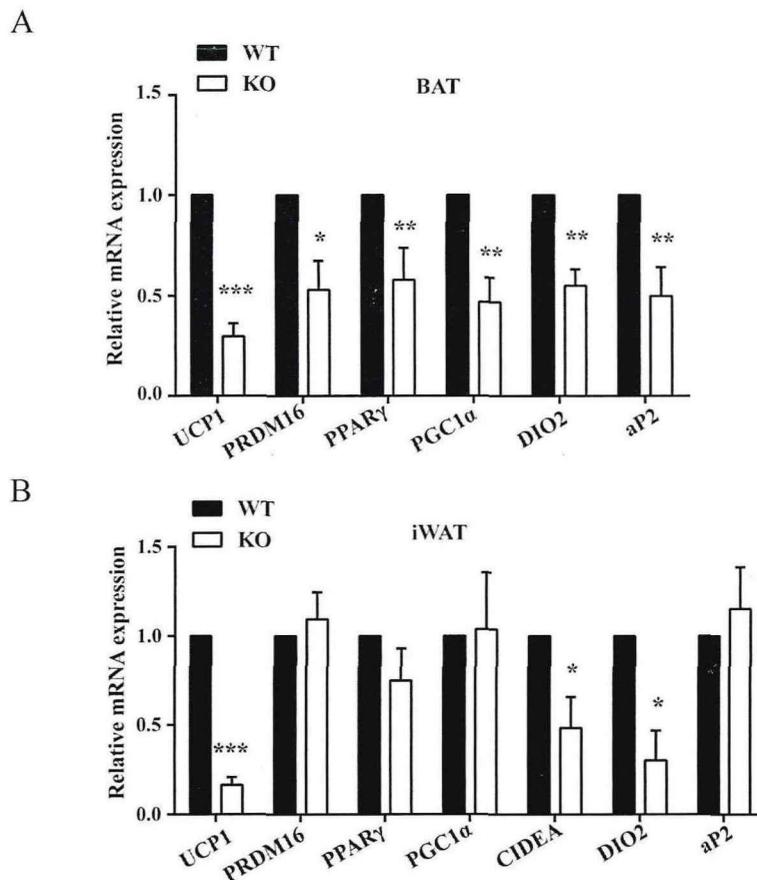


图 2-8 *LncRNA11* 缺陷对小鼠脂肪组织中产热相关基因转录水平的影响。(A) 棕色脂肪组织中的产热相关基因转录水平。(B) 皮下脂肪组织中的产热相关基因转录水平。n = 5。*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, 野生型小鼠 (WT) vs. *LncRNA11* 缺陷小鼠 (KO)。

3.6 LncRNA11 缺陷对小鼠脂肪中产热相关蛋白表达量的影响

利用 Western blot 技术检测小鼠脂肪中代谢功能标志性蛋白 UCP1、CEBP α 、FABP4 的表达水平。解偶联蛋白 1 (UCP1) 是棕色脂肪的核心产热蛋白, 通过解偶联 ATP 生成, 使化学能以热能形式释放, 是哺乳动物非颤栗性产热的重要方式。CCAAT/增强子结合蛋白 (CEBP α) 是脂肪组织形成过程中的转录级联调控因子, 其功能是维持 PPAR γ 的表达以及调节脂肪细胞基因亚群, 后者调节包括脂联素分泌、胰岛素依赖性葡萄糖摄取等过程^[26]。脂肪酸结合蛋白 4 (FABP4) 属于脂肪酸代谢相关的 FABPs 家族, 是一种典型的胞内脂质伴侣, 负责促进脂质储存、分布、运输、分解、代谢过程, 研究表明其主要在分化的脂肪细胞和巨噬细胞中表达, 介导炎症反应和胆固醇蓄积, 与代谢性疾病的发展密切相关^[50]。结果显示, 这些代谢功能相关蛋白在 LncRNA11 缺陷小鼠皮下脂肪中的表达水平显著低于野生型, 在 LncRNA11 缺陷小鼠棕色脂肪组织中的表达水平也出现下降趋势。

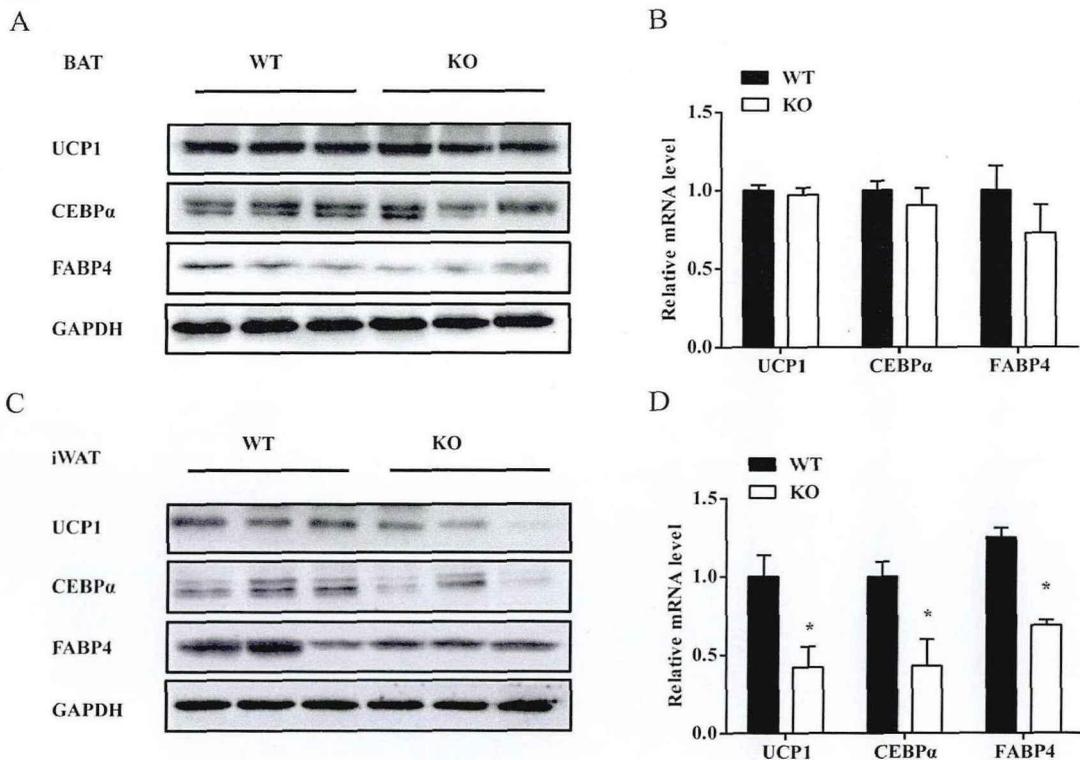


图 2-9 LncRNA11 缺陷对小鼠脂肪组织中产热蛋白 UCP1、CEBP α 、FABP4 表达水平的影响。(A) 棕色脂肪组织的蛋白印迹图。(B) 棕色脂肪组织的蛋白相对表达量统计分析。(C) 皮下脂肪组织中的蛋白印迹图。(D) 皮下脂肪组织的蛋白相对表达量统计分析。n = 3。* $P < 0.05$, 野生型小鼠 (WT) vs. LncRNA11 缺陷小鼠 (KO)。

3.7 LncRNA11 缺陷小鼠 BAT 中线粒体结构和关键基因的转录水平

前述结果表明基因敲除小鼠的呼吸代谢水平和脂肪组织的产热蛋白表达水平相比野生型小鼠均显著下降，而线粒体是脂肪细胞中脂肪酸氧化和代谢产热的关键场所。本实验利用透射电镜观察 BAT 中线粒体的超微结构，电镜结果显示 LncRNA11 缺陷小鼠体内 BAT 中线粒体数量减少、结构上出现自溶且线粒体嵴消失的现象，而野生型小鼠线粒体结构完整清晰。

利用 RT-qPCR 技术检测 BAT 中线粒体氧化磷酸化关键基因的表达情况，结果显示 LncRNA11 缺陷小鼠 BAT 中细胞色素 C 氧化酶亚基蛋白（COX5A、COX7B、COX8B）的 mRNA 水平相比野生型均出现下降趋势。上述结果表明 LncRNA11 缺陷导致小鼠脂肪组织中的线粒体结构损伤和氧化磷酸化关键基因表达下降。

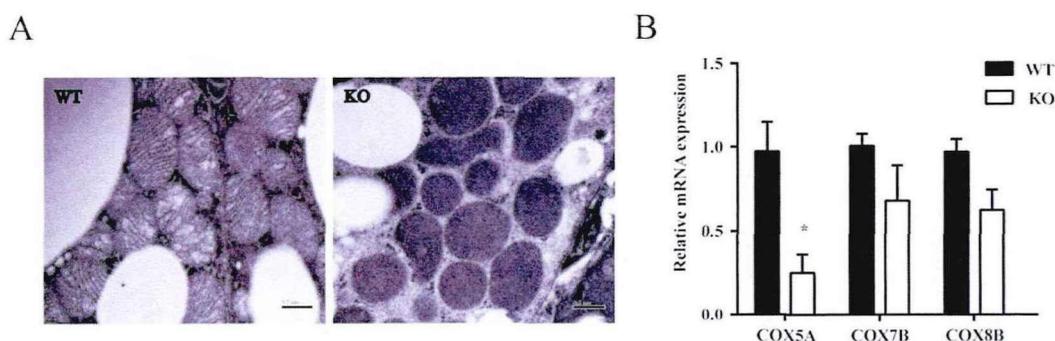


图2-10 LncRNA11 缺陷损伤小鼠棕色脂肪线粒体的结构和线粒体氧化磷酸化功能关键基因表达。

(A) 透射电镜观察线粒体结构图，scale bar: 0.5 μm (n = 3)。(B) 线粒体氧化磷酸化功能关键蛋白 COX5A、COX7B、COX8B 的 mRNA 表达水平 (n = 5)。* $P < 0.05$ ，野生型小鼠 (WT) vs. LncRNA11 缺陷小鼠 (KO)。

3.8 Seahorse 实验发现 lncRNA11 缺陷抑制脂肪原代细胞氧化磷酸化水平

氧化磷酸化是脂肪细胞中线粒体产生能量的主要途径，为研究 lncRNA11 缺陷对小鼠脂肪线粒体功能的影响，提取野生型小鼠和基因敲除小鼠脂肪原代细胞，体外培养，利用 Seahorse XF 能量代谢仪直接测定脂肪原代细胞的细胞耗氧率（OCR）评估细胞内线粒体的氧化磷酸化水平，表征线粒体功能。测试过程中依次加入线粒体电子传递链的靶向药物，在测定细胞基础呼吸后加入 ATP 合酶抑制剂寡霉素（Oligomycin），降低线粒体呼吸水平；加入解偶联剂（FCCP），电子传递链中的复合物IV耗氧量达到最大，刺激线粒体耗氧量达到最大水平；加入抗霉素 A/鱼藤酮复合物，分别抑制电子传递链中的复合物III和复合物 I，关闭线粒体呼吸。研究结果显示，lncRNA11 缺陷小鼠棕色脂肪原代细胞的基础呼吸水平显著降低，皮下脂肪原代细胞的基础呼吸水平也呈下降趋势，表明 lncRNA11 缺陷导致小鼠脂肪组织线粒体氧化磷酸化功能受损。

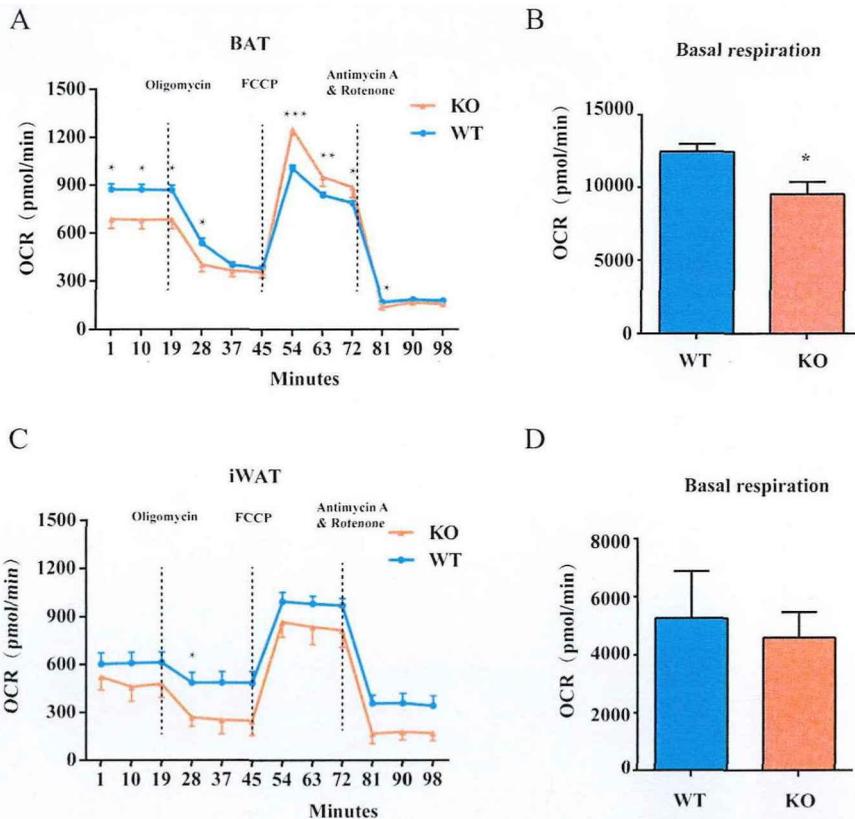


图 2-11 Seahorse 实验发现 lncRNA11 缺陷抑制脂肪原代细胞氧化磷酸化水平。（A）棕色脂肪原代细胞的细胞耗氧速率。（B）棕色脂肪原代细胞的基础呼吸水平。（C）皮下脂肪原代细胞的细胞耗氧速率。（D）皮下脂肪原代细胞的基础呼吸水平。n = 5。*** $P < 0.001$ ，** $P < 0.01$ ，* $P < 0.05$ ，野生型小鼠脂肪原代细胞（WT） vs. lncRNA11 缺陷小鼠脂肪原代细胞（KO）。

第三节 LncRNA11 缺陷对高脂饮食诱导小鼠脂质代谢的影响

上一节研究对野生型和 LncRNA11 缺陷小鼠正常饲料喂养 8 周，通过测定小鼠体重、体脂、GTT、ITT、呼吸代谢水平等相关表型，探究了 LncRNA11 缺陷对小鼠代谢和脂肪组织的影响。本节研究利用高脂饲料喂养野生型和 LncRNA11 缺陷小鼠 12 周，探究 LncRNA11 缺陷对高脂饮食诱导小鼠脂肪代谢的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物

同窝野生型和 LncRNA11 缺陷小鼠，高脂饲料喂养 12 周，所有实验动物操作程序均按照中国医学科学院北京协和医学院动物伦理委员会标准进行，伦理审查编号：SLXD-20220520019。

1.2 实验试剂

同第二章第二节 1.2。

1.3 实验仪器

同第二章第二节 1.3。

2 实验方法

2.1 GTT 检测高脂诱导小鼠糖耐量

按照第二章第二节实验方法 2.2 步骤操作。

2.2 油红 O 染色检测高脂诱导小鼠肝脏脂质蓄积情况

按照第二章第二节实验方法 2.5 步骤操作对小鼠肝脏组织进行分离取材，然后按照该节 2.6 步骤对固定的肝组织进行脱水、透化、石蜡包埋，制成石蜡切片，用油红 O 染色。

2.3 透射电镜观察高脂诱导小鼠脂肪组织线粒体结构

按照第二章第二节实验方法 2.8 步骤操作。

2.4 统计学分析

利用 Graphpad Prism 6.0 对实验数据进行统计学分析，结果表示为 Mean \pm SEM。数据采用单因素方差分析，组间 *T* 检验。 $P < 0.05$ 认为具有统计学差异。

3 实验结果

3.1 LncRNA11 缺陷对高脂诱导小鼠体重变化的影响

为了检测 lncRNA11 缺陷是否加重高脂诱导小鼠的超重，研究跟踪记录了小鼠 9 周的体重情况。实验结果显示基因敲除小鼠的体重增加量显著低于野生型小鼠的体重增加量。

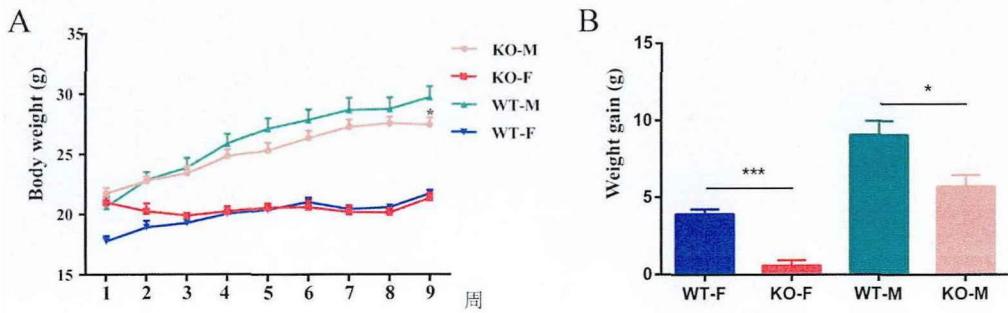


图 2-12 LncRNA11 缺陷对高脂喂养小鼠体重的影响。(A) 体重。(B) 体重增加量。n = 6。*** $P < 0.001$ ，雌性野生型小鼠 (WT-F) vs. 雌性 LncRNA11 缺陷小鼠 (KO-F)，* $P < 0.05$ ，雄性野生型小鼠 (WT-M) vs. 雄性 LncRNA11 缺陷小鼠 (KO-M)。

3.2 LncRNA11 缺陷加重高脂诱导小鼠糖耐量受损

通过口服葡萄糖检测小鼠糖耐量，计算血糖曲线下面积，OGTT 结果显示 lncRNA11 缺陷小鼠在灌胃葡萄糖后血糖升高速度与野生型小鼠无明显差别，但下降速度更慢，且最终血糖水平显著高于野生型小鼠。结果表明 lncRNA11 缺陷加重了高脂饲料喂养诱导的小鼠糖耐量受损。

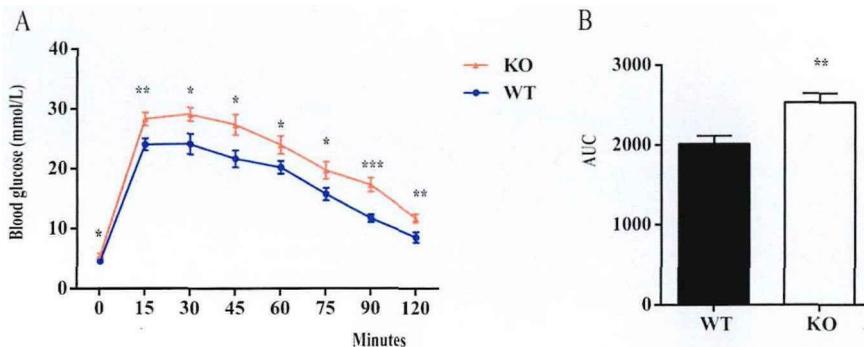


图 2-13 LncRNA11 缺陷加重高脂诱导小鼠糖耐量受损。(A) 口服葡萄糖耐量实验结果。(B) 曲线下面积。n = 10。*** $P < 0.001$ ，** $P < 0.01$ ，* $P < 0.05$ ，野生型小鼠 (WT) vs. LncRNA11 缺陷小鼠 (KO)。

3.3 LncRNA11 缺陷诱导高脂喂养小鼠肝脏脂质蓄积

高脂饮食诱导小鼠超重往往伴随着体内脂质代谢紊乱的情况，肝脏分解脂肪酸和甘油三酯的能力很强，参与脂肪酸 β 氧化，是进行脂肪代谢的重要场所。对小鼠的肝脏切片进行油红 O 染色观察，结果显示野生型小鼠体内的肝脏呈现较为正常状态，而 LncRNA11 缺陷小鼠体内的肝脏中出现大量细小红色脂滴，表明 LncRNA11 缺陷诱导高脂喂养小鼠体内脂质代谢紊乱，导致肝脏出现明显的脂质蓄积现象。

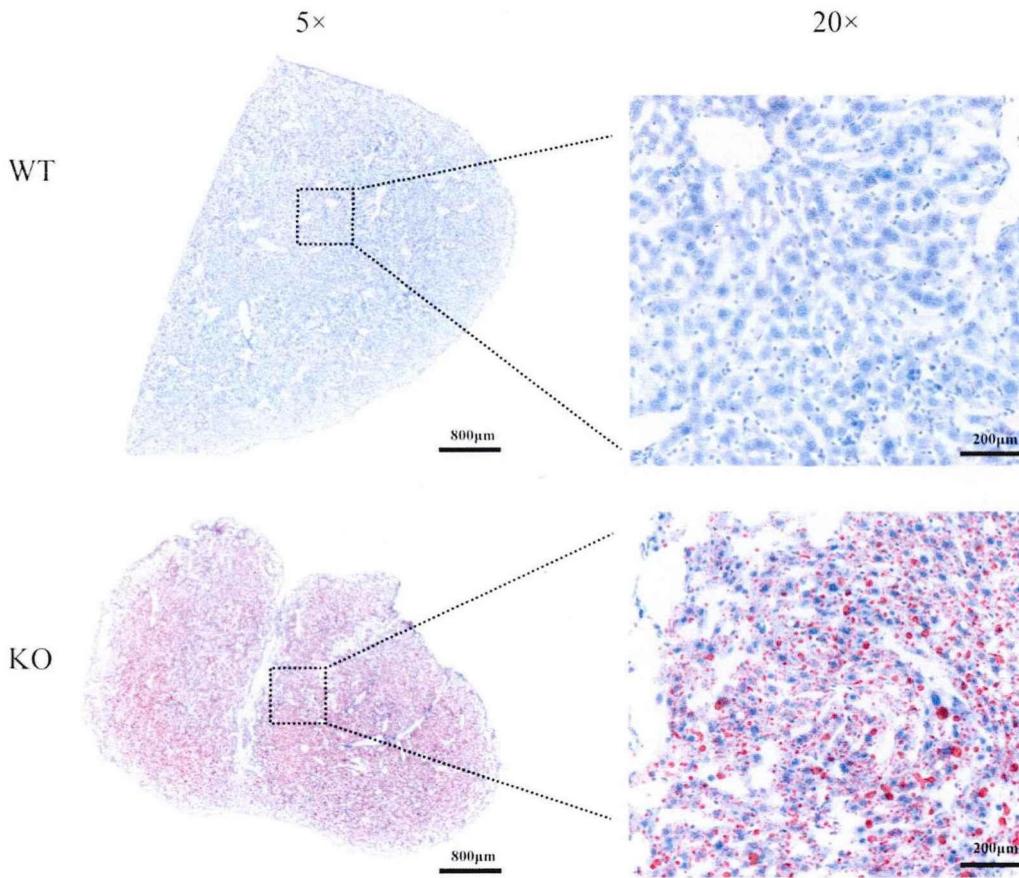


图 2-14 LncRNA11 缺陷诱导高脂喂养小鼠肝脏脂质蓄积。n = 3。野生型小鼠 (WT) vs. LncRNA11 缺陷小鼠 (KO)。

3.4 LncRNA11 缺陷导致高脂诱导小鼠脂肪组织中线粒体结构破坏和数量减少

脂肪组织线粒体是小鼠能量代谢的关键场所。利用透射电镜观察脂肪组织中的线粒体状况，电镜结果显示 *lncRNA11* 缺陷小鼠的 BAT 中线粒体体积减小，线粒体嵴密度降低，且出现自溶、边界模糊的现象，野生型小鼠线粒体较大，结构完整清晰。*lncRNA11* 缺陷小鼠皮下脂肪组织中的线粒体质量和数量相比野生型小鼠也明显降低。表明 *lncRNA11* 缺陷导致高脂喂养小鼠脂肪组织中线粒体结构破坏和数量减少。

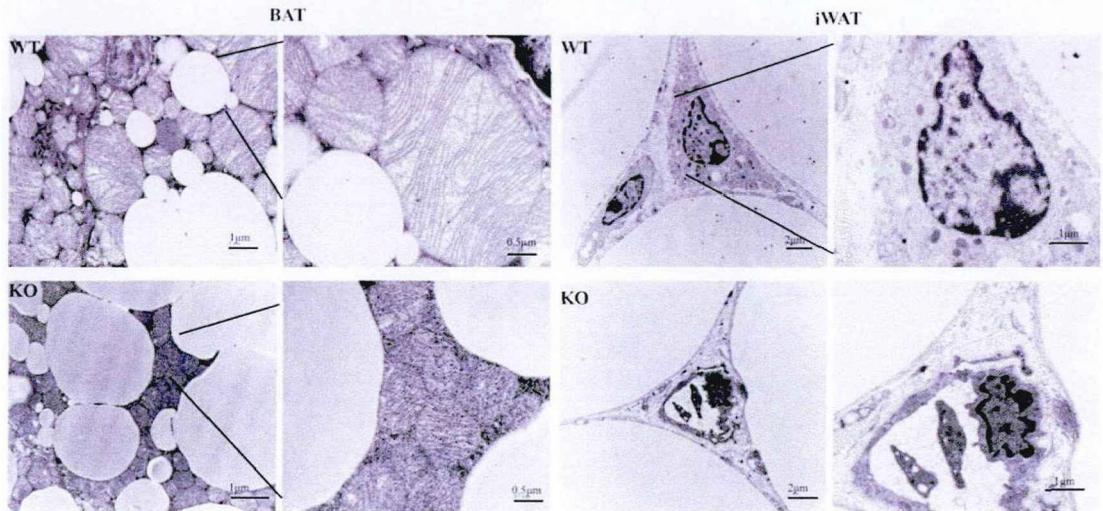


图 2-15 *LncRNA11* 缺陷损伤小鼠脂肪组织中线粒体的结构和数量。n = 3。野生型小鼠 (WT) vs. *LncRNA11* 缺陷小鼠 (KO)。

讨论

脂肪组织是一种分布在全身的动态器官,哺乳动物体内主要含有棕色脂肪和白色脂肪两种类型的成熟脂肪组织。棕色脂肪首次在冬眠动物和婴儿中发现,通过非颤抖性产热帮助维持适当的核体温。最近有临床证据表明在成人体内发现的活性 BAT 量,与成人体重指数、体脂量、血糖水平和糖尿病状态呈负相关^[51]。实验发现 *lncRNA11* 缺陷小鼠的棕色脂肪组织重量相比野生型显著降低,提示 *lncRNA11* 缺陷影响棕色脂肪组织的发育,而 KO 小鼠的胰岛素敏感性相对于野生型也显著降低,并且小鼠呼吸代谢水平下降。

