

## 基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003432

RNA m<sup>6</sup>A 甲基化修饰在脂肪细胞胰岛素抵抗中的作用机制叶隸文<sup>1</sup>, 张炳杨<sup>2</sup>, 张丹彤<sup>3</sup>, 马万山<sup>3</sup>, 逯素梅<sup>3</sup>

(1. 潍坊医学院医学检验学院, 潍坊 261000; 2. 山东大学齐鲁医学院, 济南 250000; 3. 山东第一医科大学第一附属医院/山东省千佛山医院检验医学, 山东省医药卫生临床检验诊断学重点实验室, 济南 250000)

**【摘要】目的:**探讨 RNA m<sup>6</sup>A 甲基化修饰在脂肪细胞胰岛素抵抗中的作用及机制。**方法:**收集 2 型糖尿病患者术中赘余皮下脂肪组织, 以非 2 型糖尿病患者同样组织为对照, 检测组间 RNA m<sup>6</sup>A 水平。高脂饮食诱导 C57BL/6J 小鼠构建胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 模型 (HFD 组,  $n=5$ , 60% 高脂饲料喂养 16 周), 对照组 10% 低脂饲料喂养 16 周 (CD 组,  $n=5$ )。模型构建成功后, 取附睾周围脂肪组织行表观转录组学 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰芯片检测, 并借助 MeRIP-qPCR 实验、RT-qPCR 以及 RNA 结合蛋白免疫沉淀测定 (RNA Binding Protein Immunoprecipitation Assay, RIP) 实验验证胰岛素信号转导相关基因变化; 进一步观察 METTL3 小分子抑制剂 STM2457 对高脂饮食诱导下小鼠胰岛素信号转导基因的影响。**结果:**2 型糖尿病患者和小鼠 IR 模型脂肪组织中总体 m<sup>6</sup>A 修饰水平均升高 (患者 200 ng RNA  $t=-8.375$ ,  $P<0.001$ ; 患者 100 ng RNA  $t=-3.722$ ,  $P=0.006$ ; 患者 50 ng RNA  $t=-4.937$ ,  $P=0.001$ ; 小鼠 100 ng RNA  $t=-3.590$ ,  $P=0.023$ ; 小鼠 50 ng RNA  $t=-2.760$ ,  $P=0.025$ )。表观转录组学检测证实 IR 的脂肪组织中 1 175 个基因发生高 m<sup>6</sup>A 修饰, 55 个基因发生低 m<sup>6</sup>A 修饰, 同时有 182 个基因呈现高 m<sup>6</sup>A 修饰且低表达, 包括 *AKT2*、*INSR*、*PIK3R1*、*ACACA*、*SREBF1* 等 5 个胰岛素信号转导关键基因, 其中 *AKT2*、*INSR*、*ACACA*、*SREBF1* 等 4 个基因被确证并证实其与 METTL3 存在直接结合, 其 m<sup>6</sup>A 修饰水平受 METTL3 正向调控。STM2457 作用下, 胰岛素敏感性提高, 且 *AKT2*、*INSR*、*ACACA*、*SREBF1* 转录水平上调, 提示 IR 表型改善明显。**结论:**高脂饮食通过 METTL3 诱导脂肪细胞胰岛素信号转导基因 *AKT2*、*INSR*、*ACACA*、*SREBF1* 发生 m<sup>6</sup>A 高甲基化修饰, 诱导其低表达, 阻滞胰岛素信号转导, 进而参与诱发 IR。

**【关键词】**高脂饮食; 胰岛素抵抗; RNA m<sup>6</sup>A 甲基化修饰; 胰岛素信号转导通路**【中图分类号】**R34**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2023-09-26The role of RNA m<sup>6</sup>A methylation in insulin resistance in adipocytesYe Diwen<sup>1</sup>, Zhang Bingyang<sup>2</sup>, Zhang Dantong<sup>3</sup>, Ma Wanshan<sup>3</sup>, Lu Sumei<sup>3</sup>

(1. School of Medical Laboratory, Weifang Medical University; 2. Cheeloo College of Medicine, Shandong University; 3. Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University/Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Shandong Provincial Medicine and Health Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics)

**【Abstract】Objective:** To explore the role of RNA m<sup>6</sup>A methylation in insulin resistance in adipocytes. **Methods:** We collected redundant subcutaneous adipose tissue samples from patients with type 2 diabetes and patients without type 2 diabetes to measure the RNA m<sup>6</sup>A modification level. A insulin resistance (IR) model was established by feeding C57BL/6J mice with a 60% high-fat diet for 16 weeks ( $n=5$ ), while the control group was fed with a 10% low-fat diet for 16 weeks ( $n=5$ ). After successful modeling, the adipose tissue around the epididymis was taken to detect m<sup>6</sup>A methylation using epitranscriptomic microarrays. The changes in insulin signaling-related genes were determined by MeRIP-qPCR assay, RT-qPCR, and RIP assay. The effects of the small-molecule inhibitor STM2457 targeting methyltransferase like 3 (METTL3) on insulin signaling-related genes in mice feeding a high-fat diet were investigated. **Results:** The overall m<sup>6</sup>A modification levels were significantly increased in the adipose tissue of patients with type 2 diabetes and IR mice (patients 200 ng RNA,  $t=-8.375$ ,  $P<0.001$ ; patients 100 ng RNA,  $t=-3.722$ ,  $P=0.006$ ; patients 50 ng RNA,  $t=-4.937$ ,  $P=0.001$ ; mice 100 ng RNA,  $t=-3.590$ ,  $P=0.023$ ; mice 50 ng RNA,  $t=-2.760$ ,  $P=0.025$ ). The epitranscriptomic assay detected high m<sup>6</sup>A methylation levels in 1 175 genes and low m<sup>6</sup>A methylation levels in