棕色脂肪的主要功能是在适应性产热中将线粒体能量转化为热量,这源于其独有的特征。不同于 WAT,形态学上 BAT 包含多个小的(多室的)细胞质脂滴、中央核和大量线粒体,其产热功能主要依赖于细胞中含有的大量线粒体和产热蛋白 UCP1,棕色脂肪细胞中的主要产热蛋白还包括 CIDEA (UCP 1 的调节剂)、DIO 2 (在组织内将 T4 局部转化为活性 T3 的酶)等^[52],此外,转录因子 PRDM16、PGC1 α 、PPAR γ 等在脂肪组织发育与生热程序的表达中发挥调控作用^[41, 53, 54],研究发现 KO 小鼠脂肪组织中的这些关键基因和转录因子的转录水平表达量均下降,而关键产热蛋白 UCP 1、FABP4、CEBP α 的含量也下降,表明 *lncRNA11* 缺陷可能影响脂肪组织的产热代谢能力。

棕色脂肪中的线粒体是动态细胞器,可通过调节其数量、超微结构和生化指标满足生物体的产热需求。越来越多的证据表明线粒体在脂肪细胞分化和脂肪细胞代谢稳态中的重要作用,由于成熟脂肪细胞是代谢完全活跃的细胞,需要大量 ATP 调节细胞内 TG 平衡(即脂肪酸合成、脂肪酸 β -氧化和脂解),因此高度活跃的线粒体对脂肪细胞功能至关重要^[45]。脂肪线粒体功能的损伤会导致脂肪细胞的稳态失调,最终导致大量代谢疾病,如胰岛素抵抗、T2DM 和心血管疾病^[55-57]。值得注意的是, KO 小鼠棕色脂肪组织中的线粒体数量和质量显著下降,线粒体氧化磷酸化关键基因表达量显著降低,利用 Seahorse 仪检测基因敲除小鼠脂肪原代细胞的耗氧率,发现基因敲除小鼠线粒体耗氧率显著降低,表明线粒体氧化磷酸化功能受到损害,这也是加剧 KO 小鼠胰岛素抵抗等代谢紊乱发生的关键原因。

皮下脂肪组织是目前已知最大的脂肪储存库,主要由成熟的白色脂肪细胞组成,其含有单个胞质脂滴(单室)和位于外周的细胞核,其可以储存体内多余的脂质,并在机体需要的时候消耗甘油三酯产热。皮下脂肪组织的可塑性较强,研究发现外界环境的刺激如冷暴露、 β -肾上腺素刺激或或者运动激活能够导致皮下脂肪组织中产热基因程序表达上调,在皮下脂肪细胞中过表达 PRDM16 可诱导线粒体生物合成、氧化磷酸化和脂质氧化相关基因的表达,导致棕色化表型^[53]。研究发现 KO 小鼠的腹股沟白色脂肪细胞体积明显增大,且质量增加,说明 *lncRNA11* 缺陷加剧了小鼠

皮下脂肪组织细胞扩张和脂质蓄积，另外，其关键产热基因的表达量显著降低。表明 lncRNA11 缺陷影响了皮下脂肪组织的发育和棕色化能力。

总之，本章研究利用 CRISPR/ CAS9 技术对小鼠进行 *GM44386* 基因全身敲除，获得了稳定繁殖的 lncRNA11 缺陷小鼠。利用正常饲料喂养小鼠 8 周，对比野生型小鼠和 lncRNA11 缺陷小鼠的表型，发现 lncRNA11 缺陷导致小鼠出现胰岛素敏感性下降，呼吸代谢水平降低，脂质堆积等代谢紊乱现象，其原因可能主要在于脂肪细胞内的线粒体质量与氧化磷酸化功能受损，脂肪组织产热代谢功能遭到破坏。而在高脂饲料诱导小鼠超重模型上，基因敲除小鼠也表现出糖耐量受损，肝脏脂质蓄积且脂肪组织线粒体结构破坏和数量减少。综上，lncRNA11 是维持小鼠脂肪正常代谢功能的关键分子，其调控机制有待进一步研究。

第三章 LncRNA11 调控小鼠脂肪组织代谢的分子机制研究

引言

由于脂肪酸也是其他组织重要的能量底物，过量的脂质也会在肝脏、骨骼肌、心脏等组织中蓄积，脂肪异位蓄积与糖尿病、心血管疾病的发展密切相关，是肥胖相关代谢疾病的重要诱发因素^[6,7]。研究发现肥大性肥胖患者体内的脂肪前体细胞的数量并未减少，但前体细胞分化成脂肪细胞的能力受到损害^[58]，因此促进脂肪发育和产热功能能够防止脂肪细胞的病理性增大和脂肪的异位蓄积，维持全身能量平衡，防止肥胖相关代谢性疾病的发生发展。上一章研究发现 lncRNA11 是维持小鼠脂肪发育和代谢正常的关键分子，lncRNA11 缺陷小鼠表现出皮下脂肪堆积，胰岛素抵抗加剧等代谢紊乱特征，棕色脂肪组织内部线粒体的结构发生严重破坏，产热代谢基因的表达能力受损，而线粒体是脂肪组织中发生能量代谢的主要场所，发生丙酮酸氧化、三羧酸循环、脂肪酸 β 氧化和氧化磷酸化等能量代谢过程^[45]。

为了探讨 lncRNA11 缺陷导致小鼠体内脂质代谢紊乱和线粒体氧化磷酸化受损的分子机制，本章设计实验利用分子生物学技术和生物信息学分析方法继续进行深入探究，首先提取小鼠脂肪组织 RNA 进行转录组测序，通过分析差异表达基因发现 lncRNA11 缺陷影响脂肪组织的主要基因和信号通路，利用 RNA 免疫沉淀结合高分辨质谱发现 lncRNA11 的相互作用蛋白；其次在体外进行靶点验证：设计该蛋白的真核质粒，转染至 3T3-L1 前脂肪细胞中，并在体外诱导分化为成熟脂肪细胞，通过 BODIPY 染色、油红 O 染色、Elisa、RT-qPCR 等技术检测该靶点蛋白过表达对脂肪细胞分化和脂质代谢的影响，同时提取成熟脂肪细胞的 RNA 进行转录组测序研究，分析该蛋白过表达影响的主要基因和信号通路；第三，在工具细胞 NIH-3T3 中过表达该蛋白，通过蛋白免疫共沉淀进一步探究其影响脂质代谢的分子机制。免疫共沉淀实验利用抗原抗体之间特异性免疫结合的原理，在细胞裂解液中加入特异性抗体，可将抗原及与抗原结合的蛋白沉淀下来。免疫复合物可以利用质谱检测抗原的结合蛋白成员，也可以通过 Western blot 验证抗原和其他蛋白之间的相互作用，这种方法得到的互作蛋白是在细胞内与诱饵蛋白天然互作的，符合体内真实生理情况。

第一节 转录组学结合生物信息学方法发现 lncRNA11 调控的关键基因通路

过去几年,转录组测序技术迅速发展,成为在转录水平上分析差异表达基因和 RNA 可变剪接的重要工具。本节利用转录组测序技术对野生型小鼠和 lncRNA11 缺陷小鼠的脂肪组织 RNA 样本进行检测,基于生物信息学的方法对差异表达显著的 mRNA 进行分析,并通过功能富集分析发现 lncRNA11 缺陷影响脂肪组织的关键基因通路。

1 实验材料

1.1 实验动物:

8 周龄野生型和 lncRNA11 缺陷小鼠,所有实验动物操作程序均按照中国医学科学院北京协和医学院动物伦理委员会标准进行,伦理审查编号:SLXD-20220426014。

1.2 实验试剂

同第一章 1.2。

1.3 实验仪器

同第一章 1.3。

2 实验方法

2.1 lncRNA11 缺陷小鼠脂肪组织样品制备

实验步骤同第一章实验方法 3.11。

2.2 脂肪组织 RNA 提取

实验步骤同第一章实验方法 3.12。

2.3 RNA-Sequencing 检测

将从小鼠脂肪组织中提取的总 RNA 用干冰保存寄样,委托北京诺禾致源科技股份有限公司进行测样,检测 RNA 样品合格后进行 cDNA 文库构建,利用 Q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量,库检合格,利用 Illumina HiSeq 进行高通量测序,对原始数据进行统计分析,包括主成分分析、差异表达分析、KEGG 分析和 GO 分析。

2.4 统计学分析

利用皮尔逊相关系数的平方 (R^2) 评估样品重复性和相关性, 利用测序序列的 GC 含量、Q20、Q30 评估测序数据质量, 数据质量评估合格后再分析筛选差异表达基因。

3 实验结果

3.1 棕色脂肪组织 RNA 测序分析结果

本研究对 lncRNA11 缺陷小鼠和野生型小鼠的棕色脂肪组织 RNA 进行基因组测序, 对其基因表达谱进行差异分析, 以探索 lncRNA11 影响棕色脂肪组织的关键信号通路。在野生型小鼠和 lncRNA11 缺陷小鼠的棕色脂肪组织中, 基因差异表达倍数 > 2 倍的有 3889 个基因, 火山图显示有 2006 个基因上调, 1883 个基因下调。主成分分析表明组内样本重复性好, 组间样本差异性大。通过对差异显著基因进行 KEGG 分析, 发现 lncRNA11 缺陷显著下调了产热相关 72 个基因, 包括 *Adcy5*、*CPT1a*、*CPT1b* 等。同时, 氧化磷酸化通路 (含 49 个相关基因) 也被显著下调, 而脂肪酸代谢通路 (含 21 个相关基因) 被上调。结果提示, lncRNA11 缺陷主要影响棕色脂肪组织中的产热和氧化磷酸化过程。

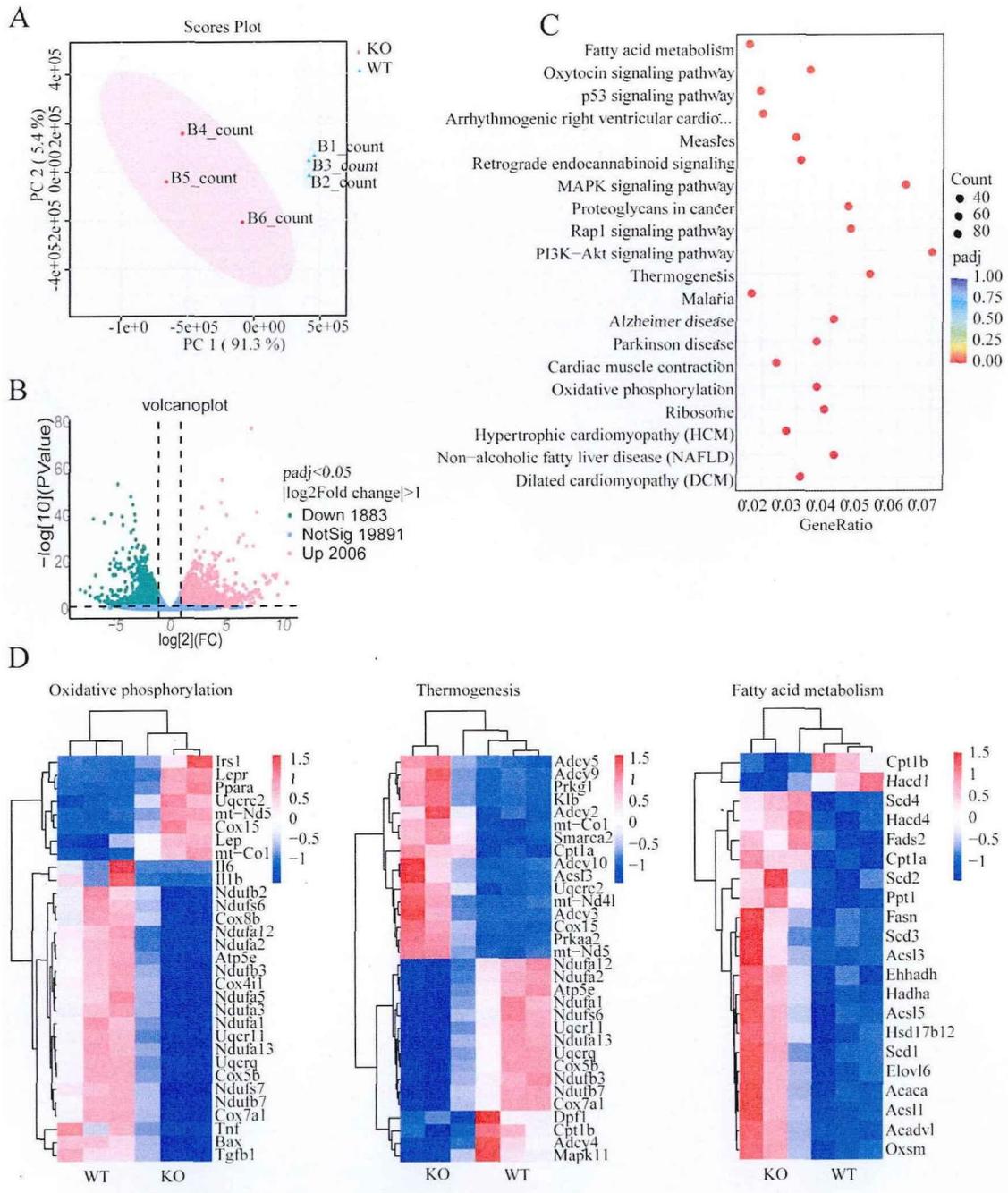


图 3-1 LncRNA11 缺陷小鼠棕色脂肪组织中的差异表达基因和 KEGG 分析结果。(A) 样本数据主成分分析。(B) LncRNA11 缺陷小鼠棕色脂肪组织中上调或下调表达基因的火山图。(C) 差异基因 KEGG 分析富集通路。(D) 氧化磷酸化 (Oxidative phosphorylation) 通路、产热 (Thermogenesis) 通路、脂肪酸代谢 (Fatty acid metabolism) 通路的基因簇热图 (按照基因差异表达倍数排序展示前 30 个基因, 全部差异表达显著基因见附录一、二), 蓝色和红色分别表示下调基因和上调基因。n = 3。野生型小鼠 (WT) vs. LncRNA11 缺陷小鼠 (KO)。

3.2 皮下脂肪组织 RNA 测序分析结果

对 lncRNA11 缺陷小鼠和野生型小鼠的皮下脂肪组织 RNA 进行基因组测序, 对其基因表达谱进行差异分析, 以探索 lncRNA11 影响皮下脂肪组织的关键基因和信号通路。主成分分析表明组内样本重复性好, 组间样本差异性大。火山图显示在野生型小鼠和 lncRNA11 缺陷小鼠的皮下脂肪组织中, 差异表达倍数 > 2 倍的基因有 1767 个, 其中有 826 个基因上调, 941 个基因下调。对差异表达显著基因进行 KEGG 分析, 发现 lncRNA11 缺陷显著影响磷脂酰肌醇-3'激酶/蛋白激酶 B(PI3K-Akt) 通路相关基因, 该通路被报道通过促进葡萄糖利用、蛋白质合成和脂肪生成调节脂肪组织的代谢。此外, ATP 结合盒式蛋白转运体 (ABC transporters) 通路和转化生长因子- β (TGF- β) 通路相关基因也被上调。对差异表达显著基因进行 GO 分析, 发现与 mRNA 加工相关的过程通路基因均被下调, 相关通路如图 3.2。

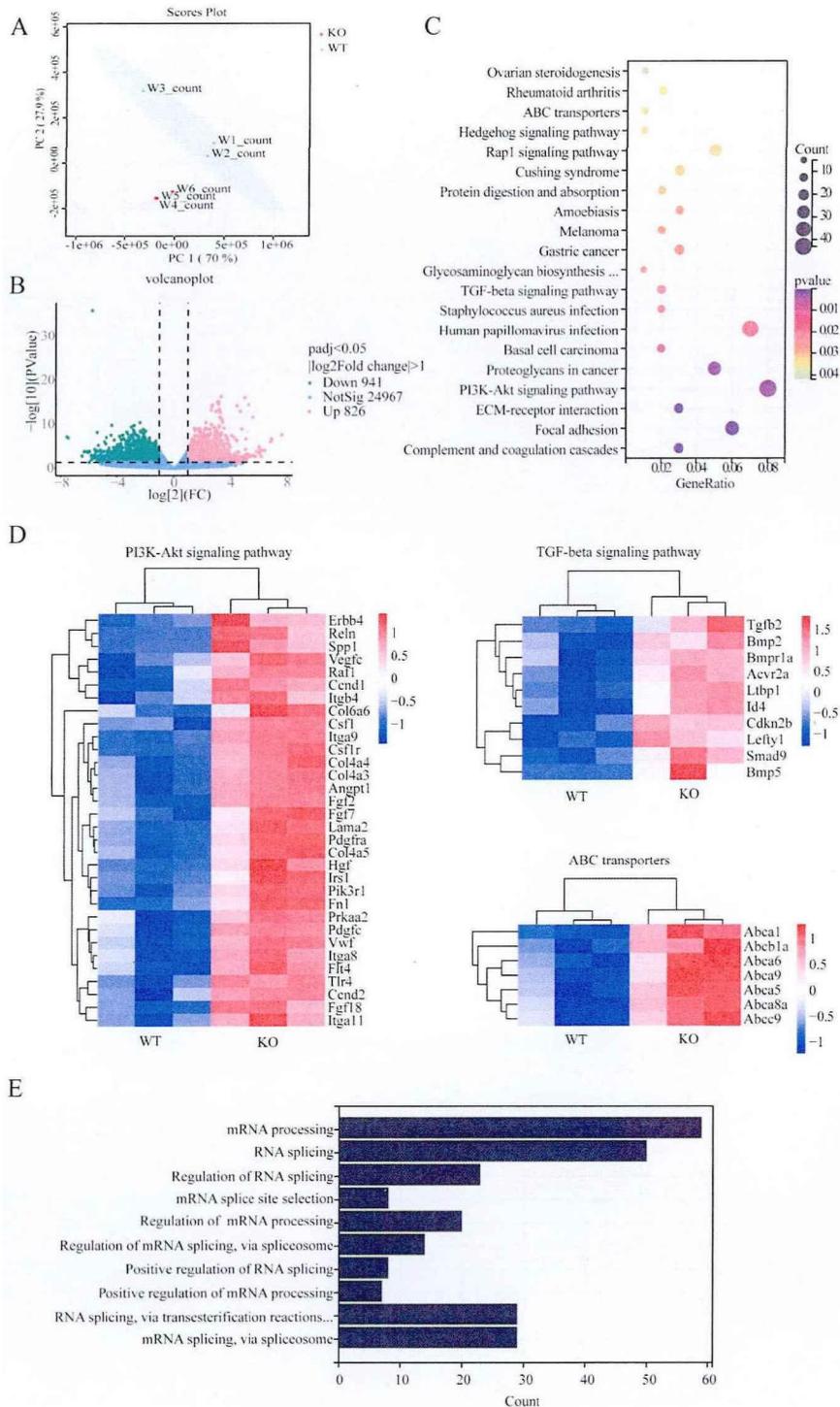


图 3-2 LncRNA11 缺陷小鼠皮下脂肪组织中的差异表达基因和 KEGG 分析、GO 分析结果。(A) 样本数据主成分分析。(B) LncRNA11 缺陷小鼠皮下脂肪组织中上调或下调表达基因的火山图。(C) 差异基因 KEGG 分析富集通路。(D) 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K-Akt) 通路、转化生长因子- β (TGF- β) 通路、ABC 转运体 (ABC transporters) 通路基因簇热图, 蓝色和红色分别表示下调基因和上调基因。(E) GO 分析显示 LncRNA11 缺陷小鼠皮下脂肪组织中的显著下调通路。n = 3。野生型小鼠 (WT) vs. LncRNA11 缺陷小鼠 (KO)。

第二节 RNA 免疫沉淀方法发现 lncRNA11 的相互作用蛋白 hnRNPA1

上一节研究发现 lncRNA11 缺陷主要下调了小鼠棕色脂肪组织中的线粒体氧化磷酸化和产热信号通路，激活了皮下脂肪组织中的 PI3K-Akt 等代谢通路。本节利用 RNA 免疫沉淀实验结合高分辨质谱技术挖掘 lncRNA11 的靶点蛋白，捕捉到 lncRNA11 的互作蛋白 hnRNPA1，并利用 Western blot 技术检测了 lncRNA11 缺陷小鼠脂肪组织中 hnRNPA1 的表达水平。

1 实验材料

1.1 实验试剂

表 3-1 实验试剂

名称	厂家	货号
DreamTaq DNA polymerase	Thermo Fisher	EP0701
dNTP Mix (10 mM each)	NEB	R0192
MEGAscript™ T7 Transcription	Thermo Fisher	AM1354
RiboLock RNase Inhibitor (40 U/μL)	NEB	EO0381
Biotin-14-CTP	Thermo Fisher	19519016
Dynabeads™ M-280 Streptavidin	Invitrogen	11205D
亲水性链霉素亲和磁珠	NEB	#S1421S 2-3um
内切酶 NotI	NEB	#R0189V
T7 RNA Polymerase	Roche	10881775001
biotin RNA labeling mix	Roche	11685597910
pGEM®-T Vector Systems	Promega	A3600
T7 High Efficiency Transcription Kit	TransGen Biotech	JT101-01
2×TransStart FastPfu Fly PCR	TransGen Biotech	AS231-01
Pfu DNA Polymerase	Promega	M7741
Easypure Quick Gel Extraction Kit	TransGen Biotech	EG101-02
Easypure RNA Purification Kit	TransGen Biotech	ER701-01
抗 hnRNPA1 抗体	Abcam	Ab5832
抗 GAPDH 抗体	Abcam	Ab9485

1.2 实验仪器

表 3-2 实验仪器设备

名称	厂家	型号
新康血液混匀器	江苏新康	XK-03

2 实验方法

2.1 制备 lncRNA11 RNA 探针

2.1.1 PCR 扩增目的片段

设计扩增 *GM44386* 基因的引物，含 T7 promoter 序列，同时构建含目的基因 *GM44386* 的载体质粒，以该质粒为模板进行扩增，扩增反应体系如下表：

表 3-3 *GM44386* 基因扩增体系

Promonent	Volume
dNTP mixture	1 μ L
10 \times Buffer	5 μ L
F	1 μ L
R	1 μ L
Template	0.5 μ g
DNA polymerase	1.25 μ L
Final volume	50 μ L

PCR 仪反应条件设置如下表：

表 3-4 *GM44386* 基因扩增反应条件

Program	Step	Cycle
Stage 1	94 $^{\circ}$ C for 2 min	1
Stage 2	94 $^{\circ}$ C 15 s	35
	55 $^{\circ}$ C 30 s	
	68 $^{\circ}$ C 1 min	
Stage 3	72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min	1

扩增结束后，按照第二章实验方法 2.2，进行凝胶电泳检测扩增情况，电泳结束后，把凝胶放于紫外分析仪中检测，条带大小符合且无杂带，表明载体连接成功，进行切胶回收。

2.12 切胶纯化、回收

按照胶回收试剂盒说明书，切取凝胶中的目的基因片段，放入 1.5 mL 去酶离心管中称重，加入 3 倍体积 GSB 溶液，55 °C 水浴融胶，室温晾干，吸附柱中静置吸附，离心，漂洗液洗脱，离心 2 次，彻底去除残留的漂洗液，去离子水洗脱，收集洗脱出的 DNA 溶液，利用 NanoDrop 2000 检测其浓度和纯度。

2.13 线性化载体的制备

利用限制性内切酶 NotI 对质粒进行酶切，反应体系如下表：

表 3-5 质粒酶切反应体系

Promonent	Volume
10×buffer	5 μL
质粒	2 μg
NotI	1 μL
dd H ₂ O	补足 50 μL

反应体系 37 °C 水浴 2-3 h，琼脂糖核酸电泳检测酶切效果，切胶，利用胶回收试剂盒回收线性化 DNA 片段，在 NanoDrop 下检测其浓度和纯度。

2.14 体外转录 lncRNA11 探针

取去酶离心管，加入转录体系如下：

表 3-6 DNA 转录反应体系

Promonent	Volume
10×Transcription buffer	2 μL
线性化 DNA 片段	1 μg
Biotin RNA labeling mix	1 μL
T7 RNA Polymerase	1 μL
dd H ₂ O	补足 20 μL

37 °C 孵育 2 h 后取出，加入 DNA 裂解酶，37 °C 孵育 15 min，除去 DNA，加入 Rnase-free 水，利用 RNA 纯化试剂盒按照说明书提取纯化 RNA，NanoDrop 检测其浓度和纯度。利用琼脂糖凝胶电泳检测到条带大小符合要求，放入 -20 °C 冰箱保存待用。

2.2 链霉素亲和磁珠与生物素标记的 RNA 结合

取出提前标记的 1.5 mL EP 管，吸取重悬后的磁珠悬液，加入 500 μL wash buffer 轻轻吹洗，低速离心，去除上清液，重复清洗 3 次，继续加入 wash buffer 重悬磁珠后，加入生物素标记的 lncRNA11 探针，4 °C 低速旋转 6-8 h，使其充分结合。

2.3 磁珠复合物与蛋白结合

剪取小鼠棕色脂肪组织，生理盐水漂洗 3 次后，加入现配的组织裂解液，在冰上剪碎研磨（4 °C 暂存）。取新的 1.5 mL EP 管加入 10 μ L 组织裂解液作为 NG 组，-20 °C 保存。吸取 100 μ L 组织裂解液加入磁珠-RNA 混合物中，加入 5 μ L RNase 抑制剂，4 °C 旋转过夜。第二天将孵育的磁珠-RNA-蛋白混合物低速离心，使用 Wash Buffer 冲洗 6 次，每次 500 μ L，低速离心，吸除上清液后，加入 40 μ L Wash Buffer 和 10 μ L 5 \times SDS 上样缓冲液，NG 组同此步骤，100 °C 变性 5 min，作为 SDS-PAGE 凝胶电泳的样品。

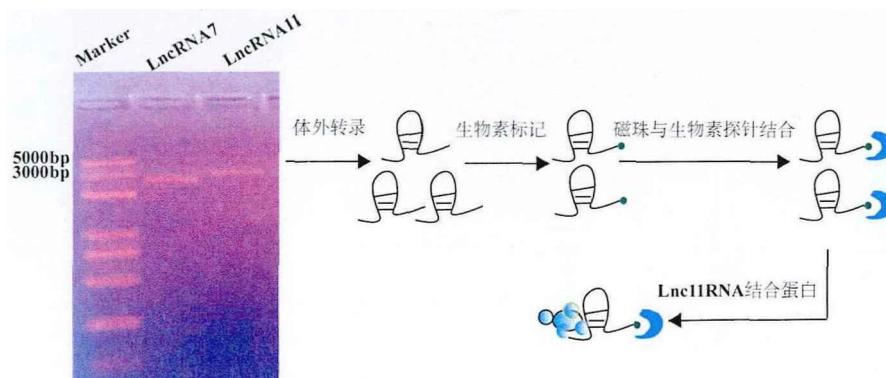


图 3-3 RNA 免疫沉淀实验过程图解

2.4 SDS-PAGE 凝胶电泳

将实验样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，实验步骤同第二章实验内容 2.11 部分。

2.5 考马斯亮蓝染色

将电泳结束后的凝胶放入 20 mL 0.25% 考马斯亮蓝溶液，室温摇晃染色半小时，回收染色液，加沸水，放入纸巾，在摇床上室温摇动过夜脱色，第二天进行观察并拍照记录。

2.6 高分辨质谱鉴定差异蛋白

根据考马斯亮蓝染色的指示，切取差异蛋白条带所在凝胶，装入 1.5 mL EP 管中，送样，委托公司进行高分辨质谱检测。

2.7 Western blot 技术检测 lncRNA11 缺陷小鼠脂肪组织中目标蛋白的表达水平。

按照第二章第二节实验方法 2.10 步骤操作。

2.8 统计学分析

利用 Graphpad Prism 6.0 对实验数据进行统计学分析，结果表示为 Mean \pm

SEM。数据采用单因素方差分析，组间 *T* 检验。 $P < 0.05$ 认为具有统计学差异。

3 实验结果

3.1 RNA 免疫沉淀实验结果

本节研究通过在体外合成生物素标记 lncRNA11，与总蛋白提取液进行孵育，利用 RNA 与蛋白特异性结合，将目的条带所在的胶切下进行 LC-MS/MS 质谱检测，结合参考文献，确定 hnRNPA1 蛋白为 lncRNA11 的相互作用蛋白。

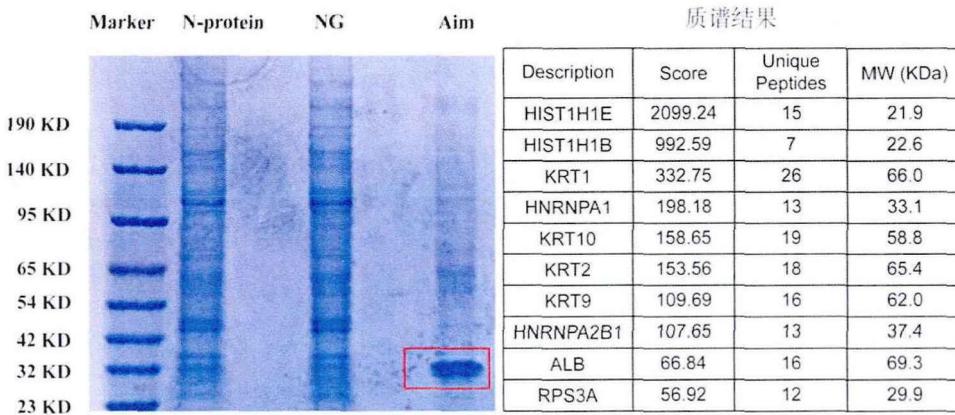


图 3-4 RNA 免疫沉淀实验结合质谱技术鉴定 lncRNA11 的相互作用蛋白 hnRNPA1。

3.2 LncRNA11 缺陷对小鼠脂肪中 hnRNPA1 蛋白表达的影响

研究利用 RNA 免疫沉淀实验结合高分辨质谱捕捉到 lncRNA11 的结合蛋白为 hnRNPA1，为了探究 lncRNA11 是否影响脂肪组织中 hnRNPA1 蛋白表达，继续利用 Western blot 技术检测了基因敲除小鼠脂肪中 hnRNPA1 蛋白的表达水平，结果显示，lncRNA11 缺陷显著降低了 iWAT 中 hnRNPA1 蛋白的表达水平，而 eWAT 和 BAT 中 hnRNPA1 蛋白的表达水平未受到 lncRNA11 缺陷的显著影响。

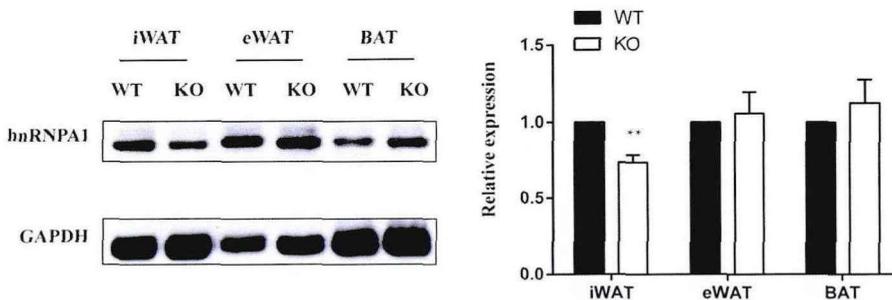


图 3-5 LncRNA11 缺陷对小鼠脂肪组织中 hnRNPA1 蛋白表达水平的影响。 $n = 3$ 。 ** $P < 0.01$ ，野生型小鼠 (WT) vs. LncRNA11 缺陷小鼠 (KO)。

第三节 hnRNPA1 蛋白过表达对脂肪细胞分化和代谢的影响

第二节研究通过 RNA 免疫沉淀实验发现了 lncRNA11 的互作蛋白异质核糖核蛋白 A1 (hnRNPA1), hnRNPA1 是一种高度丰富的 RNA 结合蛋白, 研究表明, 其参与到多种 RNA 加工方式相关的细胞过程中, 包括 RNA 可变剪接调节、核糖体进入位点介导翻译、通过结合新生前 mRNA 调节 mRNA 基因表达、促进成熟 RNA 的核输出和翻译过程^[59-62]。据报道, LncSHGL 能够招募 hnRNPA1, 在翻译水平提高钙调素 (CALM) mRNA 的表达效率, 从而调控肝脏的糖脂代谢^[63]。为了进一步探究 lncRNA11-hnRNPA1 对脂肪分化及产热功能的调控作用机制, 本节在 3T3-L1 前脂肪细胞中转染真核质粒过表达 hnRNPA1 蛋白, 对该靶点进行确证。

1 实验材料

1.1 细胞株

3T3-L1 前脂肪细胞购买于北京协和医学院细胞资源中心。

1.2 实验试剂

表 3-7 实验试剂

名称	厂家	货号
质粒提取试剂盒	全式金	EM121
氨苄青霉素钠	SIGMA	A9518
胰蛋白酶	OXOID	LP0042
酵母提取物	OXOID	LP0021
NaCl	北京试剂	20180416
Lipofectamine™ 3000	Invitrogen	L3000015
BODIPY 染色试剂	Invitrogen	D3922
油红 O 试剂	索莱宝	G1263
TG 检测试剂盒	南京建成生物	A110-1-1
UCPI 抗体	Abcam	Ab10983
荧光封片剂 (含 DAPI)	中杉金桥	ZLI-9557
BCA 试剂盒	康为世纪	CW0014S

氨苄青霉素钠溶液: 称取 0.039 g 氨苄青霉素钠粉末, 溶于无菌 dd H₂O, 定容, 配制终浓度为 100 mg/mL。

细胞培养基: DMEM 高糖培养基+10% CCF+5% P/S。

冻存液: 基础培养基+30% FBS+10% DMSO (细胞培养级)。

hnRNPA1 真核表达质粒图谱见附录三。

1.3 实验仪器

表 3-8 实验仪器设备

仪器	厂家	型号
梯度降温冻存盒	NALGENE	5100-0001
台式多用途高速冷冻离心机	广州吉迪	JIDI-20R
振荡培养箱	金坛市科析仪器	HZQ 系列
电热恒温培养箱	上海一恒科技有限公司	DHP-9082

2 实验方法

2.1 hnRNPA1 表达质粒的提取

配制 LB 培养基，配方如下表：

表 3-9 LB 培养基配方

试剂	质量
胰蛋白胨	5 g
酵母提取物	2.5 g
NaCl	5 g
水	500 mL

搅拌溶液至澄清透明状，分装于三角培养瓶中，盖上透气盖，放于高压灭菌锅中高压灭菌 25 min，结束后取出，晾至 37 °C 左右，加入氨苄青霉素溶液 (1: 1000)，晃匀，加入含 hnRNPA1 表达质粒的甘油菌，将三角培养瓶放在振荡培养箱中，37 °C，130 rpm，摇晃过夜 (14-16 h)，第二天取出培养瓶，观察到瓶内培养基呈浑浊状态，分光光度计测量到 OD 值为 2.5。利用质粒提取试剂盒按照说明书步骤进行质粒提取，得到转细胞级超纯质粒，Nanodrop 2000 中检测质粒浓度和纯度合格，分装到冻存管中，-20 °C 冰箱保存待用。

2.2 3T3-L1 前脂肪细胞的培养和冻存

3T3-L1 前脂肪细胞的传代：收到细胞后，酒精擦拭瓶口消毒，显微镜下观察细胞达到 70%-80% 汇合度时，消化，传代，分瓶，每 T25 瓶补加培养基至 5 mL，每 T75 瓶补加至 20 mL。“十”字晃匀后放入培养箱中培养。

细胞点板：将待点板的细胞消化离心（同前述步骤），弃去上清液，加入培养基，轻轻吹散，上下颠倒混匀，六孔板中每孔先加入 1 mL 培养基进行铺垫，每孔

再加入 1 mL 细胞悬液，十二孔板每孔加入 500 μ L 细胞培养基进行铺垫，每孔再加入 500 μ L 细胞悬液，“十”字晃匀后放入培养箱中培养。

细胞冻存：将待冻存的细胞消化离心，加入现配制的冻存液，吹散细胞，颠倒晃匀，分装至 1.5 mL 冻存管中，利用梯度降温冻存盒冻存，过夜拿出，将细胞冻存至液氮中。

2.3 3T3-L1 前脂肪细胞转染 hnRNPA1 质粒及过表达验证

质粒转染：观察六孔板和十二孔板中的细胞生长密度，细胞生长到融合度 70%-80%之间时，开始转染，现配制转染体系：

表 3-10 转染体系 A 液

A 液组分	十二孔板	六孔板
Opti-MEM™ Medium	50 μ L/孔	100 μ L/孔
Lipofectamine™ 3000 Reagent	0.75 μ L/孔	1.5 μ L/孔

混合后室温静置 5min，同时配制转染体系 B 液：

表 3-11 转染体系 B 液

B 液组分	十二孔板	六孔板
Opti-MEM™ Medium	50 μ L/孔	100 μ L/孔
质粒 (200 μ g/ μ l)	4 μ L/孔	8 μ L/孔
P3000™ Reagent	2 μ L/孔	4 μ L/孔

A、B 液混合，室温静置 15 min。细胞更换新鲜培养基，滴加转染体系，“8”字法晃匀，加入细胞培养箱中，孵育 36 h。

RT-qPCR 检测细胞中 hnRNPA1 转录水平：细胞转染质粒 36 h 后，按照第一章实验方法 3.23 收集细胞样品，按照第一章 3.12-3.14 方法提取细胞中总 RNA，检测 3T3-L1 前脂肪细胞中 hnRNPA1 基因的转录水平。基因引物序列为 hnRNPA1-F：5'-GAAACAACCGACGAGAGTCTG-3'；R：5'-TGTGTGGTCTTGCATTCATGG-3'。

2.4 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化

十二孔板或者六孔板转染 hnRNPA1 质粒 36 h，更换新的培养基，接触抑制培养 2 天，更换新鲜配制诱导液，48 h 后继续更换第二次诱导液，诱导 4 天，更换新鲜配制分化液，分化 4 天，显微镜下观察到细胞内部含有大量圆形脂滴，表明细胞分化成熟。

2.5 BODIPY 和油红 O 染色检测 hnRNPA1 过表达对脂肪细胞脂质蓄积的影响

配制 BODIPY 工作液（BODIPY 染液：PBS = 1：5000）和油红 O 工作液（油

红 O 染液：双蒸水 = 3: 2），后者需过滤至澄清透明，从培养箱中取出诱导分化的十二孔板，吸除培养基，PBS 洗 3 遍，多聚甲醛固定 30 min，PBS 洗 3 遍。

BODIPY 染色：每孔加入 750 μL BODIPY 工作液，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min，去废液，置于平板振荡器上 PBS 洗 3 遍，DAPI 封片，荧光显微镜下观察，采集图像分析。

油红 O 染色：每孔加入 750 μL 油红 O 工作液，避光室温染色 30 min，去废液，置于平板振荡器上 PBS 洗 3 遍，5 min/遍，即可放在荧光显微镜下观察，采集图像分析。油红 O 定量：十二孔板弃去 PBS，每孔加入 500 μL DMSO，锡箔纸避光，放在平板摇床上摇晃 10 min，充分溶解孔中的油红 O 染料。按组吸取 150 μL 染料提取液加入透明 96 孔平底板，设置 358 nm，测定吸光度。

2.6 ELISA 检测 hnRNPA1 过表达对脂肪细胞中 TG 合成的影响

新鲜配制蛋白裂解液（RIPA：蛋白磷酸酶抑制剂 = 100: 1），取细胞诱导分化成熟的六孔板，弃去培养基，PBS 洗 2 遍，加入蛋白裂解液，冰上裂解 30 min，细胞刮刀刮取细胞，收集到 1.5 mL EP 管中，冰水浴超声 45 min，4 $^{\circ}\text{C}$ ，12000 g，离心 10 min。将上清液转移至新的离心管，按照试剂盒说明书进行 BCA 定量，绘制标准曲线并计算蛋白样品浓度。接着，按照 TG 试剂盒说明书测定样品中 TG 含量。

2.7 RT-qPCR 检测 hnRNPA1 过表达对脂肪细胞分化相关基因的影响

取细胞诱导分化成熟的十二孔板，弃去培养基，PBS 洗 3 遍，收集细胞，按照第一章 3.12-3.14 方法提取细胞中总 RNA，检测 hnRNPA1 过表达对脂肪细胞分化相关基因的影响。引物序列如下：

表 3-12 基因引物序列

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
<i>Pparg</i>	TCGCTGATGCACTGCCTATG	GAGAGGTCCACAGAGCTGATT
<i>Acox</i>	TAACTTCCTCACTCGAAGCCA	AGTTCATGACCCATCTCTGTC
<i>Lpl</i>	GGGAGTTTGGCTCCAGAGTTT	TGTGTCTTCAGGGGTCCTTAG
<i>Cpt1a</i>	GACTCCGCTCGCTCATTCC	GACTGTGAACTGGAAGGCCA
<i>Cpt1b</i>	GCACACCAGGCAGTAGCTTT	CAGGAGTTGATTCCAGACAGGTA
<i>Acc</i>	GCTGCTCGGATCACTAGTGAA	TTCTGCTATCAGTCTGTCCAG

2.8 过表达 hnRNPA1 脂肪细胞 RNA-Sequencing 检测

细胞诱导分化成熟的十二孔板，弃去培养基，PBS 洗 3 遍，收集细胞，干冰存放送样，委托北京诺禾致源科技股份有限公司进行转录组测序，检测 RNA 样品合格后构建 cDNA 文库，利用 Q-PCR 方法准确定量文库的有效浓度，库检合格，利

用 Illumina HiSeq 平台高通量测序, 获得实验结果数据并进行分析。利用皮尔逊相关系数的平方 (R^2) 评估样品重复性和相关性, 利用测序序列的 GC 含量、Q20、Q30 评估测序数据质量, 数据质量评估合格后再分析筛选差异表达基因。采用 ClusterProfiler 软件基于超几何分布原理对差异基因集进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

2.9 统计学分析

利用 Graphpad Prism 6.0 对实验数据进行统计学分析, 结果表示为 Mean \pm SEM。数据采用单因素方差分析, 组间 T 检验。 $P < 0.05$ 认为具有统计学差异。

3 实验结果

3.1 hnRNPA1 过表达脂肪细胞的建立和验证

3T3-L1 细胞系具有向脂肪细胞分化的特性, 是研究脂肪代谢的经典细胞模型。通过构建带 Flag 标签的质粒, 转录进 3T3-L1 前脂肪细胞中, 实现在 3T3-L1 细胞中过表达 hnRNPA1 蛋白。RT-qPCR 实验检测过表达 3T3-L1 细胞中 hnRNPA1 基因的转录水平显著升高, 接近对照组转录水平的 100 倍, 实验结果验证了 hnRNPA1 在脂肪细胞中的过表达。

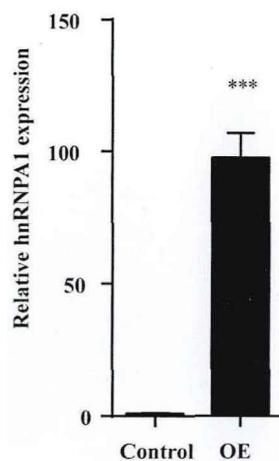


图 3-6 3T3-L1 脂肪细胞中 hnRNPA1 基因的转录水平。n = 6。*** $P < 0.001$, 对照组 (Control) vs. 过表达 hnRNPA1 组 (OE)。

3.2 hnRNPA1 过表达减轻脂肪细胞脂质蓄积

3T3-L1 前脂肪细胞在诱导分化过程中, 细胞内脂质不断蓄积, 脂滴变大聚集为脂滴环, 细胞体积也随之增大。为了观察 hnRNPA1 蛋白过表达对脂肪细胞分化为

成熟脂肪细胞的影响，研究对分化成熟的脂肪细胞进行 BODIPY 染色和油红 O 染色，观察细胞内脂滴形成的情况。结果发现，与对照组相比，过表达 hnRNPA1 的脂肪细胞内仅有少量脂滴产生，且脂滴小，无明显的脂滴环。检测细胞内脂质和甘油三酯的含量水平，数据显示，过表达 hnRNPA1 显著降低了 3T3-L1 成熟脂肪细胞内的脂质和甘油三酯含量。该实验结果反映，在 3T3-L1 前脂肪细胞中过表达 hnRNPA1 蛋白，显著抑制了前脂肪细胞在分化成熟过程中的脂滴形成，减少脂质蓄积。

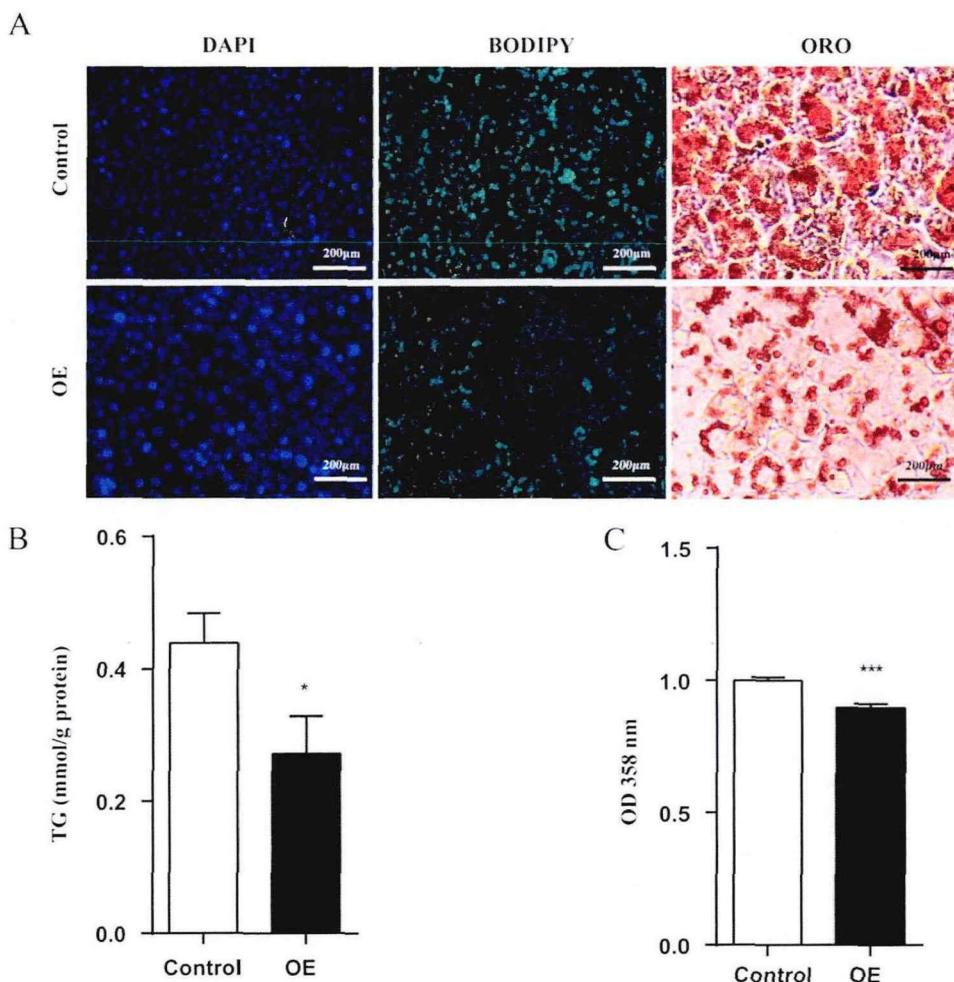


图 3-7 hnRNPA1 过表达改善 3T3-L1 成熟脂肪细胞中的脂质蓄积。(A) BODIPY 和油红 O 染色观察拍照, scale bar: 200 μm。(B) 甘油三酯水平。(C) 油红 O 染料提取液在 OD 值 358 nm 时的吸光度值。n = 6。***P < 0.001, *P < 0.05, 对照组 (Control) vs. 过表达 hnRNPA1 组 (OE)。

3.3 hnRNPA1 过表达促进脂肪细胞分化相关基因表达

3T3-L1 前脂肪细胞是一类同时具有增殖和分化为成熟脂肪细胞能力的前体细胞^[64], 在 IBMX、DEX、Insulin 等生长因子作用下, 细胞改变本身的成纤维状态, 甘油三酯在胞质内聚集, 最终分化为成熟脂肪细胞, 这个过程涉及许多代谢酶基因

和分化相关基因。本节选取一些参与脂质代谢过程、调控脂肪细胞分化的关键基因，利用 RT-qPCR 检测其在成熟脂肪细胞中的表达量情况。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 是调节前脂肪细胞分化过程中脂肪形成相关基因表达从而启动分化过程的主要转录因子^[41]，乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 作为生物素酶，在脂肪酸合成过程中发挥限速作用^[65]。CPT-1 在线粒体外膜中，通过转移长链脂肪酸至线粒体中发挥调节脂肪酸 β 氧化的作用^[66]。ACOX 是脂肪酸 β 氧化的关键酶，通过催化脂肪酸 β -氧化促进能量消耗^[67]。LPL 作为脂质转运、代谢关键酶，负责催化脂蛋白脂解，提供游离脂肪酸 (FFA) 用于脂质储存^[68]。研究表明，这些关键因子和酶共同参与脂质合成和分解的动态过程。

通过检测成熟脂肪细胞中相关基因的表达水平，观察 hnRNPA1 蛋白过表达对脂肪细胞分化的影响。数据分析显示，hnRNPA1 蛋白过表达显著降低了分化基因转录调控因子 PPAR γ 以及脂肪酸合成酶 ACC、转运酶 LPL 在 mRNA 水平的表达，脂肪酸关键代谢酶 CPT-1 的 mRNA 水平表达显著上升。以上结果表明，hnRNPA1 蛋白过表达抑制脂肪细胞分化，促进脂质代谢过程。

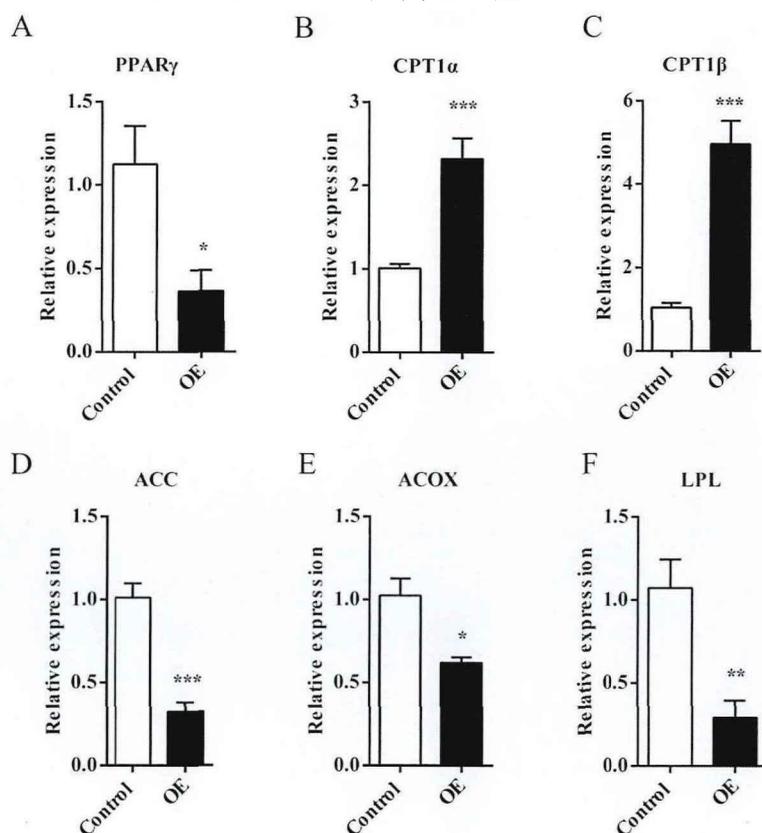


图 3-8 hnRNPA1 过表达调节 3T3-L1 成熟脂肪细胞代谢相关基因的表达。(A) PPAR γ 的 mRNA 表达水平。(B) CPT1 α 的 mRNA 表达水平。(C) CPT1 β 的 mRNA 表达水平。(D) ACC 的 mRNA 表达水平。(E) ACOX 的 mRNA 表达水平。(F) LPL 的 mRNA 表达水平。n=6。*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, 对照组 (Control) vs. 过表达 hnRNPA1 组 (OE)。

3.4 hnRNPA1 过表达激活脂肪细胞氧化磷酸化和产热通路

本实验收集对照组 3T3-L1 前脂肪细胞、分化成熟的脂肪细胞、过表达 hnRNPA1 蛋白的 3T3-L1 前脂肪细胞和过表达 hnRNPA1 蛋白的成熟脂肪细胞进行基因组测序, 对基因表达谱进行差异分析, 在分子水平上探索过表达 hnRNPA1 蛋白对脂肪细胞分化和代谢的影响。通过对 4 组样品的差异表达显著基因进行 KEGG 分析, 发现 hnRNPA1 蛋白过表达显著上调了成熟脂肪细胞中的氧化磷酸化通路 (含 52 个相关基因) 和产热通路 (含 60 个相关基因)。GO 分析显示过表达 hnRNPA1 蛋白的成熟脂肪细胞线粒体中的相关生物过程通路被显著上调, 包括线粒体呼吸链复合体组装、NADH 脱氢酶复合物组装、呼吸电子传递链、核苷三磷酸等生物过程。研究结果提示, 过表达 hnRNPA1 蛋白可能通过促进成熟脂肪细胞中的线粒体过程进而激活细胞中氧化磷酸化和产热代谢过程。

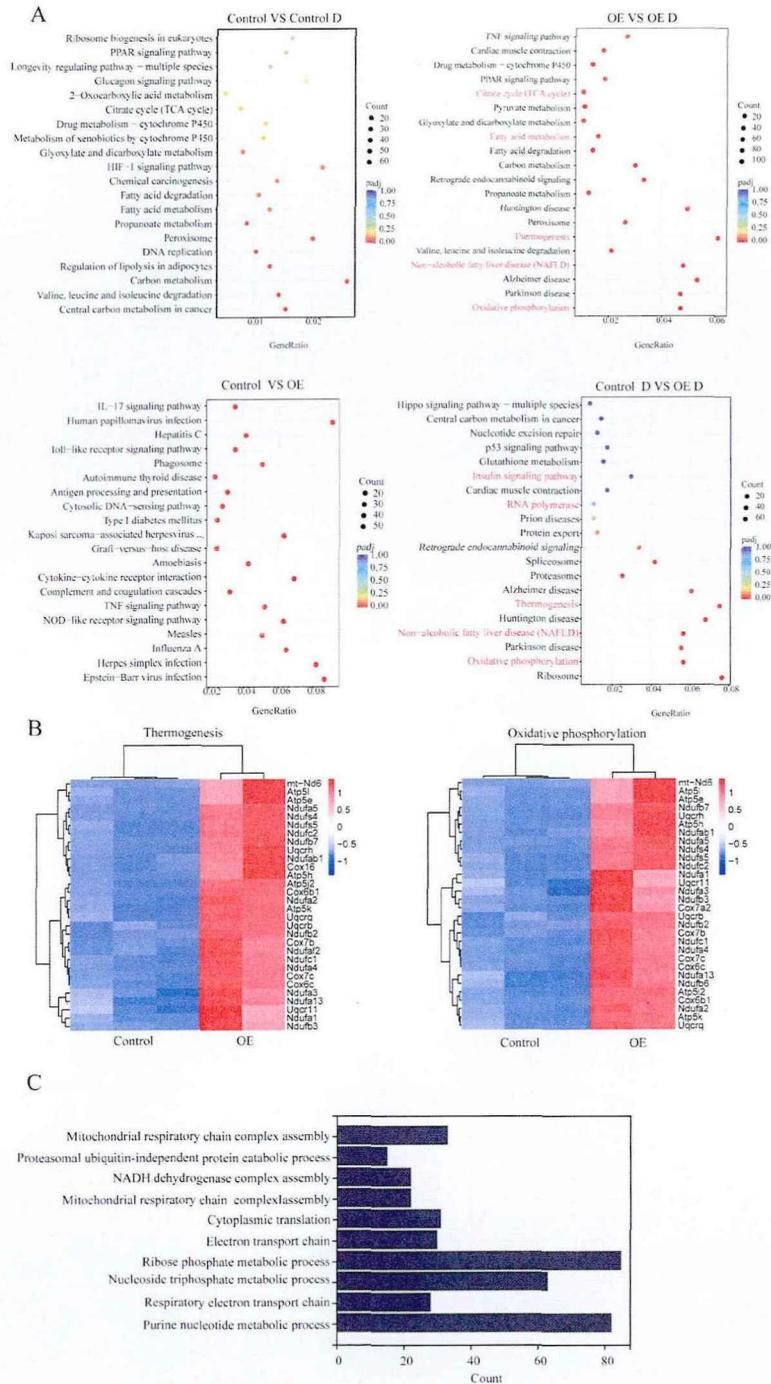


图 3-9 3T3-L1 脂肪细胞分化前后的差异基因分析。(A) 差异基因 KEGG 分析富集通路。(B) 产热 (Thermogenesis) 通路和氧化磷酸化 (Oxidative phosphorylation) 通路的基因簇热图 (按照基因差异表达倍数排序展示前 30 个基因, 全部差异表达显著基因见附录四、五), 蓝色和红色分别表示下调基因和上调基因。(C) GO 分析显示过表达 hnRNPA1 成熟脂肪细胞中的显著上调通路。n = 3。Control: 3T3-L1 前脂肪细胞组; Control D: 已分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞组; OE: 过表达 hnRNPA1 的 3T3-L1 前脂肪细胞组; OE D: 过表达 hnRNPA1 的 3T3-L1 成熟脂肪细胞组。

第四节 蛋白免疫共沉淀方法发现与 lncRNA11-hnRNPA1 复合物相互作用的蛋白质 PKM

本章第二节通过 RNA 免疫共沉淀实验发现 lncRNA11 可招募 hnRNPA1 蛋白，第三节研究利用 3T3-L1 前脂肪细胞探究了 hnRNPA1 在脂肪细胞分化和产热代谢过程中的影响，发现 hnRNPA1 过表达抑制脂肪细胞分化并促进脂肪酸分解，减轻脂肪细胞分化过程中脂质的蓄积。转录组测序结果表明过表达 hnRNPA1 蛋白可能是通过促进成熟脂肪细胞中线粒体内的生物学过程，进而激活脂肪细胞中氧化磷酸化和产热通路。为了进一步探究 lncRNA11-hnRNPA1 相互作用影响脂肪代谢的分子机制，本节研究通过蛋白免疫共沉淀 (Co-IP) 实验，利用抗体抗原特异性结合的原理，检测 hnRNPA1 影响脂肪细胞代谢的靶点蛋白，并进行验证。

1 实验材料

1.1 细胞株

NIH-3T3 细胞株获赠于北京协和医学院药用植物研究所药理毒理中心。

1.2 实验试剂

表 3-13 实验试剂

名称	厂家	货号
BeyoMag™ Anti-flag Magnetic Beads	碧云天	M8823
3X Flag Peptide	碧云天	P9801
RIPA 裂解液	碧云天	P0013B
蛋白酶抑制剂	美伦生物	MB2678
预染彩虹蛋白 marker	美伦生物	MA0342
Protein A/G PLUS-Agarose	Santa Cruz	A0623
抗 hnRNPA1 抗体	Abcam	Ab5832
抗 PKM 抗体	Abcam	Ab137791
抗β-actin 抗体	易科拜德	EXP0041F
HRP 羊抗鼠二抗	柏奥易杰	BE0102
HRP 鼠抗兔二抗	柏奥易杰	BE0101
超敏 ECL 发光液	美伦生物	MA0186-1

1.3 实验仪器

表 3-14 实验仪器设备

名称	厂家	型号
pH 计	上海越平	PHS-3C
DynaMag™-2	Thermo Fisher	12321D
微型离心机	东胜创新	EQ-6K

2 实验方法

2.1 Pull down 实验检测靶蛋白

2.1.1 NIH-3T3 细胞复苏、培养、过表达 hnRNPA1

NIH-3T3 细胞复苏：高糖完全培养基室温平衡，细胞操作台紫外灭菌 30 min，将细胞冻存管从液氮中取出，装入 7 号塑封袋后，立即浸没在 37 °C 水浴中轻轻摇晃至冻存液化开，加入 5 mL 完全培养基，吹散、晃匀，离心，去上清液，加入 1 mL 培养基，吹散细胞，装 T25 瓶，每 T25 瓶补加培养基至 5 mL，“十”字晃匀，放入细胞培养箱（37 °C，5% CO₂）。

每日早上观察 NIH-3T3 细胞生长状态，细胞融合度为 80-90% 时传代，细胞传 1 至 2 代后，换大皿（100 mm）培养，每皿培养基为 10 mL，在皿中过表达 hnRNPA1 36 h，细胞传代与过表达 hnRNPA1 的详细步骤见第三章第三节实验内容 2.2-2.3。

2.1.2 蛋白样品制备

细胞过表达结束后，取出细胞培养皿，吸出培养基，加入 5 mL PBS，轻轻晃洗培养皿，重复清洗 3 遍，每皿加入 500 μL 细胞裂解液（含 1% 蛋白磷酸酶抑制剂），冰上裂解 30 min 后，收集细胞，转移到 1.5 mL EP 管中，冰水浴超声 30 min，离心 15 min（12000 rpm，4 °C），转移上清液至新的 1.5 mL EP 管中，待用。

2.1.3 磁珠准备

洗涤 Anti-Flag 磁珠：用移液枪轻轻吹打重悬 Anti-Flag 磁珠溶液，吸取适量 Anti-Flag 磁珠至 1.5 mL EP 管中（每 500 μL 蛋白样品需 20 μL 磁珠混悬液），补加 TBS 溶液至终体积为 0.5 mL，用移液枪轻轻吹打后，置于磁力架上分离 10 s，去上清，重复洗涤 2 次，继续补加 TBS 溶液至初始体积，重悬 Anti-Flag 磁珠溶液。

2.1.4 免疫沉淀

磁珠孵育：吸取重悬后的磁珠悬浮液加入蛋白样品中（每 500 μL 蛋白样品需 20 μL 磁珠混悬液），4 °C 低速旋转孵育过夜。

磁分离：第二天取下 EP 管，置于磁力架上分离 10 s，吸除上清液，加入 TBS

溶液至终体积为 0.5 mL，移液枪轻轻吹洗后，置于磁力架上分离 10 s，吸除上清液，重复洗涤 3 次，补加 TBS 溶液至磁珠悬浮液初始体积。

2.15 蛋白洗脱

配制洗脱液：吸取适量 3×flag 多肽（5 mg/mL），加入 1×TBS 溶液稀释，至浓度为 150 μg/mL。

洗脱：利用 3×flag 多肽可竞争性结合 Anti-Flag 抗体，从而洗脱出与 Anti-Flag 抗体结合带 flag 标签的融合表达蛋白。在磁珠悬浮液中加入 3×flag 多肽洗脱液（1:5），用移液枪轻轻吹匀，固定于旋转仪上，室温低速旋转孵育 60 min 后，置于磁力架上分离 10 s，转移上清至新的 EP 管中，即为洗脱出来的蛋白样品。

2.16 SDS-PAGE 凝胶电泳

在蛋白样品中加入 5×loading Buffer，100 °C 金属浴加热 5 min，晾至室温。按照第二章实验内容 2.11 方法进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，按照 marker（3 μL）、input 组（10 μL）、igG 组（10 μL）、IP 组（10 μL）依次上样。

2.17 考马斯亮蓝染色及高分辨质谱检测差异蛋白

将电泳结束后的凝胶放入 20 mL 0.25% 考马斯亮蓝溶液，室温摇晃染色半小时，回收染色液，加沸水，放入纸巾，在摇床上室温摇动过夜脱色，第二天进行观察并拍照记录。根据考马斯亮蓝染色的指示，切取差异蛋白条带所在凝胶，装入 1.5 mL EP 管中，送样，进行高分辨质谱检测。

2.2 Co-IP 实验验证 hnRNPA1 与 PKM 相互作用

细胞过表达 hnRNPA1 蛋白和样品制备：按照本节实验方法 2.11 步骤操作，在 NIH-3T3 细胞中过表达 hnRNPA1 蛋白 48 h。按照本节实验方法 2.12 操作获得蛋白上清液，吸出 200 μL 作为全细胞裂解液（input），加入 75 μL 5×loading buffer 混匀，100 °C 金属浴煮沸 5 min，晾至室温，储存于 -20 °C 冰箱待用。剩余蛋白上清液储存于 4 °C 冰箱待用。

配制 IP buffer：按照如下配方，pH 调为 8.0，即可使用。

表 3-15 IP buffer 配方

试剂	用量
NaCl	4.4 g
NP-40	5 mL
0.5 M Tris-HCl (pH = 7.4)	50 mL
0.5 M EDTA	50 mL

蒸馏水

定容至 500 mL

清洗 Protein A/G beads: 取离心管标记 IP、Ab、NE 组, 每管加入 150 μ L protein A/G Beads, 再加入 500 μ L IP buffer, 晃匀, 离心 30 s, 静置 10 s, 吸除上清液, 重复清洗 8 次。

Protein A/G beads 与抗体结合: IP 和 Ab 组离心管中各加入 10 μ L 抗体(1 μ g/ μ L), 继续每管加入 1 mL IP buffer, 4 $^{\circ}$ C 旋转 2 h, 保证 beads 与抗体充分结合。

免疫沉淀: 首先清洗 Protein A/G beads-抗体混合物, 每管加入 1 mL IP buffer, 晃匀, 离心 30 s, 静置 10 s, 吸除上清液, 重复 3 次。IP 组加入 500 μ L 蛋白样品, NE 组加入 200 μ L 蛋白样品, Ab 组加入 300 μ L IP buffer, 4 $^{\circ}$ C 旋转过夜。第二天取出, 3000 g, 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 将上清液 (output) 转移至新的离心管中, 4 $^{\circ}$ C 保存。沉淀物用 IP buffer 清洗, 每管加入 1 mL IP buffer, 4 $^{\circ}$ C 旋转 10 min, 再离心 30 s, 静置 10 s, 吸除上清液, 重复 8 次, 管中剩余 100 μ L Beads-抗原-抗体混合物, 每管加入 25 μ L 5 \times loading buffer 混匀, 100 $^{\circ}$ C 金属浴煮沸 5 min, 晾至室温。

Western blot: 准备 IP、Input、NE 组样品, 12000 rpm 离心 1 min, 按照第二章实验内容 2.11 方法进行 Western blot 实验, 上样顺序: Marker 4 μ L、Input 组 4 μ L、NE 组 4 μ L、IP 组 12 μ L。

3 实验结果

3.1 Pull down 实验结合高分辨质谱检测到 lncRNA11-hnRNPA1 靶蛋白 PKM

本节研究在 NIH-3T3 细胞中过表达带 Flag 标签的 hnRNPA1 蛋白, 并通过带有 anti-Flag 亲和蛋白的磁珠对抗原抗体复合物进行亲和吸附, 形成三联体, 经洗涤去除未结合的蛋白, 利用 3 \times flag 多肽竞争性洗脱抗原抗体复合物, 对目标蛋白条带进行 LC-MS/MS 检测, 通过蛋白得分结合文献检索, 确定 lncRNA11-hnRNPA1 相互作用蛋白为 PKM。

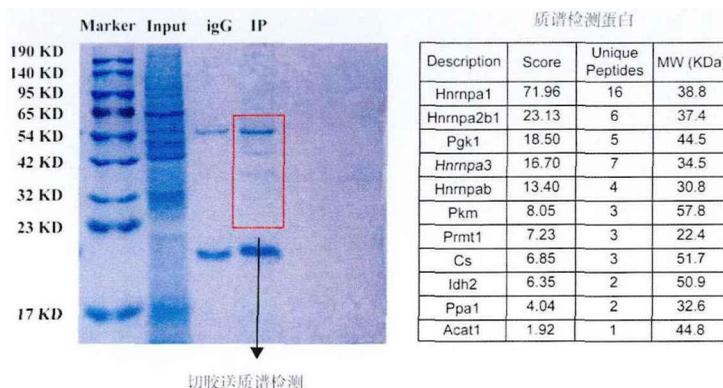


图 3-10 Pull down 实验胶图及质谱检测蛋白结果。

3.2 免疫印迹法验证 hnRNPA1 与 PKM 相互作用

为了证实 hnRNPA1 和 PKM 之间的相互作用，研究利用过表达 hnRNPA1 蛋白的 NIH-3T3 细胞裂解液进行免疫共沉淀实验。免疫印迹法结果显示，抗 hnRNPA1 抗体能够免疫沉淀细胞裂解液中的 PKM 蛋白，抗 PKM 抗体能够免疫沉淀细胞裂解液中的 hnRNPA1 蛋白，证明 hnRNPA1 和 PKM 之间存在相互作用。

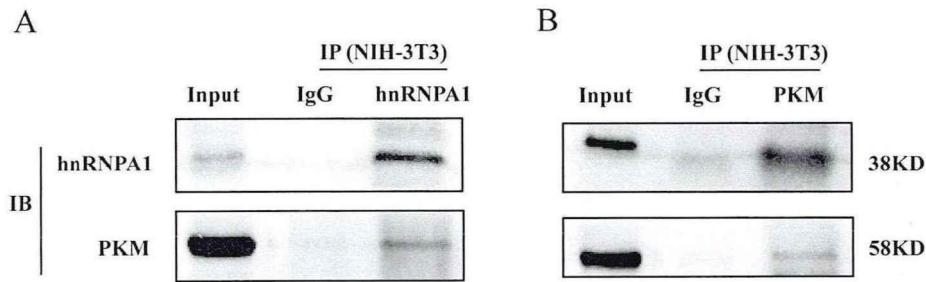


图 3-11 免疫印迹实验验证细胞内源性 hnRNPA1 和 PKM 的相互作用。(A) 细胞裂解液与抗 hnRNPA1 抗体孵育，用抗 hnRNPA1 抗体和抗 PKM 抗体对共免疫沉淀进行免疫印迹分析。(B) 细胞裂解液与抗 PKM 抗体孵育，用抗 hnRNPA1 抗体和抗 PKM 抗体对共免疫沉淀进行免疫印迹分析。

讨论

在本章中通过对小鼠的脂肪组织进行转录组测序分析，发现 *lncRNA11* 缺陷小鼠棕色脂肪组织中产热和氧化磷酸化通路均被下调，解释了第二章中 *lncRNA11* 缺陷小鼠出现的表型，棕色脂肪组织产热和代谢功能下降，脂肪细胞内的线粒体质量与氧化磷酸化功能受损。与 WAT 相比，BAT 中的脂质主要用作氧化磷酸化和产热的燃料，脂肪酸是产热的主要底物，通过脂肪滴的脂解释放到细胞质中的游离脂肪酸通过肉碱棕榈酰转移酶 1 β (CPT1 β) 介导的肉碱穿梭系统被引导到线粒体，继而被 β -氧化生成 ATP，而 UCP1 位于棕色脂肪细胞的线粒体内膜中，作为跨膜蛋白，允许质子重新进入线粒体基质，从而消除驱动 ATP 合成的电学梯度，该过程导致大量化学能以热的形式释放^[69]。线粒体在棕色脂肪产热提供能量的过程中起着核心作用^[70]。研究表明线粒体呼吸能力受损同时也伴随着棕色脂肪组织中经典产热基因 UCP1 和其它产热基因程序表达的减弱^[71]，这与本研究结果一致。

皮下脂肪组织是一种能量储存器官，在能量耗散中起着稳态作用。研究通过转录组测序和生物信息学分析发现 *lncRNA11* 缺陷显著影响了小鼠皮下脂肪组织中的 PI3K-Akt 通路，另外 ABC 转运体通路和 TGF- β 通路相关基因也被上调。PI3K-Akt 通路是一个重要的代谢通路，其可以促进脂质生物合成并抑制脂解，调节脂肪组织代谢。研究报道脂肪肥大增加组织免疫细胞浸润、纤维化和脂解，并减少胰岛素受体底物 1 (IRS-1) 活化和蛋白激酶 B (AKT) 诱导的葡萄糖摄取，加剧胰岛素抵抗和二型糖尿病的发展^[72]。PI3K-Akt 通路受损诱发胰岛素抵抗导致肥胖和 2 型糖尿病，而胰岛素抵抗又加剧 PI3K-Akt 通路紊乱，形成恶性循环^[73]。转化生长因子 (TGF- β) 及其相关因子传导的信号通路也是一条重要的代谢通路，控制着不同类型细胞的发育、生长和功能^[74]。Hariom Yadav 等人研究发现 TGF- β 水平与肥胖呈正相关，外源性抑制 TGF- β 信号通路上调了皮下脂肪组织中线粒体生物发生并且改善线粒体功能，而 TGF- β 水平升高可能促进葡萄糖耐受不良和肥胖^[75]，TGF- β 通路和 PI3K-Akt 通路的激活解释了在基因敲除小鼠身上观察到的胰岛素抵抗现象。

另外，ATP 结合盒转运蛋白 A1 (ABCA1) 是调节脂肪发育和脂质生成的关键因子。ABCA1 在脂肪组织中高度表达，作为膜蛋白，其将细胞内胆固醇和磷脂输出到载脂蛋白，即高密度脂蛋白 (HDL)，是脂肪细胞胆固醇外排的主要机制，在动员脂肪组织胆固醇运输到肝脏中代谢过程中起关键作用^[76]。Helen Cuffe 等人发现脂肪细胞中 ABCA1 的缺失可以提高脂肪组织膜胆固醇，增加能量消耗，防止高脂饮食喂养的小鼠发生脂肪细胞肥大^[77]。研究结果发现 *lncRNA11* 缺陷同时激活了 ABC 转运体信号通路，提高了 ABCA1 等基因的表达，这可能是加剧基因敲除小鼠中皮下脂肪细胞病理性肥大的原因之一。

利用 RNA pull down 实验在体外探究 *lncRNA11* 的相互作用蛋白，结果发现

hnRNPA1 这一 RNA 结合蛋白。hnRNPA1 是 HNRNP 家族的重要成员，主要位于细胞核，但其可在细胞核和细胞质之间穿梭，具有多种功能，包括转录控制、选择性剪接、核质转运等，研究者还发现其影响异染色质形成和非编码 RNA (lncRNA、miRNA 和 circRNA) 与蛋白质的相互作用^[78]。检测 lncRNA11 缺陷小鼠脂肪组织中的 hnRNPA1 蛋白表达量，研究结果显示 lncRNA11 缺陷小鼠皮下脂肪组织中的蛋白表达量相比野生型显著降低，同时转录组测序结果显示皮下脂肪组织中与 RNA 加工相关的过程通路基因均被下调，提示 lncRNA11 缺陷可能通过影响皮下脂肪组织中 hnRNPA1 蛋白的表达影响 RNA 加工过程的效率。

RNA 加工是一个复杂的功能级联，其中包括成熟 RNA 的选择性剪接、多聚腺苷酸化和核输出^[79]。文献表明大约 95-100% 的人类多外显子基因具有选择性剪接现象，这增加了功能不同的蛋白质异构体的数量，而异质核核糖核蛋白 (HNRNPs) 是剪接体形成的关键蛋白，这些剪接体控制着一些与肥胖和胰岛素抵抗相关的基因，与脂肪酸和葡萄糖代谢密切相关^[80]。如 hnRNPA1 与体重减轻的人脂肪组织中胰岛素受体基因的剪接有关^[81]。据报道，肝脏和骨骼肌中 RNA 加工基因如异质核核糖核蛋白 (HNRNPs) (编码 RNA 结合蛋白) 的表达降低导致了与肥胖相关的代谢表型^[82]，这与前期的研究结果相符，lncRNA11 缺陷小鼠脂肪组织中的 hnRNPA1 表达下降，导致 RNA 加工过程相关基因下调，PI3K-Akt、TGF- β 等代谢关键通路激活，最终小鼠表现出胰岛素抵抗，脂肪脂质蓄积等代谢紊乱现象。

最近的证据表明 hnRNPA1 在调节糖脂代谢中发挥重要作用，如 hnRNPA1 可以剪接糖酵解酶丙酮酸激酶 (PK) 前体 mRNA，形成成熟的丙酮酸激酶亚型 M2 (PKM2) mRNA 促进糖代谢^[83]；脂肪酸刺激 hnRNPA1 的表达，而 hnRNPA1 可与 SREBP-1a mRNA 结合，增加其在 HepG2 细胞中的翻译，导致细胞脂质积累^[84]；3T3-L1 前脂肪细胞是研究脂肪细胞分化和代谢过程的经典模型，研究利用 3T3-L1 前脂肪细胞过表达 hnRNPA1 蛋白并进行诱导分化，检测 lncRNA11-hnRNPA1 复合物对脂肪代谢的影响。结果发现过表达 hnRNPA1 蛋白的成熟脂肪细胞中脂质生成减少，脂肪代谢相关基因表达水平升高。对过表达 hnRNPA1 蛋白的成熟脂肪细胞进行转录组测序分析，发现细胞中线粒体生物发生和功能相关过程通路被显著上调，包括线粒体呼吸链复合体组装、NADH 脱氢酶复合物组装、呼吸电子传递链、核苷三磷酸过程等，同时伴随着细胞内氧化磷酸化通路和产热通路的激活。在 lncRNA11 缺陷小鼠的棕色脂肪组织中，hnRNPA1 蛋白的表达量没有明显变化，说明 lncRNA11 缺陷不影响 hnRNPA1 蛋白的表达量，而过表达 hnRNPA1 蛋白增强了脂肪细胞中 lncRNA11 和 hnRNPA1 蛋白的结合，两者形成复合物影响线粒体生物过程和功能发挥脂代谢调控作用。

为进一步探究 lncRNA11-hnRNPA1 复合物发挥脂质代谢调控作用的分子机制，研究利用 Co-IP 实验结合高分辨质谱技术检测 hnRNPA1 蛋白的相互作用蛋白，发

现 PKM 是 lncRNA11-hnRNPA1 复合物作用的潜在靶点。丙酮酸激酶 (PK) 是催化糖酵解的限速酶。PK 在哺乳动物体内存在四种同工酶, 包括 PKM1 和 PKM2 (肌肉亚型), PKL (肝脏亚型), PKR (红细胞亚型)。PKL 和 PKR 由同一个基因(*Pklr*) 编码, 在不同的组织特异性启动子的控制下分别在肝脏和红细胞中表达。PKM1 和 PKM2 是由 *Pkm* 基因转录本的选择性剪接而产生的, 仅存在一个编码 56 个氨基酸的外显子的差异, PKM1 包含第 9 外显子, 而 PKM2 包含第 10 外显子^[85]。有研究发现异质核糖核蛋白 (hnRNPA1) 可与 PKM 前体 mRNA 结合, 促进胶质瘤细胞中 PKM2 的产生^[83]。

PKM1 和 PKM2 作为丙酮酸激酶的两异构体具有不同的功能。PKM1 促进氧化磷酸化, 在需要快速提供大量能量的组织中表达, 如骨骼肌和大脑。PKM2 亚型主要致力于有氧糖酵解, 在 BAT 中表达含量最高^[86]。大多数正常细胞通过线粒体中的丙酮酸氧化产生能量, 而脂肪细胞通过解偶联蛋白 1 (UCP1) 破坏线粒体中的 ATP 合成, 使质子流经线粒体内膜, 以热量的形式释放势能。理论上, 解偶联使脂肪线粒体失去能量, 导致 ATP 危机^[69], 而在解偶联过程中脂肪酸的激活需要 ATP, 此时, 脂肪中的线粒体主要通过糖酵解和 TCA 循环维持 ATP 的产生。PKM2 作为糖酵解酶和蛋白激酶在糖酵解和线粒体代谢的综合调节中发挥着双重作用。因此, 猜测 lncRNA11-hnRNPA1 复合物可能正是通过促进脂肪组织中 PK mRNA 可变剪接, 诱导 PKM2 的表达, 促进线粒体内的糖酵解过程, 减少线粒体 ROS 的产生, 保护线粒体的结构, 同时为线粒体内膜的 UCP1 解偶联过程提供大量 ATP, 从而促进脂肪组织的产热代谢过程。

总之, 本章研究利用 lncRNA11 缺陷小鼠和 3T3-L1 前脂肪细胞对 lncRNA11 调控脂肪组织代谢的分子机制进行了探究。在体内, 利用 RNA-Sequencing 和 RIP 实验发现, lncRNA11 缺陷通过降低皮下脂肪组织中的 hnRNPA1 表达导致 RNA 加工过程下调, 影响脂质代谢通路, 造成代谢紊乱, 脂质蓄积。而在小鼠棕色脂肪组织中, lncRNA11 缺陷主要是通过降低 lncRNA11 与 hnRNPA1 蛋白的相互作用, 破坏线粒体质量和氧化磷酸化功能进而导致脂肪组织产热代谢障碍。在体外, 利用 3T3-L1 前脂肪细胞探究 lncRNA11-hnRNPA1 蛋白复合物影响脂肪代谢的分子机制, 本研究确证 hnRNPA1 蛋白在 3T3-L1 前脂肪细胞的过表达可以直接提高成熟脂肪细胞的脂质代谢, 减少 TG 生成, 利用 RNA-Sequencing 和 Co-IP 技术手段, 确证 lncRNA11-hnRNPA1 复合物的作用靶点是丙酮酸激酶 M (PKM), 该酶在棕色脂肪中高表达, 是线粒体糖酵解过程中的关键酶, lncRNA11-hnRNPA1 复合物通过诱导 PK 的可变剪接生成 PKM2 亚型, 促进脂肪细胞中线粒体内的糖酵解过程, 减少线粒体 ROS 的产生, 保护线粒体结构, 促进线粒体的产热代谢功能, 从而维持脂肪组织的正常代谢。

总结和展望

以脂质过度积累为特征的肥胖及其诱导的相关代谢性疾病正在成为全球范围的流行病，带来了沉重的经济和健康负担。虽然肥胖患病率逐年上升，但是目前市面上的抗肥胖药物种类仍然较少，且效果不佳，还具有不同程度的不良反应，因此亟需开发新的治疗药物。近年来，长链非编码 RNA 在脂肪组织发育和功能调控中的作用备受关注，有望成为抗肥胖药物开发的候选靶点。本研究对脂肪组织中特异性高表达的 lncRNA11 展开功能探究，通过体内实验评价了 lncRNA11 缺陷对小鼠脂肪组织发育与代谢的影响，并基于转录组测序、免疫共沉淀等方法，对 lncRNA11 调控脂肪组织正常代谢的分子机制进行研究，取得重要成果如下：

首先，研究确认了 lncRNA11 在脂肪组织中高表达，并且与原代脂肪细胞分化相关。通过培育 lncRNA11 缺陷小鼠进行体内评价，确认 lncRNA11 缺陷影响了小鼠脂肪组织的发育和代谢，表现为关键产热基因表达下调，线粒体结构质量受损，最终损害小鼠的代谢能力。

其次研究阐述了 lncRNA11 通过 hnRNPA1 调控脂肪细胞脂质代谢的分子机制。本研究通过 RIP 实验结合高分辨质谱确认 lncRNA11 的相互作用蛋白为 hnRNPA1，其次在 3T3-L1 前脂肪细胞中过表达 hnRNPA1，诱导为成熟脂肪细胞，利用油红 O 染色、TG 含量检测和 RT-qPCR 技术发现 lncRNA11-hnRNPA1 复合物能够抑制脂肪细胞分化，减少脂质生成，转录组测序结果表明其通过调控线粒体生物合成过程和氧化磷酸化功能发挥脂质代谢促进作用。研究继续利用 Co-IP 实验检测到 hnRNPA1 的靶点蛋白 PKM，发现 lncRNA11-hnRNPA1 复合物通过诱导 PK 的 mRNA 可变剪接生成 PKM2 亚型，促进线粒体内的糖酵解过程，保护线粒体结构和产热代谢功能，从而改善脂质代谢的分子机制。

为了深入了解 lncRNA11 功能，今后还需开展如下研究：1、本研究通过 RIP 实验在体外确定了 lncRNA11 的互作蛋白 hnRNPA1，但缺乏对两者在体内结合的验证，其结合方式有待进一步探究。2、本研究通过在 3T3-L1 细胞中过表达 hnRNPA1 确证了 hnRNPA1 促进脂肪细胞脂质代谢的作用，但缺乏体内的验证，还需要补充 hnRNPA1 脂肪组织特异性过表达小鼠的体内药效学数据。3、LncRNA11-hnRNPA1 复合物如何影响 PK 前体 mRNA 可变剪接诱导 PKM2 的表达还需深入探究。

本文的创新点在于首次发现一种新的长链非编码 RNA (lncRNA11) 通过与蛋白质 hnRNPA1 形成复合体才能实现抑制脂肪蓄积。证明了 lncRNA11 可以作为抗肥胖药物研发的新靶标。

参考文献

- [1] LEANDRA A-G, ZIAD A A, ZARGAR A H, et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults [J]. *Lancet* (London, England), 2017, 390(10113): 2627-2642.
- [2] CHAD, DAS A. Obesity and Overweight [J]. *Indian medical journal*, 2020(6): 114.
- [3] REILLY J J, EL-HAMDOUCHI A, DIOUF A, et al. Determining the worldwide prevalence of obesity [J]. *Lancet* (London, England), 2018, 391(10132): 1773-1774.
- [4] LIN X, LI H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics [J]. *Frontiers in endocrinology*, 2021, 12: 706978.
- [5] 中国. 中国居民营养与慢性病状况报告 [J]. *营养学报*, 2020, 42(06): 521.
- [6] ABRAHAM T M, PEDLEY A, MASSARO J M, et al. Association between visceral and subcutaneous adipose depots and incident cardiovascular disease risk factors [J]. *Circulation*, 2015, 132(17): 1639-1647.
- [7] NEELAND I J, TURER A T, AYERS C R, et al. Dysfunctional adiposity and the risk of prediabetes and type 2 diabetes in obese adults [J]. *Jama*, 2012, 308(11): 1150-1159.
- [8] WANG T, HE C. Pro-inflammatory cytokines: The link between obesity and osteoarthritis [J]. *Cytokine & growth factor reviews*, 2018, 44: 38-50.
- [9] LEE K, KRUPER L, DIELI-CONWRIGHT C M, et al. The Impact of Obesity on Breast Cancer Diagnosis and Treatment [J]. *Current oncology reports*, 2019, 21(5): 41.
- [10] GOMEZ G, STANFORD F C. US health policy and prescription drug coverage of FDA-approved medications for the treatment of obesity [J]. *International journal of obesity* (2005), 2018, 42(3): 495-500.
- [11] WANG Q A, TAO C, GUPTA R K, et al. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration [J]. *Nature medicine*, 2013, 19(10): 1338-1344.
- [12] ASHA G V, RAJA GOPAL REDDY M, MAHESH M, et al. Male mice are susceptible to high fat diet-induced hyperglycaemia and display increased circulatory retinol binding protein 4 (RBP4) levels and its expression in visceral adipose depots [J]. *Archives of physiology and biochemistry*, 2016, 122(1): 19-26.
- [13] LÖNN M, MEHLIG K, BENGTSSON C, et al. Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women [J]. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2010, 24(1): 326-331.
- [14] KROTKIEWSKI M, BJÖRNTORP P, SJÖSTRÖM L, et al. Impact of obesity on metabolism

- in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution [J]. *The Journal of clinical investigation*, 1983, 72(3): 1150-1162.
- [15] SUÁREZ-CUENCA J A, DE LA PEÑA-SOSA G, DE LA VEGA-MORENO K, et al. Enlarged adipocytes from subcutaneous vs. visceral adipose tissue differentially contribute to metabolic dysfunction and atherogenic risk of patients with obesity [J]. *Scientific reports*, 2021, 11(1): 1831.
- [16] GIRALT M, VILLARROYA F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? [J]. *Endocrinology*, 2013, 154(9): 2992-3000.
- [17] FELDMANN H M, GOLOZOUBOVA V, CANNON B, et al. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality [J]. *Cell metabolism*, 2009, 9(2): 203-209.
- [18] HARPER M E, GREEN K, BRAND M D. The efficiency of cellular energy transduction and its implications for obesity [J]. *Annual review of nutrition*, 2008, 28: 13-33.
- [19] TSENG Y H, CYPESS A M, KAHN C R. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy [J]. *Nature reviews Drug discovery*, 2010, 9(6): 465-482.
- [20] CANNON B, NEDERGAARD J. Brown adipose tissue: function and physiological significance [J]. *Physiological reviews*, 2004, 84(1): 277-359.
- [21] SAITO M, MATSUSHITA M, YONESHIRO T, et al. Brown Adipose Tissue, Diet-Induced Thermogenesis, and Thermogenic Food Ingredients: From Mice to Men [J]. *Frontiers in endocrinology*, 2020, 11: 222.
- [22] GUERRA C, KOZA R A, YAMASHITA H, et al. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity [J]. *The Journal of clinical investigation*, 1998, 102(2): 412-420.
- [23] CYPESS A M, LEHMAN S, WILLIAMS G, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans [J]. *The New England journal of medicine*, 2009, 360(15): 1509-1517.
- [24] ZINGARETTI M C, CROSTA F, VITALI A, et al. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue [J]. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2009, 23(9): 3113-3120.
- [25] VAN MARKEN LICHTENBELT W D, VANHOMMERIG J W, SMULDERS N M, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men [J]. *The New England journal of medicine*, 2009, 360(15): 1500-1508.
- [26] TANG Q Q, LANE M D. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte [J]. *Annual review of biochemistry*, 2012, 81: 715-736.

- [27] SOCCIO R E, CHEN E R, LAZAR M A. Thiazolidinediones and the promise of insulin sensitization in type 2 diabetes [J]. *Cell metabolism*, 2014, 20(4): 573-591.
- [28] WILSON-FRITCH L, NICOLORO S, CHOUINARD M, et al. Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2004, 114(9): 1281-1289.
- [29] ZHANG B, XU S, LIU J, et al. Long Noncoding RNAs: Novel Important Players in Adipocyte Lipid Metabolism and Derivative Diseases [J]. *Frontiers in physiology*, 2021, 12: 691824.
- [30] ROSEN E D, MACDOUGALD O A. Adipocyte differentiation from the inside out [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2006, 7(12): 885-896.
- [31] ZHU E, ZHANG J, LI Y, et al. Long noncoding RNA Plnc1 controls adipocyte differentiation by regulating peroxisome proliferator-activated receptor γ [J]. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2019, 33(2): 2396-2408.
- [32] COOPER D R, CARTER G, LI P, et al. Long Non-Coding RNA NEAT1 Associates with SRp40 to Temporally Regulate PPAR γ 2 Splicing during Adipogenesis in 3T3-L1 Cells [J]. *Genes*, 2014, 5(4): 1050-1063.
- [33] CHEN G, YU D, NIAN X, et al. LncRNA SRA promotes hepatic steatosis through repressing the expression of adipose triglyceride lipase (ATGL) [J]. *Scientific reports*, 2016, 6: 35531.
- [34] LI G, ZHANG H, CAO K, et al. Transcriptome of visceral adipose tissue identifies an inflammation-related ceRNA network that regulates obesity [J]. *Molecular and cellular biochemistry*, 2022, 477(4): 1095-1106.
- [35] SUN L, GOFF L A, TRAPNELL C, et al. Long noncoding RNAs regulate adipogenesis [J]. *Proc atl Acad Sci USA.*, 2013, 110(9): 3387-3392.
- [36] KOPP F, MENDELL J T. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs [J]. *Cell*, 2018, 172(3): 393-407.
- [37] RANSOHOFF J D, WEI Y, KHAVARI P A. The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2018, 19(3): 143-157.
- [38] ALVAREZ-D J R, BAI Z, XU D, et al. De Novo Reconstruction of Adipose Tissue Transcriptomes Reveals Long Non-coding RNA Regulators of Brown Adipocyte Development [J]. *Cell metabolism*, 2015, 21(5): 764-776.
- [39] ZHAO X Y, LI S, WANG G X, et al. A long noncoding RNA transcriptional regulatory circuit drives thermogenic adipocyte differentiation [J]. *Molecular cell*, 2014, 55(3): 372-382.
- [40] XIONG Y, YUE F, JIA Z, et al. A novel brown adipocyte-enriched long non-coding RNA that is required for brown adipocyte differentiation and sufficient to drive thermogenic gene

- program in white adipocytes [J]. *Biochimica et biophysica acta Molecular and cell biology of lipids*, 2018, 1863(4): 409-419.
- [41] FENG S, REUSS L, WANG Y. Potential of Natural Products in the Inhibition of Adipogenesis through Regulation of PPAR γ Expression and/or Its Transcriptional Activity [J]. *Molecules*, 2016, 21(10):1278.
- [42] REY F, URRATA V, GILARDINI L, et al. Role of long non-coding RNAs in adipogenesis: State of the art and implications in obesity and obesity-associated diseases [J]. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 2021, 22(7): e13203.
- [43] SAITO M, OKAMATSU-OGURA Y, MATSUSHITA M, et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity [J]. *Diabetes*, 2009, 58(7): 1526-1531.
- [44] VIRTANEN K A, LIDELL M E, ORAVA J, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults [J]. *The New England journal of medicine*, 2009, 360(15): 1518-1525.
- [45] NAM M, COOPER M P. Role of Energy Metabolism in the Brown Fat Gene Program [J]. *Frontiers in endocrinology*, 2015, 6: 104.
- [46] KOENEN M, HILL M A, COHEN P, et al. Obesity, Adipose Tissue and Vascular Dysfunction [J]. *Circulation research*, 2021, 128(7): 951-968.
- [47] DESPRÉS J P, LEMIEUX I. Abdominal obesity and metabolic syndrome [J]. *Nature*, 2006, 444(7121): 881-887.
- [48] ROTH C L, MOLICA F, KWAK B R. Browning of White Adipose Tissue as a Therapeutic Tool in the Fight against Atherosclerosis [J]. *Metabolites*, 2021, 11(5):319.
- [49] KNUTH C M, PEPLER W T, TOWNSEND L K, et al. Prior exercise training improves cold tolerance independent of indices associated with non-shivering thermogenesis [J]. *The Journal of physiology*, 2018, 596(18): 4375-4391.
- [50] LIU S, WU D, FAN Z, et al. FABP4 in obesity-associated carcinogenesis: Novel insights into mechanisms and therapeutic implications [J]. *Frontiers in molecular biosciences*, 2022, 9: 973955.
- [51] FENZL A, KIEFER F W. Brown adipose tissue and thermogenesis [J]. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 2014, 19(1): 25-37.
- [52] PURI V, RANJIT S, KONDA S, et al. Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(22): 7833-7838.
- [53] SEALE P, KAJIMURA S, YANG W, et al. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16 [J]. *Cell metabolism*, 2007, 6(1): 38-54.
- [54] ULDRY M, YANG W, ST-PIERRE J, et al. Complementary action of the PGC-1 coactivators

- in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation [J]. *Cell metabolism*, 2006, 3(5): 333-341.
- [55] SHAN Z, FA W H, TIAN C R, et al. Mitophagy and mitochondrial dynamics in type 2 diabetes mellitus treatment [J]. *Aging*, 2022, 14(6): 2902-2919.
- [56] BRAVO-SAN PEDRO J M, KROEMER G, GALLUZZI L. Autophagy and Mitophagy in Cardiovascular Disease [J]. *Circulation research*, 2017, 120(11): 1812-1824.
- [57] CEDIKOVA M, KRIPNEROVÁ M, DVORAKOVA J, et al. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes [J]. *Stem cells international*, 2016, 2016: 6067349.
- [58] ISAKSON P, HAMMARSTEDT A, GUSTAFSON B, et al. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor-alpha, and inflammation [J]. *Diabetes*, 2009, 58(7): 1550-1557.
- [59] TAVANEZ J P, MADL T, KOOSHAPUR H, et al. hnRNP A1 proofreads 3' splice site recognition by U2AF [J]. *Molecular cell*, 2012, 45(3): 314-329.
- [60] BONNAL S, PILEUR F, ORSINI C, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2005, 280(6): 4144-4153.
- [61] BURD C G, DREYFUSS G. RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing [J]. *The EMBO journal*, 1994, 13(5): 1197-1204.
- [62] CAMMAS A, PILEUR F, BONNAL S, et al. Cytoplasmic relocalization of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 controls translation initiation of specific mRNAs [J]. *Molecular biology of the cell*, 2007, 18(12): 5048-5059.
- [63] WANG J, YANG W, CHEN Z, et al. Long Noncoding RNA lncSHGL Recruits hnRNPA1 to Suppress Hepatic Gluconeogenesis and Lipogenesis [J]. *Diabetes*, 2018, 67(4): 581-593.
- [64] LIU X, LIU X N, LI T J, et al. Research Progress of the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes into Mature Adipocytes [J]. *Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 2017, 39(5): 727-731.
- [65] PANG Y, XU X, XIANG X, et al. High Fat Activates O-GlcNAcylation and Affects AMPK/ACC Pathway to Regulate Lipid Metabolism [J]. *Nutrients*, 2021, 13(6): 1740.
- [66] SCHREURS M, KUIPERS F, VAN DER LEIJ F R. Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome [J]. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 2010, 11(5): 380-388.
- [67] PARK H, HE A, TAN M, et al. Peroxisome-derived lipids regulate adipose thermogenesis by

- mediating cold-induced mitochondrial fission [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2019, 129(2): 694-711.
- [68] LI Y, HE P P, ZHANG D W, et al. Lipoprotein lipase: from gene to atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2014, 237(2): 597-608.
- [69] DEMINE S, RENARD P, ARNOULD T. Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases [J]. *Cells*, 2019, 8(8): 795.
- [70] ROSINA M, CECI V, TURCHI R, et al. Ejection of damaged mitochondria and their removal by macrophages ensure efficient thermogenesis in brown adipose tissue [J]. *Cell metabolism*, 2022, 34(4): 533-548.e12.
- [71] IKEDA K, SHIBA S, HORIE-INOUE K, et al. A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle [J]. *Nature communications*, 2013, 4: 2147.
- [72] HUANG X, LIU G, GUO J, et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes [J]. *International journal of biological sciences*, 2018, 14(11): 1483-1496.
- [73] GUSTAFSON B, HEDJAZIFAR S, GOGG S, et al. Insulin resistance and impaired adipogenesis [J]. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 2015, 26(4): 193-200.
- [74] WANKHADE U D, LEE J H, DAGUR P K, et al. TGF- β receptor 1 regulates progenitors that promote browning of white fat [J]. *Molecular metabolism*, 2018, 16: 160-171.
- [75] YADAV H, QUIJANO C, KAMARAJU A K, et al. Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF- β /Smad3 signaling [J]. *Cell metabolism*, 2011, 14(1): 67-79.
- [76] WELLINGTON C L, WALKER E K, SUAREZ A, et al. ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation [J]. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 2002, 82(3): 273-283.
- [77] CUFFE H, LIU M, KEY C C, et al. Targeted Deletion of Adipocyte Abca1 (ATP-Binding Cassette Transporter A1) Impairs Diet-Induced Obesity [J]. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2018, 38(4): 733-743.
- [78] MAYEDA A, MUNROE S H, CACERES J F, et al. Function of conserved domains of hnRNP A1 and other hnRNP A/B proteins [J]. *The EMBO journal*, 1994, 13(22): 5483-5495.
- [79] STAMM S, BEN-ARI S, RAFALSKA I, et al. Function of alternative splicing [J]. *Gene*, 2005, 344: 1-20.
- [80] PIHLAJAMAKI J, LERIN C, ITKONEN P, et al. Expression of the splicing factor gene SFRS10 is reduced in human obesity and contributes to enhanced lipogenesis [J]. *Cell metabolism*, 2011, 14(2): 208-218.
- [81] DOUMATEY A P, XU H, HUANG H, et al. Global Gene Expression Profiling in Omental Adipose Tissue of Morbidly Obese Diabetic African Americans [J]. *Journal of endocrinology*

- and metabolism, 2015, 5(3): 199-210.
- [82] KAMINSKA D, PIHLAJAMÄKI J. Regulation of alternative splicing in obesity and weight loss [J]. *Adipocyte*, 2013, 2(3): 143-147.
- [83] LUAN W, WANG Y, CHEN X, et al. PKM2 promotes glucose metabolism and cell growth in gliomas through a mechanism involving a let-7a/c-Myc/hnRNPA1 feedback loop [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(15): 13006-13018.
- [84] SICULELLA L, TOCCI R, ROCHIRA A, et al. Lipid accumulation stimulates the cap-independent translation of SREBP-1a mRNA by promoting hnRNP A1 binding to its 5'-UTR in a cellular model of hepatic steatosis [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2016, 1861(5): 471-481.
- [85] CHEN D, WANG Y, LU R, et al. E3 ligase ZFP91 inhibits Hepatocellular Carcinoma Metabolism Reprogramming by regulating PKM splicing [J]. *Theranostics*, 2020, 10(19): 8558-8572.
- [86] ISIDOR M S, WINTHER S, MARKUSSEN L K, et al. Pyruvate kinase M2 represses thermogenic gene expression in brown adipocytes [J]. *FEBS letters*, 2020, 594(7): 1218-1225.

文献综述（英文版已发表）

LncRNAs 对脂代谢和相关疾病的调控作用

摘要：肥胖以脂质过度堆积为特征，与心血管疾病和糖尿病等一些慢性疾病密切相关，是一个全球性的公共卫生问题。额外能量摄入诱导的脂肪形成涉及各种转录因子和控制脂肪生成 mRNA 表达的长链非编码 RNA (lncRNAs)。目前，lncRNAs 因其在脂肪形成和脂肪组织功能中的贡献而受到广泛关注。越来越多的证据也表明，lncRNAs 在调节白色、棕色和米色脂肪组织发育和脂肪功能障碍引起的疾病进展中发挥了关键作用。本文综述了 lncRNAs 在脂肪组织发育和肥胖所致疾病中的作用，为肥胖和代谢性疾病的治疗提供新的药物靶点。

关键词：长链非编码 RNA，脂代谢，脂肪形成，棕色/米色脂肪，肥胖，胰岛素抵抗

Abstract: Obesity, a global public health issue, is characterized by excessive adiposity and is strongly related to some chronic diseases including cardiovascular diseases and diabetes. Extra energy intake-induced adipogenesis involves various transcription factors and long noncoding RNAs (lncRNAs) that control lipogenic mRNA expression. Currently, lncRNAs draw much attention for their contribution to adipogenesis and adipose tissue function. Increasing evidence also manifests the pivotal role of lncRNAs in modulating white, brown, and beige adipose tissue development and affecting the progression of the diseases induced by adipose dysfunction. The aim of this review is to summarize the roles of lncRNAs in adipose tissue development and obesity-caused diseases to provide novel drug targets for the treatment of obesity and metabolic diseases.

Keywords: Long noncoding RNAs, lipid metabolism; adipogenesis, brown/beige adipose, fat, insulin resistance

新出现的数据显示，超重和肥胖是全球范围内引起死亡的一个主要风险因素^[1-3]。脂肪组织作为主要的脂质储存器官，与肥胖的发生发展密切相关^[4]。当肥胖发生时，脂肪组织的形态、组成和功能的病理改变可导致各种代谢性疾病的发生，如胰岛素抵抗、脂肪肝、糖尿病和心血管疾病^[5-8]。确定新的针对肥胖及其相关代谢性疾病的治疗靶点具有重要意义。

脂肪组织在生理学上分为白色脂肪组织 (WAT) 和棕色脂肪组织 (BAT)。WAT 主要负责能量储存，而 BAT 由于含有丰富的线粒体，主要作为燃料氧化和能量消耗的场所。通过药物治疗或生热刺激，WAT 具有转化为“棕色样”细胞的潜力，这些脂肪细胞也能消耗能量。因此，促进 WAT 棕色化可能是预防肥胖的有效策略。

近年来，许多研究都集中在非编码 RNA 对脂肪组织活性的调节作用上。其中，长链非编码 RNA (lncRNAs) 被定义为不编码蛋白质的长链 RNA 转录本 (>200 bp)，这类 lncRNAs 在许多生物过程中发挥调节作用。lncRNAs 对脂肪细胞生物学的调控网络至关重要，对脂肪生成和脂代谢产生正向或负向的调控作用。它们还会影响脂肪组织的功能，如皮下白色脂肪褐变和

棕色脂肪生热。这种广泛的调控作用可能使 lncRNAs 成为对抗肥胖和相关代谢性疾病的一个很有前途的治疗方向。然而,关于 lncRNAs 在脂肪组织发育、脂质代谢异常和相关疾病中的影响的综述非常有限。因此,有必要总结有关 lncRNAs 调控脂质代谢和脂肪细胞生物学的最新研究进展。本文综述了 lncRNAs 作为脂质代谢紊乱和脂肪组织功能障碍引起的肥胖及相关疾病的治疗靶点的潜力。

1 lncRNAs: 一类新兴调节因子

1.1 lncRNAs 的发现和定义

全基因组嵌合阵列、GRO-Seq 和 ChIRP-Seq 等新技术的发展帮助识别了大量未知的 RNA。lncRNAs 被定义为长度超过 200 个核苷酸的 RNA 分子^[9-11]。1990 年报道的 H19 可能是第一个被发现的 lncRNA, H19 经 RNA 聚合酶 II 转录后像 mRNA 一样被剪接并多聚腺苷化,但几乎不编码蛋白质^[12-13]。自 H19 被发现以来,基因组测序技术的进步使得更多的 lncRNA 被发现。由于缺乏开放阅读框、3'非翻译区域和典型的末端区域,它们通常几乎没有编码蛋白质的潜力^[14],但它们在翻译、转录和表观遗传修饰等多种细胞过程中发挥着关键作用。

1.2 lncRNAs 的结构和功能

目前已有大量的 lncRNA 被鉴定出来,但它们迫切需要进行注释以供临床应用。注释之前需要将新发现的 lncRNAs 进行分类,根据其在基因组中与蛋白质编码基因的相对位置分为五类^[15]: 正义链,与最近的蛋白质编码基因链重叠;反义链,转录本在任何部分均与 mRNA 重叠的基因;内含子 lncRNAs,位于蛋白质编码基因的内含子中;双向 lncRNA,是指转录起始位点在相邻外显子 1000 个碱基对 (bp) 内且转录方向相反的 RNA;基因间 lncRNA 在两个蛋白质编码基因之间的基因间区。

lncRNAs 具有不同的结构基序,包括假结、茎环、G-四联体和三联体。它们通过与细胞核中的 DNA、mRNA 或细胞质中的 miRNA、蛋白质相互作用介导基因表达^[16-19]。一些 lncRNA 在多种代谢途径中作为分子信号直接促进转录,其他的则发挥调节作用,如作为分子诱饵的 lncRNAs 通过结合转录因子阻断信号通路。作为引导物的 lncRNAs,与蛋白质复合物连接,并引导它们到特定的基因组位点发挥作用。lncRNAs 也可以形成支架,招募修饰酶,整合不同的信号通路。lncRNAs 的作用模式相互关联,同一个 lncRNA 也能表现出不同的作用模式^[20]。综上所述,lncRNAs 的调控作用贯穿了基因表达变异的整个过程。

1.3 lncRNAs 与疾病

全基因组关联研究 (GWAS) 已经从非编码区发现了数千个单核苷酸多态性 (SNPs) 与临床表型相关,这将 lncRNA 与心血管、肝脏、肾脏疾病以及一些癌症密切联系起来^[21-23]。

不同的生理和病理条件下,lncRNA 在心血管系统中有不同的表达。研究发现有 lncRNA 调节心肌细胞的凋亡,如 lncRNA Sarrah,有的 lncRNA 是心肌肥大的表观遗传调控因子如 Chaer。

另外,有的 lncRNAs 可以降低心力衰竭和急性心肌梗死的风险^[24,25]。如 ZFAS1 可抑制 SERCA2a 蛋白的活性,后者是心肌收缩功能中急性心肌梗死的标志物。这些研究表明,lncRNA 在心血管疾病中的调控作用至关重要。

高通量测序技术的发展揭示了一些肝纤维化相关的 lncRNAs^[26]。研究表明 lncRNAs 参与肝纤维化过程中相关蛋白编码基因的调控。例如,Zhang 等人已经证明 lncLFAR1 可以激活 TGF- β 和 Notch 信号通路,促进肝星状细胞(HSC)的激活和肝纤维化^[27]。在肝细胞(HCs)中特异性表达的 lnc-HSER 被证实可通过 C5AR1-Hippo-YAP 通路阻止肝细胞凋亡,通过抑制 Notch 信号通路介导的肝细胞上皮-间充质转化缓解肝纤维化^[28]。

lncRNAs 在肾脏发病机制中也发挥着重要作用^[29]。全基因转录组谱分析在人近端肾小管上皮细胞中发现了一些与急性和慢性肾损伤相关的 lncRNAs。如 lnc-KiAA1737-2 和 lnc-MIR210HG 可能参与了肾损伤反应^[30]。此外,Feng 等人^[31]报道了一种新的 lncRNA Erbb4-IR,该基因通过 TGF β /Smad3 信号通路诱导肾纤维化。Zhou 等人^[32]发现 Arid2-ir 刺激 NF- κ B 依赖的肾炎症途径发挥作用。

lncRNAs 也参与了癌症的发生和进展^[33-34]。例如,lncRNA DINO 与 p53 蛋白形成正反馈环,以放大细胞核内的 DNA 损伤信号^[35]。此外,在胶质瘤干细胞(GSCs)中,Notch1 信号通路的激活可特异性诱导 lncRNATUG1 的表达,TUG1 可在细胞质中海绵化 miR-145,促进 GSCs 的更新^[36]。两个 TAP63 调控的 lncRNA, TROLL-2 和 TROLL-3,可在细胞质中与效应蛋白 WDR26 形成三聚体复合物,激活 AKT 通路^[37]。综上所述,lncRNAs 参与了不同的疾病过程,表明它们在维持人体稳态中起到关键作用。

2 lncRNAs 在控制脂质代谢和脂肪细胞发育中的关键作用

2.1 lncRNAs 在控制白色脂肪形成中的作用

脂肪的形成主要包括两个阶段。第一阶段是胚胎干细胞或脂肪组织中的间充质干细胞分化为脂肪祖细胞,然后分化为前脂肪细胞。第二阶段,前脂肪细胞分化为成熟的脂肪细胞^[38,39]。整个过程都伴随着许多关键的成脂基因和转录因子的表达,如脂蛋白脂肪酶(LPL)和甾醇调节元件结合蛋白-1c(SREBP-1c)。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)和 CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBPs)是成熟脂肪细胞的常见标记物,也是脂肪细胞分化的主要驱动因素。越来越多的研究发现,lncRNAs 可以调节这些关键基因,在脂肪形成中发挥关键作用^[40,41]。

人类脂肪组织来源的干细胞(hASCs)具有分化为骨细胞和脂肪细胞的能力。lncRNA MEG3 在骨细胞分化过程中表达上调,在脂肪细胞分化过程中表达下调。MEG3 敲除促进成脂分化,但抑制成骨分化,提示 MEG3 可能是 hASCs 成脂或成骨分化的开关^[42]。lncRNA ADINR,从 C/EBP α 基因上游约 450 bp 的位置转录,在成脂分化过程中被诱导。肖等人发现,ADINR 在成脂分化过程中增加了 H3K4me3 的甲基化,降低了 C/EBP α 的 H3K27me3 组蛋白修饰,调控 C/EBP α 的转录,最终促进了 hMSCs 的成脂分化^[43]。Plnc1 是从 PPAR γ 基因上游 25000bp 位置

转录的 lncRNA。体外研究表明, plnc1 基因敲除降低了 PPAR γ 、C/EBP α 和脂肪酸结合蛋白 4 (AP2) 的表达, 抑制了 ST2 细胞和骨髓间充质干细胞向成熟脂肪细胞的分化, 过表达 Plnc1 则有相反的效果。机制研究表明, plnc1 可通过降低 PPAR γ 启动子中 CPG 的甲基化水平增强 PPAR γ 的转录活性^[44]。

LncRNA miR-140 敲除降低了关键转录因子 (C/EBP 和 PPAR γ) 的表达, 从而直接损害了小鼠的成脂能力, 提示 miR-140 是脂肪细胞分化过程中的一个必要的调控因子。LncRNA qPCR 阵列显示, NEAT1 基因序列在人和小鼠之间高度保守, 并在 hASC 分化过程中上调。Gernapudi 等人利用 RNA 杂交鉴定了 NEAT1 中的 miR140 结合位点, 他们发现成熟的 miR-140 可以与细胞核中的 NEAT1 发生物理作用。进一步的实验数据表明, miR-140 与细胞核中 NEAT1 的结合增加了 NEAT1 的稳定性, 从而促进了脂肪的生成^[45]。

Nuermamaiti 等人^[46]发现 HOXA11-AS1 下调可抑制 hASCs 分化模型中脂肪生成相关基因的转录, 从而抑制成脂分化, 减轻脂质积累。并且 HOXA11-AS1 在肥胖症患者的脂肪细胞分化过程中高表达, 这提示它可能是治疗肥胖症的潜在靶点。此外, 生物信息学分析鉴定出 hASCs 在成脂分化过程中的一系列关键 mRNA、miRNAs 和 lncRNAs。通过分析瘦素基因的上游和下游区域, 几个相互作用轴被发现调控 hASCs 的成脂分化, 其中瘦素 (LEP) 相关轴尤为重要^[47]。

一些 lncRNAs 被报道为是抑制脂肪形成的潜在靶点。基于 cDNA 芯片对脂肪形成调控基因进行分析研究, 发现 lnc-U90926 的表达与 3T3-L1 前脂肪细胞的分化呈负相关, 在肥胖小鼠中的表达水平较低。利用 RNA 荧光原位杂交技术, 研究者证实 lnc-U90926 主要定位于小鼠前脂肪细胞的细胞质, lnc-U90926 过表达可以降低脂质积累和关键蛋白表达从而抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的分化, 表明它可以通过抑制关键基因的转录活性抑制脂肪的形成^[48]。李等人在成脂分化研究中发现 lncRNA GAS5 表达水平与间充质基质细胞 (MSCs) 的成脂分化呈负相关, 荧光素酶报告基因分析显示 GAS5 通过竞争性海绵化 miR-18a 抑制 MSCs 的成脂分化^[49], 表明 GAS5 是成脂分化过程中的重要调控因子。LncHCG11 是抑制脂肪形成的另一个靶点, 黎等人^[50]发现, 在体外 hADMSCs 分化模型中, lncHCG11 在细胞成脂分化过程中表达下降。当 HCG11 基因敲低时, 相关脂肪生成酶的活性和成脂蛋白的表达均有所增加, 而当过表达 HCG11 时, 则表现相反。对 HCG11/miR204-5p/SIRT1 轴的生物信息学分析表明, 当 miR-204-5p mimic 和 pcDNA-HCG11 共转染时, miR-204-5p mimic 降低了 SIRT1 对脂肪生成酶和成脂标记蛋白表达的抑制作用, 从而逆转 pcDNA-HCG11 对脂肪形成的抑制作用。

大多数 lncRNAs 在哺乳动物中保守性较差, 研究者需要更多的侧重人类脂肪组织中 lncRNAs 的识别和鉴定。张等人对来自健康和瘦子的皮下脂肪活检样本进行了 RNA 测序, 检测到 1001 个在脂肪组织中高表达的 lncRNAs, 其中 lnc-ADAL 的表达量最高。Lnc-ADAL 是一种与肥胖密切相关的非保守 lncRNA。shRNA 介导的 Lnc-ADAL 敲除抑制了脂质合成基因的表达, 而 ASO 介导的敲除不仅损害了成熟脂肪细胞中脂质合成基因的表达, 而且还损害了前脂肪细胞的分化。研究人员随后证实, lnc-ADAL 与核蛋白 hnRNPU 和胞质蛋白 IGF2BP2 相互作用, 控制前脂肪细胞分化和脂肪从头生成^[51]。这些研究表明 lncRNAs 在白色脂肪形成过程中发挥了

重要的调控作用。

2.2 LncRNAs 在棕色/米色脂肪发育中的作用及其功能

棕色脂肪细胞 (BAT) 在细胞质中含有丰富的线粒体和高水平的解偶联蛋白 1 (UCP1) [52]。它们可以通过解除脂质氧化磷酸化作用而产生热量, 促进脂肪酸和葡萄糖的燃烧。早期的研究表明 BAT 在新生儿中存在并活跃, 通过非颤抖产热维持体温 [53]。正电子发射断层扫描 (PET) 技术在成年男性中检测到大量的 BAT, 这表明 BAT 在成年代谢中也起着重要的作用 [54]。到目前为止, 一系列的研究表明, lncRNA 在棕色脂肪生成和产热过程中是不可或缺的调控因子 [55]。例如, H19, 一种母系遗传的 lncRNA, 与人类的体重指数 (BMI) 呈负相关。Schmitt 等人 [56] 报道, H19 过表达通过招募 H19-MBD1 复合物促进 BAT 的脂肪生成和线粒体呼吸, 阐明了 H19 在调节 BAT 生热基因程序和代谢中的作用。

崔等人 [57] 鉴定了一种超保守的 lncRNA, uc.417, 在分化的棕色脂肪细胞中含量丰富。他们发现 uc.417 的过表达抑制棕色脂肪细胞的分化, 降低棕色脂肪细胞的耗氧量, 在 BAT 的产热过程中起负向作用。另一种 lncRNA, lncBATE1, 被发现与 hnRNP U 相互作用, 促进棕色脂肪的形成和维持其生热能力 [58]。这些数据有力地支持了 lncRNA 在驱动棕色脂肪形成和维持能量平衡方面的作用。

米色脂肪通常储存在白色脂肪仓库中, 可以由 WAT 中特定的米色前体细胞分化而来, 或直接来自于成熟皮下脂肪细胞在寒冷或其他刺激下的褐变。因为他们能像 BAT 一样高度表达 UCP1 蛋白, 促进产热, 因此诱导米色脂肪形成, 将不健康 WAT 转化为代谢活跃的 BAT, 有助于抵抗肥胖, 被认为是一种有潜在应用价值的肥胖治疗策略 [59-61]。王等发现 FOXC2-AS1 在毛喉素刺激的脂肪细胞中高表达, 同时伴随 UCP1 和 PGC1 α 的高表达。随后他们发现 FOXC2-AS1 可能通过自噬信号通路促进 WAT 的褐变和生热基因程序的表达。这些结果表明, lncRNA 在米色脂肪的发育和功能激活中也发挥着重要作用 [62]。

LncRNAs 还可以通过共表达网络发挥调控作用。例如, 白等人 [63] 发现大量的 lncRNA 通过嵌入到代谢通路中形成 mRNA-lncRNA 共表达网络。通过这个网络, 他们鉴定出了 BAT 中高表达的 lncBATE10, 并发现其可以与 PGC1 α 的 mRNA 竞争性结合 Celf1, 保护 PGC1 α 的表达, 从而保护生热和 WAT 褐变过程。此外, AK079912 是另一个 BAT 中高表达的 lncRNA, 熊等人发现敲除 AK079912 降低了重要的成脂基因和产热基因的表达, 而过表达则通过增加 UCP1 和线粒体电子传递链 (ETC) 复合物的蛋白表达上调产热通路, 并且在腹股沟 WAT 中异位表达可以诱导白色脂肪组织的褐变。

Blncl 被发现在棕色和米色脂肪细胞中含量丰富。在棕色脂肪细胞中过表达 Blncl, 发现其可通过 Blncl/hnRNP/EBF2 核糖核蛋白复合物的形成, 激活生热基因的表达 [64]。在高脂饮食 (HFD) 诱导的小鼠棕色脂肪“白色化”过程中, 脂肪组织中 Blncl 的特异性敲除加速了 BAT 的“白色化”, 而且加剧了炎症。然而, 脂肪特异性 Blncl 转基因小鼠则表现相反, 研究者发现其分子机制是 Blncl 作为 EBF2 的靶点, 构建了一个前馈调控回路, 调控 WAT 的褐变 [65]。此外,

林等人^[66]发现, Zbtb7b 可以通过 hnRNP U 招募 lncRNA Blnc1 增加生热基因的表达, 而 Blnc1 的功能在鼠和人类中是保守的^[67]。因此, lncRNA 是激活棕色/米色脂肪细胞发挥功能的重要调节因子, 有利于降低血清甘油三酯和对抗肥胖。

2.3 肝脏中的 LncRNAs 和脂质稳态

除了已知的在脂肪细胞中的作用外, 一系列研究表明, lncRNA 通过靶向关键转录因子如肝脏 X 受体(LXRs)、甾醇调节元件结合蛋白(SREBPs)和过氧化物酶体增殖激活受体 α (PPAR α) 调控肝脏中的脂质代谢。这些转录因子是调控肝脏中与胆固醇、脂肪酸、磷脂的合成和摄取有关基因表达的关键调控因子^[68]。在这里, 我们总结了 lncRNA 在肝脏脂质稳态中的调控机制。

LncHR1 是在感染 HCV 的人肝癌细胞中发现的一类 lncRNA, 它被发现负调控 SREBP-1c 和脂肪酸合酶的表达, LncHR1 的过表达则抑制了肝细胞中甘油三酯和脂滴的积累^[69]。李等人^[70]发现在肝脏中表达丰富的 lncLSTR 可通过竞争性结合 TDP-43 调节 Cyp8b1 的表达, 继而通过核受体 FXR 通路激活 Apoc2 表达, 降低血浆甘油三酯水平。此外, 王等人^[71]发现, Lnc19959.2 在高脂诱导的肝细胞中表达上调。过表达 lnc19959.2 可以通过与核蛋白 Purb 相互作用促进 ApoA4 的表达。Lnc19959.2 与 hnRNPA2B1 特异性结合, 则可以负调控 TG 代谢相关基因的表达。以上研究表明在肝脏中特异性表达的 lncRNAs 在肝脏的甘油三酯代谢中起到关键的调控作用。

LncRNAs 也与肝脏胆固醇代谢密切相关。胡等人^[72]发现, ox-LDL 可以显著上调 lincRNA-DYN-LRB2-2 的表达, 直接导致 ATP 结合盒转运体 A1 (ABCA1) 的表达增加, 而 ABCA1 介导泡沫细胞中的胆固醇外排从而降低胆固醇水平^[73]。另一项研究发现, lncTUG1 通过以 miR-92a/FXR1 依赖的方式抑制 APOM 的表达抑制胆固醇外排^[74]。此外, 黄等人^[75]发现过表达 lncARSR 可以激活 PI3K/Akt 信号通路, 促进转录因子 SREBP2 的表达, 该转录因子反过来增加了限速酶 HMGCR 的表达水平, 并加速了肝脏中胆固醇的生物合成。

3 LncRNAs 作为脂肪细胞功能障碍诱导相关疾病的治疗靶点的潜力

肥胖通常会导致一些代谢性疾病, 包括非酒精性脂肪肝、糖尿病和其他糖尿病并发症^[76]。然而, 临床上治疗这些疾病的靶点和方法仍然有限^[77]。现有已批准的药物主要通过减少肠道脂肪吸收或抑制食欲对抗肥胖^[78]。相关代谢性疾病的治疗主要是通过使用具有降糖或降脂活性的药物。然而, 这些药物通常对人体的副作用较大, 其保护作用有限。例如, 他汀类药物通常会引起肌肉不良反应, 如致命的横纹肌溶解症^[79]。服用烟酸可降低葡萄糖耐量, 增加尿酸水平, 可能导致痛风发作和肝功能受损^[80]。因此, 迫切需要确定新的靶点, 以开发新的有效和安全的药物。

3.1 LncRNAs 在胰岛素抵抗中的作用

低度慢性炎症作为肥胖的标志, 已被确定为胰岛素抵抗发生的重要危险因素^[81]。肥胖患者

体内游离脂肪酸的增加可促进 NF- κ B 信号通路，从而上调促炎细胞因子如 TNF- α 和 IL-6 的表达^[82]。而促炎信号可抑制代谢组织中胰岛素的功能，从而介导胰岛素抵抗。由于炎症反应是由巨噬细胞对过度脂质积累产生反应而引起的一种表型，研究人员一直关注如何通过巨噬细胞减少这种炎症反应。近年来的研究发现了一些在巨噬细胞中富集的 lncRNAs，并在饮食诱导的肥胖和早期糖尿病小鼠模型中差异表达。

Stapleton 等人^[83]在功能获得和丧失实验中发现，MIST 与巨噬细胞抗炎表型相关。当 MIST 的转录或与 RNA 的相互作用被破坏时，炎症基因的表达显著增加。研究者发现 MIST 与细胞核中的多聚 ADP-核糖聚合酶（PARP1）相互作用，可能通过干扰胰岛素抵抗相关促炎因子的形成，起到保护作用。此外，张等人^[84]发现 lncRNA uc.333 通过与 miR-223 结合，改善了肥胖诱导的胰岛素抵抗。此外，刘等人^[85]报道，lncRNA SRA 敲除可以保护小鼠免受高脂肪饮食诱导的肥胖，改善其糖耐量。综上表明 lncRNAs 是改善胰岛素抵抗的潜在治疗靶点。

3.2 LncRNAs 在肝脂肪变性中的作用

代谢紊乱常导致非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）和肝脂肪变性（NASH），其特征是肝脏脂质的积累^[86]。如果 NAFLD 不能及时治疗，则可逐渐发展为 NASH，然后发展为肝细胞癌或其他恶性疾病^[87,88]。lncRNAs 可能是肝脏脂肪过度蓄积和肝脏脂肪稳态损害的标志。在 NAFLD 的动物模型中，王等人^[89]发现 lncRNA-NEAT1 敲低可能通过调节 mTOR/ S6K1 信号通路缓解 NAFLD 的进程。另一种 lncRNA，MALAT1，在 ob/ob 小鼠的肝脏中高表达，其机制研究表明，抑制 MALAT1 可以通过降低肝细胞核内 SREBP-1c 蛋白的稳定性，抑制肝脂质积累，减轻肝脂肪变性^[90]。考虑到 BLNC1 在肥胖小鼠和 NAFLD 小鼠肝脏中的表达明显升高，研究者研究了 BLNC1 对 HFD 诱导的肝脂肪变性的影响。他们发现，BLNC1 缺失极大地抑制了 LXR 激动剂诱导 SREBP1 蛋白的表达，降低血浆 TAG 水平。此外，肝特异性 BLNC1 基因敲除小鼠对 HFD 诱导的肝脂肪变性表现出抵抗性，表现为肝损伤和纤维化减少，表明 BLNC1 可能与 LXR 协同控制肝脂质代谢^[91]。因此 lncRNAs 可能成为 NAFLD 患者治疗的新靶点。

3.3 LncRNAs 在动脉粥样硬化中的作用

动脉粥样硬化的发病机制很复杂，但目前的研究证实血脂异常（血浆胆固醇和脂蛋白水平异常）是关键的危险因素之一^[92]。由于许多研究已经证实了 lncRNA 在脂质稳态中的调节作用，一些研究人员认为它们可能参与了动脉粥样硬化的疾病发展过程。lncRNA KCNQ10T1 可通过 miR-452-3p/HDAC3/ABCA1 通路抑制胆固醇外排，促进巨噬细胞内脂质积累，从而导致动脉粥样硬化的发生^[93]。动脉粥样硬化的一个关键节点是巨噬细胞摄取脂蛋白并形成泡沫细胞^[94]。Kanwal 等人发现 lncRNA E330013P06 上调巨噬细胞中 CD36 的表达，促进泡沫细胞的形成^[95]。另一种 lncRNA AAT102202 被发现控制胆固醇合成关键酶 HMGCR 的表达，从而影响巨噬细胞中胆固醇的积累^[96]。虽然 lncRNAs 在动脉粥样硬化中的作用和机制仍有待进一步探索，但已有研究表明 lncRNAs 显然是参与动脉粥样硬化病理过程的重要调控因子。lncRNA 作为动脉粥样硬

化的生物标志物和潜在的治疗靶点具有潜在的临床应用价值。

3.4 lncRNAs 在糖尿病并发症中的作用

流行病学研究报告称,长期腹部肥胖的患者发生糖尿病的患病率大幅增加^[97]。糖尿病的主要危害在于其严重的并发症,如糖尿病性视网膜病变、肾病、心肌病等,然而,对于这些并发症的治疗靶点和药物十分有限^[98]。lncRNAs 最近因其在糖尿病并发症中的调控作用而受到关注。

糖尿病性视网膜病变是由高血糖和血脂异常引起的常见并发症。目前,视网膜基因表达谱已鉴定出超过 300 种与糖尿病视网膜病变相关的差异表达 lncRNA^[99]。一项研究表明,下调 lncRNA MALAT1 可以抑制视网膜内皮细胞的增殖、迁移和管状形成^[100]。同时, Radhakrishnan 等^[101]研究证实,抑制 MALAT1 可通过 Keap1-Nrf2 通路减轻氧化损伤,改善视网膜血管功能,减缓糖尿病视网膜病变。此外,研究者发现 lncRNA MIAT 可以与 VEGF 和 miR-150-5p 形成反馈回路,调节内皮细胞功能,改善糖尿病诱导的微血管功能障碍^[102]。因此, lncRNAs 参与糖尿病视网膜病变的发生发展,可能是该疾病的潜在治疗靶点。

慢性高血糖和血脂异常也是糖尿病肾病的主要原因,糖尿病肾病是一种以肾小球毛细血管损伤为特征的微血管并发症^[103]。越来越多的证据支持 lncRNA 参与了该疾病的发生和发展。例如,研究发现 lncRNA Tug1 与 PGC-1 α 相互作用,调节其表达,影响足细胞线粒体能量代谢^[104]。此外,在伴有终末期肾病的 II 型糖尿病患者中, lncPVT1 控制细胞外基质的积累和肾细胞纤维化的进展,从而介导糖尿病肾脏疾病的发展^[105]。

糖尿病性心肌病主要由心脏脂肪毒性引起^[106]。lncRNA GAS5 调控 miR-34b-3p/AHR 通路,抑制 NLRP3 炎症小体激活诱导的细胞凋亡,使 GAS5 成为潜在的治疗靶点^[107]。王等人^[108]发现,沉默 lncRNA MALAT1 可以通过 EZH2/miR-22/ABCA1 信号轴抑制 EZH2 的表达从而阻止心肌细胞凋亡,减轻心功能障碍。综上,一系列研究表明, lncRNAs 在糖尿病并发症的病理过程中发挥着重要作用,对疾病治疗具有潜在意义。

总结和展望

本文主要对 lncRNAs 在脂肪组织发育和功能以及肝脏脂质代谢稳态中的调控作用进行了综述。同时,一系列的研究表明 lncRNAs 参与了脂肪细胞功能障碍引起的疾病,如胰岛素抵抗、肝脂肪变性和糖尿病并发症。目前,大多数用于对抗肥胖的药物都是靶向蛋白发挥作用,但由于这些药物对非靶蛋白的意外调控而产生副作用。因此,靶向核酸新药的开发可能为肥胖及其相关疾病的治疗提供一种新的治疗策略。

靶向核酸疗法正在逐步应用于治疗某些疾病如抗菌和抗癌^[109,110]。靶向核酸疗法被认为是第三代治疗药物,目前报道的主要有三种治疗策略:(i)小干扰 RNA (siRNA),靶向细胞质 lncRNA,如 Givlaari (Givosiran),被批准治疗成人急性肝卟啉症^[111];(ii)反义寡核苷酸 (ASO),靶向核 lncRNAs。LNA gapmeR 反义寡核苷酸靶向 lncRNA MALAT1 能够抗多发性骨髓瘤^[112];(iii) CRISPR/Cas9 技术适用于双定位 lncRNA,已广泛应用于 lncRNA 的发现和注释,但目前

在系统给药方面还不理想^[113]。这三种疗法已被批准应用于临床,但都面临脱靶问题^[114-116]。一些 lncRNA 正向调节白色脂肪的形成,并在肥胖患者中表达上调,它们可能是 ASO 的合适靶点。然而,目前没有 lncRNA 靶向药物进入临床试验,许多治疗方法仍处于临床前阶段。由于许多 lncRNA 的保守性很差,研究人员难以将小鼠模型上成功的经验应用到人类的疾病治疗中。因此,更多人源化的 lncRNA 有待探索,从而建立更适用的临床前研究模型。另一方面, lncRNA 的调控网络比较复杂,在体内不易实现准确的调控,因此,有必要建立一个高度组织化的 lncRNA 研究数据库, D-LNC 平台就是这样一个尝试,可查询和分析药物对 lncRNA 表达的修饰作用^[117]。

综上所述,对 lncRNAs 在脂肪代谢和肥胖相关疾病中的研究,以及上述治疗策略,可能为肥胖及相关代谢性疾病的治疗提供新的治疗途径。

参考文献

- [1] BLÜHER M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis [J]. *Nature reviews. Endocrinology*. 2019, 15(5): 288-298.
- [2] CHOOI Y C, DING C, MAGKOS F. The epidemiology of obesity [J]. *Metabolism*. 2019, 92: 6-10.
- [3] PEETERS A, BARENDREGT J J, WILLEKENS F, et al. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis [J]. *Annals of internal medicine*. 2003, 138: 24-32.
- [4] SUN K, KUSMINSKI C M, SCHERER P E. Adipose tissue remodeling and obesity [J]. *The Journal of clinical investigation*. 2011, 121: 2094-2101.
- [5] GHABEN A L, SCHERER P E. Adipogenesis and metabolic health [J]. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2019, 20: 242-258.
- [6] LAVIE C J, MILANI R V, VENTURA H O. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss [J]. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009, 53: 1925-1932.
- [7] SCHETZ M, DE J A, DEANE A M, et al. Obesity in the critically ill: a narrative review [J]. *Intensive care medicine*. 2019, 45: 757-769.
- [8] CHU C, QU K, ZHONG F L, et al. Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions [J]. *Molecular cell*. 2011, 44: 667-678.
- [9] CORE L J, WATERFALL J J, LIS J T. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters [J]. *Science*. 2008, 322: 1845-1848.
- [10] GUTTMAN M, AMIT I, GARBER M, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals [J]. *Nature*. 2009, 458: 223-227.
- [11] BARTOLOMEI M S, ZEMEL S, TILGHMAN S M. Parental imprinting of the mouse H19 gene [J]. *Nature*. 1991, 351: 153-155.

- [12] BRANNAN C I, DEES E C, INGRAM R S, et al. The product of the H19 gene may function as an RNA [J]. *Molecular and cellular biology*. 1990, 10: 28-36.
- [13] JARROUX J, MORILLON A, PINSKAYA M. History, Discovery, and Classification of lncRNAs [J]. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017, 1008: 1-46.
- [14] MATTICK J S, RINN J L. Discovery and annotation of long noncoding RNAs [J]. *Nature structural & molecular biology*. 2015, 22: 5-7.
- [15] QIAN X, ZHAO J, YEUNG P Y, et al. Revealing lncRNA Structures and Interactions by Sequencing-Based Approaches. [J]. *Trends in biochemical sciences*. 2019, 44: 33-52.
- [16] SUN M, KRAUS W L. From discovery to function: the expanding roles of long noncoding RNAs in physiology and disease [J]. *Endocrine reviews*. 2015, 36: 25-64.
- [17] ULITSKY I, BARTEL D P. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms [J]. *Cell*. 2013, 154: 26-46.
- [18] WILLINGHAM A T, ORTH A P, BATALOV S, et al. A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT [J]. *Science*. 2005, 309: 1570-1573.
- [19] WANG K C, YANG Y W, LIU B, et al. A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression [J]. *Nature*. 2011, 472: 120-124.
- [20] WANG K C, CHANG H Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs [J]. *Molecular cell*. 2011, 43: 904-914.
- [21] GONG Z, TANG J, XIANG T, et al. Genome-wide identification of long noncoding RNAs in CCl4-induced liver fibrosis via RNA sequencing [J]. *Molecular medicine reports*. 2018, 18: 299-307.
- [22] GAO P, WEI G H. Genomic Insight into the Role of lncRNA in Cancer Susceptibility [J]. *International journal of molecular sciences*. 2017, 18(6): 1239.
- [23] HU W, DING H, OUYANG A, et al. LncRNA MALAT1 gene polymorphisms in coronary artery disease: a case-control study in a Chinese population [J]. *Bioscience reports*. 2019, 39(3): BSR20182213.
- [24] WANG Z, ZHANG X J, JI Y X, et al. The long noncoding RNA Chaer defines an epigenetic checkpoint in cardiac hypertrophy [J]. *Nature medicine*. 2016, 22: 1131-1139.
- [25] TREMBINSKI D J, BINK D I, THEODOROU K, et al. Aging-regulated anti-apoptotic long non-coding RNA Sarrah augments recovery from acute myocardial infarction [J]. *Nature communications*. 2020, 11(1): 2039.
- [26] HAN P, LI W, LIN C H, et al. A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy [J]. *Nature*. 2014, 514: 102-106.
- [27] ZHANG Y, JIAO L, SUN L, et al. LncRNA ZFAS1 as a SERCA2a Inhibitor to Cause Intracellular Ca(2+) Overload and Contractile Dysfunction in a Mouse Model of Myocardial

- Infarction [J]. *Circulation research*. 2018, 122(10): 1354-1368.
- [28] BIAN E B, XIONG Z G, LI J. New advances of lncRNAs in liver fibrosis, with specific focus on lncRNA-miRNA interactions [J]. *Journal of cellular physiology*. 2019, 234(3): 2194-2203.
- [29] ZHANG K, HAN X, ZHANG Z, et al. The liver-enriched lnc-LFAR1 promotes liver fibrosis by activating TGF β and Notch pathways [J]. *Nature communications*. 2017, 8(1): 144.
- [30] ZHANG K, ZHANG M, YAO Q, et al. The hepatocyte-specifically expressed lnc-HSER alleviates hepatic fibrosis by inhibiting hepatocyte apoptosis and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Theranostics*. 2019, 9(25): 7566-7582.
- [31] MOGHADDAS S H, HEJAZIAN M, HOSSEINIAN K S M, et al. Long non-coding RNAs: An essential emerging field in kidney pathogenesis [J]. *Biomedecine & pharmacotherapie*. 2018, 99: 755-765.
- [32] LIN J, ZHANG X, XUE C, et al. The long noncoding RNA landscape in hypoxic and inflammatory renal epithelial injury [J]. *American journal of physiology. Renal physiology*. 2015, 309(11): F901-913.
- [33] FENG M, TANG P M, HUANG X R, et al. TGF- β Mediates Renal Fibrosis via the Smad3-ErbB4-IR Long Noncoding RNA Axis [J]. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2018, 26(1): 148-161.
- [34] ZHOU Q, HUANG X R, YU J, et al. Long Noncoding RNA Arid2-IR Is a Novel Therapeutic Target for Renal Inflammation [J]. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2015, 23(6): 1034-1043.
- [35] PENG W X, KOIRALA P, MO Y Y. LncRNA-mediated regulation of cell signaling in cancer [J]. *Oncogene*. 2017, 36(41): 5661-5667.
- [36] IYENGAR N M, GUCALP A, DANNENBERG A J, et al. Obesity and Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation [J]. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016, 34(35): 4270-4276.
- [37] SCHMITT A M, GARCIA J T, HUNG T, et al. An inducible long noncoding RNA amplifies DNA damage signaling [J]. *Nature genetics*. 2016, 48(11): 1370-1376.
- [38] KATSUSHIMA K, NATSUME A, OHKA F, et al. Targeting the Notch-regulated non-coding RNA TUG1 for glioma treatment [J]. *Nature Communications*. 2016, 7: 13616.
- [39] NAPOLI M, LI X, ACKERMAN H D, et al. Pan-cancer analysis reveals TAP63-regulated oncogenic lncRNAs that promote cancer progression through AKT activation [J]. *Nature Communications*. 2020, 11(1): 5156.
- [40] AMBELE M A, DHANRAJ P, GILES R, et al. Adipogenesis: A Complex Interplay of Multiple Molecular Determinants and Pathways [J]. *International journal of molecular*

- sciences. 2020, 21(12): 4283.
- [41] ALI A T, HOCHFELD W E, MYBURGH R, et al. Adipocyte and adipogenesis [J]. *European journal of cell biology*. 2013, 92: 229-236.
- [42] CIPOLLETTA D, FEUERER M, LI A, et al. PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells [J]. *Nature*. 2012, 486(7404): 549-553.
- [43] LI Z, JIN C, CHEN S, et al. Long non-coding RNA MEG3 inhibits adipogenesis and promotes osteogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells via miR-140-5p [J]. *Molecular and cellular biochemistry*. 2017, 433(1-2): 51-60.
- [44] XIAO T, LIU L, LI H, et al. Long Noncoding RNA ADINR Regulates Adipogenesis by Transcriptionally Activating C/EBP α [J]. *Stem Cell Reports*. 2015, 5(5): 856-865.
- [45] ZHU E, ZHANG J, LI Y, et al. Long noncoding RNA Plnc1 controls adipocyte differentiation by regulating peroxisome proliferator-activated receptor γ [J]. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2019, 33(2): 2396-2408.
- [46] GERNAPUDI R, WOLFSON B, ZHANG Y, et al. MicroRNA 140 Promotes Expression of Long Noncoding RNA NEAT1 in Adipogenesis [J]. *Molecular and cellular biology*. 2016, 36(1): 30-38.
- [47] NUERMAIMAITI N, LIU J, LIANG X, et al. Effect of lncRNA HOXA11-AS1 on adipocyte differentiation in human adipose-derived stem cells [J]. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018, 495(2): 1878-1884.
- [48] GUO Z, CAO Y. An lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA network for adipocyte differentiation from human adipose-derived stem cells [J]. *Molecular medicine reports*. 2019, 19(5): 4271-4287.
- [49] CHEN J, LIU Y, LU S, et al. The role and possible mechanism of lncRNA U90926 in modulating 3T3-L1 preadipocyte differentiation [J]. *International journal of obesity*. 2017, 41(2): 299-308.
- [50] LI M, XIE Z, WANG P, et al. The long noncoding RNA GAS5 negatively regulates the adipogenic differentiation of MSCs by modulating the miR-18a/CTGF axis as a ceRNA [J]. *Cell death & disease*. 2018, 9(5): 554.
- [51] LIU H, LI H, JIN L, et al. Long Noncoding RNA GAS5 Suppresses 3T3-L1 Cells Adipogenesis Through miR-21a-5p/PTEN Signal Pathway [J]. *DNA and cell biology*. 2018, 37(9): 767-777.
- [52] LI D, LIU Y, GAO W, et al. LncRNA HCG11 Inhibits Adipocyte Differentiation in Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells by Sponging miR-204-5p to Upregulate SIRT1 [J]. *Cell Transplantation*. 2020, 29: 963689720968090.

- [53] ZHANG X, XUE C, LIN J, et al. Interrogation of nonconserved human adipose lincRNAs identifies a regulatory role of linc-ADAL in adipocyte metabolism [J]. *Science translational medicine*. 2018, 10(446): eaar5987
- [54] CANNON B, HEDIN A, NEDERGAARD J. Exclusive occurrence of thermogenin antigen in brown adipose tissue [J]. *FEBS letters*. 1982, 150(1): 129-132.
- [55] CANNON B, NEDERGAARD J. Brown adipose tissue: function and physiological significance [J]. *Physiological reviews*. 2004, 84(1): 277-359.
- [56] NEDERGAARD J, BENGTSSON T, CANNON B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans [J]. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2007, 293(2): E444-452.
- [57] YOU L H, ZHU L J, YANG L, et al. Transcriptome analysis reveals the potential contribution of long noncoding RNAs to brown adipocyte differentiation [J]. *Molecular genetics and genomics : MGG*. 2015, 290(5): 1659-1671.
- [58] SCHMIDT E, DHAOUADI I, GAZIANO I, et al. LincRNA H19 protects from dietary obesity by constraining expression of monoallelic genes in brown fat [J]. *Nature communications*. 2018, 9(1): 3622.
- [59] CUI X, YOU L, LI Y, et al. A transcribed ultraconserved noncoding RNA, uc.417, serves as a negative regulator of brown adipose tissue thermogenesis [J]. *FASEB journal*. 2016, 30(12): 4301-4312.
- [60] ALVAREZ-D J R, BAI Z, XU D, et al. De Novo Reconstruction of Adipose Tissue Transcriptomes Reveals Long Non-coding RNA Regulators of Brown Adipocyte Development [J]. *Cell metabolism*. 2015, 21(5): 764-776.
- [61] GUERRA C, KOZA R A, YAMASHITA H, et al. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity [J]. *The Journal of clinical investigation*. 1998, 102(2): 412-420.
- [62] BARTELT A, HEEREN J. Adipose tissue browning and metabolic health [J]. *Nature reviews. Endocrinology*. 2014, 10(1): 24-36.
- [63] WANG W, SEALE P. Control of brown and beige fat development [J]. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2016, 17(11): 691-702.
- [64] WANG Y, HUA S, CUI X, et al. The Effect of FOXC2-AS1 on White Adipocyte Browning and the Possible Regulatory Mechanism [J]. *Frontiers in endocrinology*. 2020, 11: 565483.
- [65] BAI Z, CHAI X R, YOON M J, et al. Dynamic transcriptome changes during adipose tissue energy expenditure reveal critical roles for long noncoding RNA regulators [J]. *PLoS biology*. 2017, 15(8): e2002176.
- [66] XIONG Y, YUE F, JIA Z, et al. A novel brown adipocyte-enriched long non-coding RNA

- that is required for brown adipocyte differentiation and sufficient to drive thermogenic gene program in white adipocytes [J]. *Molecular and cell biology of lipids*. 2018, 1863(4): 409-419.
- [67] MI L, ZHAO X Y, LI S, et al. Conserved function of the long noncoding RNA Blnc1 in brown adipocyte differentiation [J]. *Molecular metabolism*. 2017, 6(1): 101-110.
- [68] ZHAO X Y, LI S, WANG G X, et al. A long noncoding RNA transcriptional regulatory circuit drives thermogenic adipocyte differentiation [J]. *Molecular cell*. 2014, 55(3): 372-382.
- [69] LI S, MI L, YU L, et al. Zbtb7b engages the long noncoding RNA Blnc1 to drive brown and beige fat development and thermogenesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017, 114(34): E7111-e7120.
- [70] SUN L, LIN J D. Function and Mechanism of Long Noncoding RNAs in Adipocyte Biology [J]. *Diabetes*. 2019, 68(5): 887-896.
- [71] LI D, CHENG M, NIU Y, et al. Identification of a novel human long non-coding RNA that regulates hepatic lipid metabolism by inhibiting SREBP-1c [J]. *International journal of biological sciences*. 2017, 13(3): 349-357.
- [72] LI P, RUAN X, YANG L, et al. A liver-enriched long non-coding RNA, lncLSTR, regulates systemic lipid metabolism in mice [J]. *Cell metabolism*. 2015, 21(3): 455-467.
- [73] WANG J, XIANG D, MEI S, et al. The novel long noncoding RNA Lnc19959.2 modulates triglyceride metabolism-associated genes through the interaction with Purb and hnRNPA2B1 [J]. *Molecular metabolism*. 2020, 37: 100996.
- [74] LI Y, SHEN S, DING S, et al. LincRNA DYN-LRB2-2 upregulates cholesterol efflux by decreasing TLR2 expression in macrophages [J]. *Journal of cellular biochemistry*. 2018, 119(2): 1911-1921.
- [75] YANG L, LI T. LncRNA TUG1 regulates ApoM to promote atherosclerosis progression through miR-92a/FXR1 axis [J]. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2020, 24(15): 8836-8848.
- [76] HUANG J, CHEN S, CAI D. Long noncoding RNA lncARSR promotes hepatic cholesterol biosynthesis via modulating Akt/SREBP-2/HMGCR pathway [J]. *Life sciences*. 2018, 203: 48-53.
- [77] CUI M, XIAO Z, WANG Y, et al. Long noncoding RNA HULC modulates abnormal lipid metabolism in hepatoma cells through an miR-9-mediated RXRA signaling pathway [J]. *Cancer research*. 2015, 75(5): 846-857.
- [78] LAN X, WU L, WU N, et al. Long Noncoding RNA lnc-HC Regulates PPAR γ -Mediated Hepatic Lipid Metabolism through miR-130b-3p [J]. *Molecular therapy. Nucleic acids*. 2019, 18: 954-965.

- [79] KUSMINSKI C M, SHETTY S, ORCI L, et al. Diabetes and apoptosis : lipotoxicity [J]. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2009, 14(12): 1484-1495.
- [80] KAKKAR A K, DAHIYA N. Drug treatment of obesity: current status and future prospects [J]. *European journal of internal medicine*. 2015, 26(2): 89-94.
- [81] TSILINGIRIS D, LIATIS S, DALAMAGA M, et al. The Fight Against Obesity Escalates: New Drugs on the Horizon and Metabolic Implications [J]. *Current obesity reports*. 2020, 9(2): 136-149.
- [82] BOUITBIR J, SANVEE G M, PANAJATOVIC M V, et al. Mechanisms of statin-associated skeletal muscle-associated symptoms [J]. *Pharmacological research*. 2020, 154: 104201.
- [83] VIRGIL B. Review of Clinical Studies of Fenofibrate in Combination with Currently Approved Lipid-Lowering Drugs [J]. *Cardiology*, 1989, 76(1):45-54.
- [84] GLASS C K, OLEFSKY J M. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance [J]. *Cell metabolism*. 2012, 15(5): 635-645.
- [85] TANGVARASITTICHA S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus [J]. *World journal of diabetes*. 2015, 6(3): 456-480.
- [86] STAPLETON K, DAS S, REDDY M A, et al. Novel Long Noncoding RNA, Macrophage Inflammation-Suppressing Transcript (MIST), Regulates Macrophage Activation During Obesity [J]. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2020, 40(4): 914-928.
- [87] ZHANG Y, SUN J, YAO H, et al. Ultraconserved element uc.333 increases insulin sensitivity by binding to miR-223 [J]. *Aging*. 2020, 12(8): 6667-6679.
- [88] LIU S, SHENG L, MIAO H, et al. SRA gene knockout protects against diet-induced obesity and improves glucose tolerance [J]. *The Journal of biological chemistry*. 2014, 289(19): 13000-13009.
- [89] KANWAL F, KRAMER J R, MAPAKSHI S, et al. Risk of Hepatocellular Cancer in Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease [J]. *Gastroenterology*. 2018, 155(6): 1828-1837.e2
- [90] LINDENMEYER C C, MCCULLOUGH A J. The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-An Evolving View [J]. *Clinics in liver disease*. 2018, 22(1): 11-21.
- [91] WANG X. Down-regulation of lncRNA-NEAT1 alleviated the non-alcoholic fatty liver disease via mTOR/S6K1 signaling pathway [J]. *Journal of cellular biochemistry*. 2018, 119(2): 1567-1574.
- [92] YAN C, CHEN J, CHEN N. Long noncoding RNA MALAT1 promotes hepatic steatosis and insulin resistance by increasing nuclear SREBP-1c protein stability [J]. *Scientific reports*. 2016, 6: 22640.
- [93] ZHAO X Y, XIONG X, LIU T, et al. Long noncoding RNA licensing of obesity-linked hepatic lipogenesis and NAFLD pathogenesis [J]. *Nature communications*. 2018, 9(1): 2986.

- [94] GISTERÅ A, KETELHUTH D. Lipid-driven immunometabolic responses in atherosclerosis [J]. *Current opinion in lipidology*. 2018, 29(5): 375-380.
- [95] YU X H, DENG W Y, CHEN J J, et al. LncRNA kcnq1ot1 promotes lipid accumulation and accelerates atherosclerosis via functioning as a ceRNA through the miR-452-3p/HDAC3/ABCA1 axis [J]. *Cell death & disease*. 2020, 11(12): 1043.
- [96] TABAS I, BORNFELDT K E. Intracellular and Intercellular Aspects of Macrophage Immunometabolism in Atherosclerosis [J]. *Circulation research*. 2020, 126(9): 1209-1227.
- [97] REDDY M A, CHEN Z, PARK J T, et al. Regulation of inflammatory phenotype in macrophages by a diabetes-induced long noncoding RNA [J]. *Diabetes*. 2014, 63(12): 4249-4261.
- [98] LIU G, ZHENG X, XU Y, et al. Long non-coding RNAs expression profile in HepG2 cells reveals the potential role of long non-coding RNAs in the cholesterol metabolism [J]. *Chinese medical journal*. 2015, 128(1): 91-97.
- [99] AMPOFO A G, BOATENG E B. Beyond 2020: Modelling obesity and diabetes prevalence [J]. *Diabetes research and clinical practice*. 2020, 167: 108362.
- [100] HARDING J L, PAVKOV M E, MAGLIANO D J, et al. Global trends in diabetes complications: a review of current evidence [J]. *Diabetologia*. 2019, 62(1): 3-16.
- [101] YAN B, TAO Z F, LI X M, et al. Aberrant expression of long noncoding RNAs in early diabetic retinopathy [J]. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014, 55(2): 941-951.
- [102] LIU J Y, YAO J, LI X M, et al. Pathogenic role of lncRNA-MALAT1 in endothelial cell dysfunction in diabetes mellitus [J]. *Cell death Diseases*. 2014, 5(10): e1506.
- [103] RADHAKRISHNAN R, KOWLURU R A. Long Noncoding RNA MALAT1 and Regulation of the Antioxidant Defense System in Diabetic Retinopathy [J]. *Diabetes*. 2021, 70(1): 227-239.
- [104] YAN B, YAO J, LIU J Y, et al. lncRNA-MIAT regulates microvascular dysfunction by functioning as a competing endogenous RNA [J]. *Circulation research*. 2015, 116(7): 1143-1156.
- [105] OPAZO-R L, MAS S, MARIN-R G, et al. Lipotoxicity and Diabetic Nephropathy: Novel Mechanistic Insights and Therapeutic Opportunities [J]. *International journal of molecular sciences*. 2020, 21(7): 2632.
- [106] LONG J, BADAL S S, YE Z, et al. Long noncoding RNA Tug1 regulates mitochondrial bioenergetics in diabetic nephropathy [J]. *The Journal of clinical investigation*. 2016, 126(11): 4205-4218.
- [107] ALVAREZ M L, DISTEFANO J K. Functional characterization of the plasmacytoma variant translocation 1 gene (PVT1) in diabetic nephropathy [J]. *PLoS One*. 2011, 6(4): e18671.

- [108] NAKAMURA M, SADOSHIMA J. Cardiomyopathy in obesity, insulin resistance and diabetes [J]. *The Journal of physiology*. 2020, 598(14): 2977-2993.
- [109] XU Y, FANG H, XU Q, et al. LncRNA GASS5 inhibits NLRP3 inflammasome activation-mediated pyroptosis in diabetic cardiomyopathy by targeting miR-34b-3p/AHR [J]. *Cell cycle*. 2020, 19(22): 3054-3065.
- [110] WANG C, LIU G, YANG H, et al. MALAT1-mediated recruitment of the histone methyltransferase EZH2 to the microRNA-22 promoter leads to cardiomyocyte apoptosis in diabetic cardiomyopathy [J]. *The Science of the total environment*. 2021, 766: 142191.
- [111] ARADI K, DI G A, DUCA M. Aminoglycoside Conjugation for RNA Targeting: Antimicrobials and Beyond [J]. *Chemistry : a European journal*. 2020, 26(54): 12273-12309.
- [112] JAVANMARD S H, VASEGHI G, GHASEMI A, et al. Therapeutic inhibition of microRNA-21 (miR-21) using locked-nucleic acid (LNA)-anti-miR and its effects on the biological behaviors of melanoma cancer cells in preclinical studies [J]. *Cancer cell international*. 2020, 20: 384.
- [113] AMODIO N, STAMATO M A, JULI G, et al. Drugging the lncRNA MALAT1 via LNA gapmeR ASO inhibits gene expression of proteasome subunits and triggers anti-multiple myeloma activity [J]. *Leukemia*. 2018, 32(9): 1948-1957.
- [114] CAFFREY D R, ZHAO J, SONG Z, et al. siRNA off-target effects can be reduced at concentrations that match their individual potency [J]. *PLoS One*. 2011, 6(7): e21503.
- [115] RINALDI C, WOOD M. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders [J]. *Nature reviews. Neurology*. 2018, 14(1): 9-21.
- [116] FU Y, SANDER J D, REYON D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. *Nature biotechnology*. 2014, 32(3): 279-284.
- [117] JIANG W, QU Y, YANG Q, et al. D-lnc: a comprehensive database and analytical platform to dissect the modification of drugs on lncRNA expression [J]. *RNA biology*. 2019, 16(11): 1586-1591.

附录一

LncRNA11 缺陷诱发 BAT 中表达变化的氧化磷酸化基因

Gene ID	Gene Name	WT1	WT2	WT3	KO1	KO2	KO3
ENSMUSG00000064351	mt-Co1	271744.07	337566.12	383131.33	1099882.72	1258802.70	894141.28
ENSMUSG00000020022	Ndufa12	4330.03	3688.82	5011.33	693.30	559.68	1448.77
ENSMUSG00000014294	Ndufa2	12127.92	9468.72	12769.70	1383.38	1117.32	3793.40
ENSMUSG00000064367	mt-Nd5	41042.94	48792.09	64962.60	344154.23	334054.71	97800.13
ENSMUSG00000020163	Uqcr11	19312.33	13901.09	18326.73	2497.79	1927.89	6598.09
ENSMUSG00000016252	Atp5e	20665.47	15891.23	22319.90	3170.73	2383.96	7759.86
ENSMUSG00000030884	Uqcrc2	5202.25	4205.00	5643.67	17542.41	15282.92	9492.47
ENSMUSG00000044894	Uqcrq	48648.83	34208.01	49556.23	7510.52	6016.27	19193.88
ENSMUSG00000040018	Cox15	295.31	290.58	277.49	1240.86	1066.53	503.32
ENSMUSG00000016427	Ndufa1	12513.75	8457.41	10786.01	2044.53	1540.89	4851.76
ENSMUSG00000061518	Cox5b	23497.91	16511.00	23394.79	4526.24	3410.88	10339.79
ENSMUSG00000036199	Ndufa13	11349.87	7833.25	10750.94	1556.97	1486.04	4881.30
ENSMUSG00000026032	Ndufb3	7890.23	6325.06	8684.72	2236.33	1745.05	4238.69
ENSMUSG00000025968	Ndufs1	3655.29	2927.70	4032.38	11453.84	10067.07	5330.81
ENSMUSG00000023089	Ndufa5	9881.54	8026.38	12038.33	2769.97	2307.78	5680.08
ENSMUSG00000035674	Ndufa3	8369.32	6152.12	9107.66	2285.62	2041.65	4575.30
ENSMUSG00000031818	Cox4i1	51478.52	44127.08	56859.69	14119.87	12610.50	30383.09
ENSMUSG00000055980	Irs1	24.69	46.53	13.41	461.84	865.42	110.79
ENSMUSG00000021606	Ndufs6	7396.52	4444.66	6640.16	1348.01	1111.23	3418.81
ENSMUSG00000003873	Bax	664.68	665.43	607.59	127.51	154.39	367.21
ENSMUSG00000002603	Tgfb1	924.34	1107.87	912.93	238.96	189.94	563.47
ENSMUSG00000020153	Ndufs7	13898.88	12262.11	14442.90	3333.60	3339.78	8266.35
ENSMUSG00000036751	Cox6b1	29285.30	24161.65	30182.47	9248.58	7964.47	17435.93
ENSMUSG00000074218	Cox7a1	14723.56	10538.85	14738.95	3398.97	2596.25	7844.27
ENSMUSG00000026895	Ndufa8	8006.35	6342.62	8733.20	2467.79	2003.05	4700.86
ENSMUSG00000033938	Ndufb7	10223.48	7726.15	10348.63	1913.80	1616.05	5514.41
ENSMUSG00000059201	Lep	93.26	152.75	406.44	801.52	825.80	608.84
ENSMUSG00000027398	Il1b	8.23	44.77	70.15	2.14	2.03	5.28
ENSMUSG00000035885	Cox8a	26777.43	19381.64	25022.59	8808.17	7234.15	14906.65
ENSMUSG00000017778	Cox7c	18294.74	14817.59	22344.66	6965.10	5847.65	11646.11
ENSMUSG00000022812	Gsk3b	483.65	582.91	640.60	1906.29	1677.00	737.58
ENSMUSG00000041881	Ndufa7	6269.22	4997.72	6535.98	2004.88	1837.49	3940.07
ENSMUSG00000041697	Cox6a1	54582.50	41711.18	53402.92	19815.18	17104.16	33492.73
ENSMUSG00000022820	Ndufb4	7092.98	5948.46	8320.58	3010.00	2662.27	4746.24
ENSMUSG00000025488	Cox8b	52038.06	31767.53	49309.68	12398.95	9662.80	28296.99
ENSMUSG00000002416	Ndufb2	1039.54	616.27	832.47	184.31	204.17	521.26

ENSMUSG00000022450	Ndufa6	11928.61	8538.18	11535.96	3329.32	2474.36	7087.70
ENSMUSG00000059534	Uqcr10	18275.54	13035.51	17895.53	5999.63	5011.69	11226.15
ENSMUSG00000022383	Ppara	295.31	403.82	322.88	2671.38	3083.81	549.75
ENSMUSG00000025746	Ii6	0.91	8.78	35.07	0.00	0.00	0.00
ENSMUSG00000022354	Ndufb9	11470.55	8359.97	10771.57	3043.21	2704.93	7275.52
ENSMUSG00000064358	mt-Co3	50059.56	59056.16	46731.81	25192.24	7302.20	28824.58
ENSMUSG00000024401	Tnf	21.03	52.67	45.39	3.21	1.02	13.72
ENSMUSG00000014313	Cox6c	35096.46	26920.80	37560.20	11354.19	10734.41	25088.16
ENSMUSG00000031059	Ndufb11	13513.06	9163.22	12957.45	4431.95	3974.62	8863.58
ENSMUSG00000025408	Ddit3	588.80	529.36	487.93	148.95	173.69	397.81
ENSMUSG00000002379	Ndufa11	5066.02	3586.98	5209.39	1505.53	1380.40	3553.87
ENSMUSG00000051811	Cox6b2	127.08	90.42	112.44	34.29	38.60	70.70
ENSMUSG00000057722	Lepr	0.91	0.88	0.00	17.14	18.28	1.06

附录二

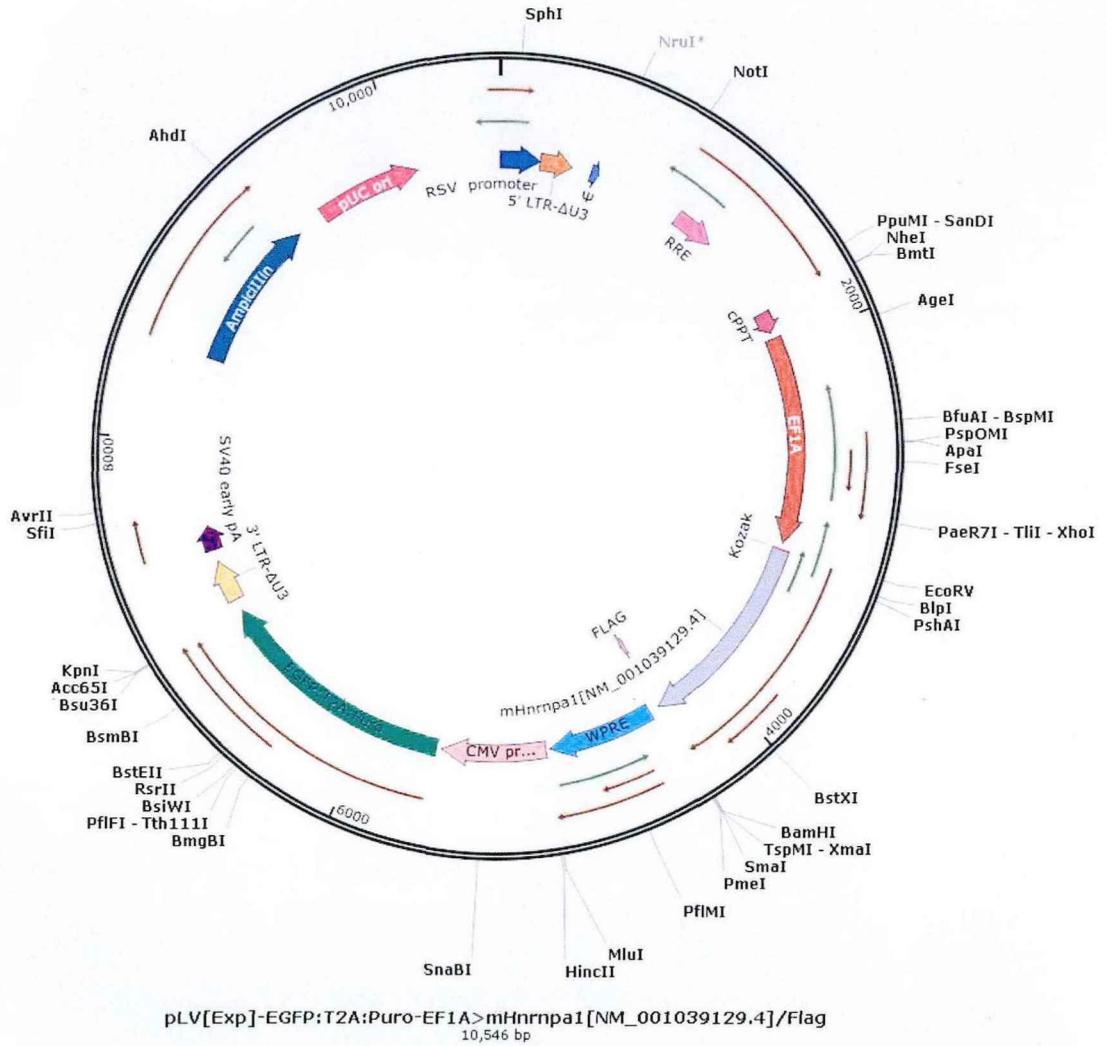
LncRNA11 缺陷诱发 BAT 中表达变化的产热基因

Gene ID	Gene Name	WT1	WT2	WT3	KO1	KO2	KO3
ENSMUSG00000064351	mt-Co1	1099882.72	1258802.70	894141.28	271744.07	337566.12	383131.33
ENSMUSG00000020022	Ndufa12	693.30	559.68	1448.77	4330.03	3688.82	5011.33
ENSMUSG00000022220	Adcy4	290.39	251.91	518.10	1486.62	2196.43	1201.77
ENSMUSG00000024921	Smarca2	810.09	924.33	696.42	269.71	258.97	304.31
ENSMUSG00000014294	Ndufa2	1383.38	1117.32	3793.40	12127.92	9468.72	12769.70
ENSMUSG00000028518	Prkaa2	999.76	917.22	303.89	138.97	109.73	156.80
ENSMUSG00000024900	Cpt1a	487.56	406.30	403.08	170.06	138.70	127.91
ENSMUSG00000064367	mt-Nd5	344154.23	334054.71	97800.13	41042.94	48792.09	64962.60
ENSMUSG00000020163	Uqcr11	2497.79	1927.89	6598.09	19312.33	13901.09	18326.73
ENSMUSG00000026567	Adcy10	242.17	140.17	48.54	10.97	6.15	22.69
ENSMUSG00000016252	Atp5e	3170.73	2383.96	7759.86	20665.47	15891.23	22319.90
ENSMUSG00000030884	Uqcr2	17542.41	15282.92	9492.47	5202.25	4205.00	5643.67
ENSMUSG00000044894	Uqcrq	7510.52	6016.27	19193.88	48648.83	34208.01	49556.23
ENSMUSG00000018932	Map2k3	720.08	738.45	623.62	1332.11	1529.25	1752.62
ENSMUSG00000040018	Cox15	1240.86	1066.53	503.32	295.31	290.58	277.49
ENSMUSG00000016427	Ndufa1	2044.53	1540.89	4851.76	12513.75	8457.41	10786.01
ENSMUSG00000005580	Adcy9	636.50	820.72	190.99	154.51	97.44	104.19
ENSMUSG00000061518	Cox5b	4526.24	3410.88	10339.79	23497.91	16511.00	23394.79
ENSMUSG00000029195	Klb	668.65	741.50	200.49	151.77	129.92	116.57
ENSMUSG00000036199	Ndufa13	1556.97	1486.04	4881.30	11349.87	7833.25	10750.94
ENSMUSG00000052920	Prkg1	81.44	94.46	16.88	9.14	3.51	5.16
ENSMUSG00000022840	Adcy5	360.04	382.94	121.35	70.40	88.67	40.23
ENSMUSG00000027523	Gnas	3344.32	3063.49	1791.71	1035.88	1207.07	1148.13
ENSMUSG00000018796	Acs11	48810.36	39198.68	22444.91	14590.99	13815.06	15337.26
ENSMUSG00000026032	Ndufb3	2236.33	1745.05	4238.69	7890.23	6325.06	8684.72
ENSMUSG00000025968	Ndufs1	11453.84	10067.07	5330.81	3655.29	2927.70	4032.38
ENSMUSG00000078937	Cpt1b	56.79	20.31	49.59	165.48	195.77	113.47
ENSMUSG00000023089	Ndufa5	2769.97	2307.78	5680.08	9881.54	8026.38	12038.33
ENSMUSG00000035674	Ndufa3	2285.62	2041.65	4575.30	8369.32	6152.12	9107.66
ENSMUSG00000032883	Acs13	888.32	575.93	327.11	197.48	208.93	223.85
ENSMUSG00000024981	Acs15	6566.48	5386.50	3295.35	2420.10	1511.69	2254.99
ENSMUSG00000031818	Cox4i1	14119.87	12610.50	30383.09	51478.52	44127.08	56859.69
ENSMUSG00000021606	Ndufs6	1348.01	1111.23	3418.81	7396.52	4444.66	6640.16
ENSMUSG00000020153	Ndufs7	3333.60	3339.78	8266.35	13898.88	12262.11	14442.90
ENSMUSG00000036751	Cox6b1	9248.58	7964.47	17435.93	29285.30	24161.65	30182.47
ENSMUSG00000023020	Cox14	993.33	816.66	1754.78	2831.52	2623.96	2953.36

ENSMUSG00000074218	Cox7a1	3398.97	2596.25	7844.27	14723.56	10538.85	14738.95
ENSMUSG00000026895	Ndufa8	2467.79	2003.05	4700.86	8006.35	6342.62	8733.20
ENSMUSG00000033938	Ndufb7	1913.80	1616.05	5514.41	10223.48	7726.15	10348.63
ENSMUSG00000035885	Cox8a	8808.17	7234.15	14906.65	26777.43	19381.64	25022.59
ENSMUSG00000024830	Rps6kb2	166.09	149.31	264.85	488.23	496.88	367.24
ENSMUSG00000017778	Cox7c	6965.10	5847.65	11646.11	18294.74	14817.59	22344.66
ENSMUSG00000005034	Prkacb	1552.68	1555.11	742.85	493.71	486.34	668.45
ENSMUSG000000041881	Ndufa7	2004.88	1837.49	3940.07	6269.22	4997.72	6535.98
ENSMUSG00000050856	Atp5k	2086.32	1515.49	4305.17	7705.55	5288.30	7355.04
ENSMUSG00000038690	Atp5j2	7553.38	6073.15	15715.98	26267.26	18821.56	27844.95
ENSMUSG00000029580	Actb	5852.83	6564.77	11355.94	12684.72	19662.56	21676.21
ENSMUSG000000041697	Cox6a1	19815.18	17104.16	33492.73	54582.50	41711.18	53402.92
ENSMUSG00000023809	Rps6ka2	203.60	207.21	187.82	96.91	89.54	102.12
ENSMUSG00000022820	Ndufb4	3010.00	2662.27	4746.24	7092.98	5948.46	8320.58
ENSMUSG00000025488	Cox8b	12398.95	9662.80	28296.99	52038.06	31767.53	49309.68
ENSMUSG00000020654	Adcy3	2378.85	1707.47	345.05	189.26	207.18	194.97
ENSMUSG00000002416	Ndufb2	184.31	204.17	521.26	1039.54	616.27	832.47
ENSMUSG00000022450	Ndufa6	3329.32	2474.36	7087.70	11928.61	8538.18	11535.96
ENSMUSG00000053137	Mapk11	23.57	28.44	118.18	202.97	319.55	153.70
ENSMUSG00000022956	Atp5o	3520.06	3108.18	6761.65	10900.96	7908.74	10930.43
ENSMUSG00000059534	Uqcr10	5999.63	5011.69	11226.15	18275.54	13035.51	17895.53
ENSMUSG00000027230	Creb3l1	67.51	49.77	82.30	128.00	186.11	156.80
ENSMUSG00000065947	mt-Nd4l	5757.46	4647.04	522.32	167.31	162.41	509.59
ENSMUSG00000034801	Sos2	1278.36	1218.90	619.40	456.23	462.64	574.58
ENSMUSG00000022354	Ndufb9	3043.21	2704.93	7275.52	11470.55	8359.97	10771.57
ENSMUSG00000064358	mt-Co3	25192.24	7302.20	28824.58	50059.56	59056.16	46731.81
ENSMUSG00000003072	Atp5d	8102.02	7037.09	15001.61	23138.59	17047.38	21273.90
ENSMUSG00000058881	Zfp516	208.95	210.26	140.34	81.37	89.54	103.16
ENSMUSG00000014313	Cox6c	11354.19	10734.41	25088.16	35096.46	26920.80	37560.20
ENSMUSG00000022610	Mapk12	221.81	233.62	444.23	757.94	802.37	422.94
ENSMUSG00000031059	Ndufb11	4431.95	3974.62	8863.58	13513.06	9163.22	12957.45
ENSMUSG00000034566	Atp5h	5386.70	5079.75	11298.96	15751.21	12061.95	16869.13
ENSMUSG00000021536	Adcy2	21.43	35.55	14.77	6.40	1.76	3.09
ENSMUSG00000002379	Ndufa11	1505.53	1380.40	3553.87	5066.02	3586.98	5209.39
ENSMUSG00000051811	Cox6b2	34.29	38.60	70.70	127.08	90.42	112.44
ENSMUSG00000030584	Dpfl	2.14	4.06	0.00	10.06	22.82	9.28

附录三

hnRNPA1 真核表达质粒图谱



附录四

过表达 hmRNPA1 诱发表达变化的产热基因

Gene ID	Gene Name	CD1	CD2	CD3	OE-D1	OE-D2	OE-D3
ENSMUSG00000038717	Atp5l	2476.35	1985.41	1865.40	3726.21	10109.14	13205.71
ENSMUSG00000050856	Atp5k	701.87	523.52	504.57	984.01	2861.92	2809.19
ENSMUSG00000038690	Atp5j2	4516.33	3674.12	3707.83	5981.91	17386.97	17659.55
ENSMUSG00000016427	Ndufa1	813.87	700.33	725.48	1211.22	2426.34	1884.72
ENSMUSG00000026032	Ndufb3	1527.33	1424.80	1376.74	2074.29	5043.39	4106.44
ENSMUSG00000032330	Cox7a2	2909.84	2539.98	2489.27	3695.06	8920.11	7478.85
ENSMUSG00000040048	Ndufb10	3265.12	2491.68	2717.25	3541.14	9401.61	8968.85
ENSMUSG00000041881	Ndufa7	2561.31	2084.59	1983.81	2732.13	6968.21	5993.47
ENSMUSG00000048351	Coa7	415.14	394.15	379.97	487.42	990.08	1056.04
ENSMUSG00000027673	Ndufb5	2361.47	2257.95	2068.64	2558.05	5695.59	5160.18
ENSMUSG00000021520	Uqcrb	1184.59	1575.73	1266.28	2372.97	6538.51	6392.80
ENSMUSG00000091803	Cox16	167.02	144.03	160.83	282.19	627.48	737.50
ENSMUSG00000063882	Uqcrh	3882.03	3404.17	3212.98	4963.09	15894.20	18220.47
ENSMUSG00000036751	Cox6b1	4035.54	3580.98	3578.82	5345.15	13279.51	13134.16
ENSMUSG00000036199	Ndufa13	2733.16	1887.09	1853.03	2910.79	8664.64	7744.30
ENSMUSG00000071014	Ndufb6	1274.38	979.77	1039.18	1452.19	3892.03	3630.94
ENSMUSG00000022354	Ndufb9	1937.64	1681.82	1726.67	2126.51	6206.52	5843.43
ENSMUSG00000028495	Rps6	17641.48	15186.38	15143.25	19571.99	43566.91	42410.17
ENSMUSG00000027384	Ndufaf5	403.55	366.55	334.02	461.77	970.06	911.77
ENSMUSG00000009863	Sdhb	5263.58	4590.07	4435.96	5351.56	11791.45	11625.69
ENSMUSG00000023089	Ndufa5	1631.59	1545.55	1496.03	2559.88	8064.24	8771.49
ENSMUSG00000034566	Atp5h	4294.28	3737.95	3830.66	5682.31	19770.92	23487.98
ENSMUSG00000017778	Cox7c	4230.56	3899.23	3662.76	5503.65	17702.48	16522.72
ENSMUSG00000014313	Cox6c	4677.56	4228.69	4107.24	5985.57	15910.69	14904.61
ENSMUSG00000030869	Ndufab1	1358.37	1181.58	1348.46	1731.63	4239.32	4813.93
ENSMUSG00000029334	Prkg2	113.92	210.44	215.61	386.64	392.03	649.78
ENSMUSG00000000088	Cox5a	1890.33	1448.95	1648.91	2140.26	5111.67	4938.58
ENSMUSG00000025665	Rps6ka6	43.44	81.07	98.97	160.34	171.88	237.75
ENSMUSG00000024248	Cox7a2l	5763.68	5226.57	5036.85	5844.48	15448.02	14763.81
ENSMUSG00000041697	Cox6a1	12675.26	8482.40	9372.08	11402.18	25296.99	24691.75
ENSMUSG00000033938	Ndufb7	1306.24	1024.62	1024.16	1813.17	5862.76	6534.76
ENSMUSG00000029632	Ndufa4	4283.66	3924.24	3907.54	6441.84	15628.14	14524.90
ENSMUSG00000021764	Ndufs4	2493.73	2266.57	2259.51	3241.54	9572.31	10192.24
ENSMUSG00000002416	Ndufb2	129.37	146.62	151.99	214.39	556.84	532.06
ENSMUSG00000044894	Uqcrq	6229.02	4954.03	4944.07	7127.17	19168.17	18533.24
ENSMUSG00000031059	Ndufb11	3264.15	2494.26	2497.22	3681.32	8889.50	8492.19
ENSMUSG00000006057	Atp5g1	2145.21	1599.88	1923.72	2657.00	5271.78	4196.47
ENSMUSG00000021606	Ndufs6	874.69	569.23	545.22	887.80	2506.39	1509.62

ENSMUSG00000081406	Rps6-ps4	848.62	763.29	729.90	929.03	1923.64	1966.66
ENSMUSG00000005510	Ndufs3	4549.15	3543.03	3828.89	4144.00	10202.15	10112.61
ENSMUSG00000014294	Ndufa2	2016.80	1517.95	1405.02	2631.34	9687.68	9125.81
ENSMUSG00000016252	Atp5e	297.36	230.28	236.82	373.81	1277.33	1706.98
ENSMUSG00000035674	Ndufa3	815.80	668.41	552.29	1082.04	2650.01	2275.97
ENSMUSG00000068184	Ndufaf2	204.67	227.69	197.06	314.26	771.11	694.79
ENSMUSG00000020163	Uqcr11	1834.34	1331.65	1260.98	2224.55	5332.99	4022.19
ENSMUSG00000024099	Ndufv2	6096.75	5857.90	5670.44	6997.07	20446.67	21902.19
ENSMUSG00000002379	Ndufa11	1572.70	1216.95	1244.19	1612.52	4105.11	4487.31
ENSMUSG00000000563	Atp5f1	7408.79	7758.79	7753.22	9523.04	18116.87	18282.79
ENSMUSG00000022956	Atp5o	3830.87	3334.31	3353.48	4257.61	9213.25	7567.72
ENSMUSG00000074218	Cox7a1	109.09	78.48	71.58	103.53	246.05	214.67
ENSMUSG00000064368	mt-Nd6	41817.06	42023.02	45742.57	65170.65	223500.69	291937.20
ENSMUSG00000031231	Cox7b	2776.61	3042.80	2826.82	4650.66	10534.13	9468.60
ENSMUSG00000037152	Ndufc1	1079.36	956.48	911.94	1397.21	3996.80	3626.32
ENSMUSG00000028648	Ndufs5	1182.66	940.96	960.54	1410.96	3611.84	3844.45
ENSMUSG00000030647	Ndufc2	3614.61	2966.04	3004.44	3739.95	13217.11	13954.75
ENSMUSG00000023020	Cox14	3729.49	2844.43	2892.21	4355.64	10089.13	8128.63
ENSMUSG00000031818	Cox4i1	11858.50	8635.06	8818.91	11535.95	32115.69	30813.33
ENSMUSG00000064360	mt-Nd3	83.03	68.14	56.55	98.03	194.25	246.99
ENSMUSG00000017188	Coa3	953.85	721.89	820.92	996.83	2110.83	1942.42
ENSMUSG00000009876	Cox4i2	3.86	5.17	2.65	10.99	24.72	21.93

附录五

过表达 hnRNPA1 诱发表达变化的氧化磷酸化基因

Gene ID	Gene Name	CD1	CD2	CD3	OE-D1	OE-D2	OE-D3
ENSMUSG00000038717	Atp5l	2476.35	1985.41	1865.40	3726.21	10109.14	13205.71
ENSMUSG00000050856	Atp5k	701.87	523.52	504.57	984.01	2861.92	2809.19
ENSMUSG00000063882	Uqcrh	3882.03	3404.17	3212.98	4963.09	15894.20	18220.47
ENSMUSG00000036751	Cox6b1	4035.54	3580.98	3578.82	5345.15	13279.51	13134.16
ENSMUSG00000030869	Ndufab1	1358.37	1181.58	1348.46	1731.63	4239.32	4813.93
ENSMUSG00000031059	Ndufb11	3264.15	2494.26	2497.22	3681.32	8889.50	8492.19
ENSMUSG00000006057	Atp5g1	2145.21	1599.88	1923.72	2657.00	5271.78	4196.47
ENSMUSG00000000563	Atp5f1	7408.79	7758.79	7753.22	9523.04	18116.87	18282.79
ENSMUSG00000041697	Cox6a1	12675.26	8482.40	9372.08	11402.18	25296.99	24691.75
ENSMUSG00000021520	Uqcrb	1184.59	1575.73	1266.28	2372.97	6538.51	6392.80
ENSMUSG00000034566	Atp5h	4294.28	3737.95	3830.66	5682.31	19770.92	23487.98
ENSMUSG00000017778	Cox7c	4230.56	3899.23	3662.76	5503.65	17702.48	16522.72
ENSMUSG00000014313	Cox6c	4677.56	4228.69	4107.24	5985.57	15910.69	14904.61
ENSMUSG00000044894	Uqcrq	6229.02	4954.03	4944.07	7127.17	19168.17	18533.24
ENSMUSG00000024099	Ndufv2	6096.75	5857.90	5670.44	6997.07	20446.67	21902.19
ENSMUSG00000002379	Ndufa11	1572.70	1216.95	1244.19	1612.52	4105.11	4487.31
ENSMUSG00000064360	mt-Nd3	83.03	68.14	56.55	98.03	194.25	246.99
ENSMUSG00000005510	Ndufs3	4549.15	3543.03	3828.89	4144.00	10202.15	10112.61
ENSMUSG00000023089	Ndufa5	1631.59	1545.55	1496.03	2559.88	8064.24	8771.49
ENSMUSG00000029632	Ndufa4	4283.66	3924.24	3907.54	6441.84	15628.14	14524.90
ENSMUSG00000021764	Ndufs4	2493.73	2266.57	2259.51	3241.54	9572.31	10192.24
ENSMUSG00000002416	Ndufb2	129.37	146.62	151.99	214.39	556.84	532.06
ENSMUSG00000020163	Uqcr11	1834.34	1331.65	1260.98	2224.55	5332.99	4022.19
ENSMUSG00000040048	Ndufb10	3265.12	2491.68	2717.25	3541.14	9401.61	8968.85
ENSMUSG00000031818	Cox4i1	11858.50	8635.06	8818.91	11535.95	32115.69	30813.33
ENSMUSG00000024248	Cox7a2l	5763.68	5226.57	5036.85	5844.48	15448.02	14763.81
ENSMUSG00000074218	Cox7a1	109.09	78.48	71.58	103.53	246.05	214.67
ENSMUSG00000033938	Ndufb7	1306.24	1024.62	1024.16	1813.17	5862.76	6534.76
ENSMUSG00000016252	Atp5e	297.36	230.28	236.82	373.81	1277.33	1706.98
ENSMUSG00000035674	Ndufa3	815.80	668.41	552.29	1082.04	2650.01	2275.97
ENSMUSG00000028648	Ndufs5	1182.66	940.96	960.54	1410.96	3611.84	3844.45
ENSMUSG00000030647	Ndufc2	3614.61	2966.04	3004.44	3739.95	13217.11	13954.75
ENSMUSG00000022354	Ndufb9	1937.64	1681.82	1726.67	2126.51	6206.52	5843.43
ENSMUSG00000041881	Ndufa7	2561.31	2084.59	1983.81	2732.13	6968.21	5993.47
ENSMUSG00000022956	Atp5o	3830.87	3334.31	3353.48	4257.61	9213.25	7567.72
ENSMUSG00000009876	Cox4i2	3.86	5.17	2.65	10.99	24.72	21.93
ENSMUSG00000014294	Ndufa2	2016.80	1517.95	1405.02	2631.34	9687.68	9125.81

ENSMUSG00000031231	Cox7b	2776.61	3042.80	2826.82	4650.66	10534.13	9468.60
ENSMUSG00000037152	Ndufc1	1079.36	956.48	911.94	1397.21	3996.80	3626.32
ENSMUSG00000026032	Ndufb3	1527.33	1424.80	1376.74	2074.29	5043.39	4106.44
ENSMUSG00000032330	Cox7a2	2909.84	2539.98	2489.27	3695.06	8920.11	7478.85
ENSMUSG00000000088	Cox5a	1890.33	1448.95	1648.91	2140.26	5111.67	4938.58
ENSMUSG00000021114	Atp6v1d	1007.92	1033.24	1052.44	1325.75	2512.28	2621.06
ENSMUSG00000027673	Ndufb5	2361.47	2257.95	2068.64	2558.05	5695.59	5160.18
ENSMUSG00000064368	mt-Nd6	41817.06	42023.02	45742.57	65170.65	223500.69	291937.20
ENSMUSG00000038690	Atp5j2	4516.33	3674.12	3707.83	5981.91	17386.97	17659.55
ENSMUSG00000016427	Ndufa1	813.87	700.33	725.48	1211.22	2426.34	1884.72
ENSMUSG00000036199	Ndufa13	2733.16	1887.09	1853.03	2910.79	8664.64	7744.30
ENSMUSG00000071014	Ndufb6	1274.38	979.77	1039.18	1452.19	3892.03	3630.94
ENSMUSG00000028013	Ppa2	849.59	676.18	794.41	1046.31	2088.46	2230.96
ENSMUSG00000021606	Ndufs6	874.69	569.23	545.22	887.80	2506.39	1509.62
ENSMUSG00000009863	Sdhd	5263.58	4590.07	4435.96	5351.56	11791.45	11625.69