作者介绍: 叶隸文, Email: ydw123@outlook.com,

研究方向: 临床检验诊断学。

通信作者: 逯素梅, Email: lsmqianyi@126.com。

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (编号: ZR2023MH031);

山东第一医科大学青年科学基金培育资助计划项目 (编号: 202201-083)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240206.1105.028>

(2024-02-09)

55 genes; 182 genes showed significantly high m<sup>6</sup>A modification and low expression, including five key insulin signaling-related genes (*AKT2*, *INSR*, *PIK3R1*, *ACACA*, and *SREBF1*). Direct binding between *AKT2*, *INSR*, *ACACA*, and *SREBF1* and *METTL3* was validated, and their m<sup>6</sup>A modification levels were positively regulated by *METTL3*. STM2457 significantly increased insulin sensitivity, and significantly upregulated the transcriptional levels of *AKT2*, *INSR*, *ACACA*, and *SREBF1*, suggesting a significant improvement in IR phenotype. **Conclusion:** High-fat diet induces IR through *METTL3*, which mediates m<sup>6</sup>A hypermethylation of *AKT2*, *INSR*, *ACACA*, and *SREBF1* to downregulate their expression and block insulin signaling in adipocytes.

**[Key words]** high-fat diet; insulin resistance; RNA m<sup>6</sup>A methylation; insulin signaling pathway

2型糖尿病(type 2 diabetes, T2DM)是最常见的慢性代谢性疾病之一,困扰着人的健康和安全,严重影响生活质量,增加经济负担<sup>[1-2]</sup>。T2DM发病主要病因是胰岛素调控葡萄糖代谢能力的下降,又称胰岛素抵抗(insulin resistance, IR),同时伴随胰岛β细胞功能缺陷所导致的胰岛素分泌相对减少<sup>[3-4]</sup>。其中IR是T2DM的核心机制,胰岛素信号转导异常是IR的关键环节<sup>[3,5-7]</sup>。因此,越来越多的研究从胰岛素信号转导通路入手,对T2DM的发病机制进行研究。

近年来, RNA的m<sup>6</sup>A甲基化修饰在IR和T2DM中的作用引起了广泛关注。RNA的m<sup>6</sup>A甲基化修饰是一种广泛存在于RNA上的碱基修饰行为,影响RNA的翻译效率、稳定性、可变剪接、转运和定位等<sup>[8-9]</sup>。已有文献报道,肥胖者与健康个体相比较,不同部位组织m<sup>6</sup>A甲基化水平有差异,例如肝<sup>[10-12]</sup>、脂肪<sup>[13-14]</sup>、心脏<sup>[15-16]</sup>、空肠<sup>[17]</sup>、动脉组织<sup>[18]</sup>以及巨噬细胞<sup>[19]</sup>等。但差异趋势因组织类型有别,其中对于m<sup>6</sup>A甲基化修饰在脂肪组织中的作用尚不够明确:大部分学者认为高脂组m<sup>6</sup>A修饰整体水平升高<sup>[20-21]</sup>,但也有学者等认为,高脂饮食诱导m<sup>6</sup>A修饰降低,脂肪量和肥胖相关基因(Fat Mass and Obesity-associated Protein, FTO)表达增加<sup>[22]</sup>。总之,高脂饮食诱导下,脂肪组织m<sup>6</sup>A修饰变化和具体功能尚存争议,关于m<sup>6</sup>A修饰在胰岛素敏感性中的作用尚待厘清,尤其是围绕白色脂肪组织的胰岛素抵抗,国内外少见报道。

本研究旨在建立高脂饮食诱导的小鼠IR模型中,脂肪组织mRNA m<sup>6</sup>A甲基化修饰图谱;围绕胰岛素信号转导通路,筛选并验证发生m<sup>6</sup>A修饰的主要差异基因,并明确调控该差异基因m<sup>6</sup>A修饰的甲基转移酶,为m<sup>6</sup>A甲基化修饰作为IR的新型诊疗靶

点提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 临床标本纳入标准及知情同意 收集2020年12月至2021年12月,因良性病变在山东第一医科大学第一附属医院(山东省千佛山医院)就医,且需行手术治疗的患者术中赘余皮下脂肪组织样本(5例T2DM患者,5例非T2DM患者)。纳入标准:①空腹血糖≥7.0 mmol/L;②餐后2 h血糖≥11.1 mmol/L或随机血糖≥11.1 mmol/L;③伴有糖尿病典型的“三多一少”症状,即多饮、多尿、多食、体质量减轻。满足上述3点的任何2项,可纳入本研究,视为患有T2DM。排除标准:①肝肾功能不全患者(血肌酐、尿素氮超过正常值范围的1.2倍);②拟怀孕、怀孕或哺乳期的女性;③有滥用药物、毒品或酗酒史者;④主要脏器外科手术术后未滿6周患者,手术伤口愈合不良患者;⑤有免疫缺陷病史,包括人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)检测阳性或患有其他获得性、先天性免疫缺陷疾病,或有器官移植史者;⑥不愿意参与实验者。本研究符合山东第一医科大学第一附属医院(山东省千佛山医院)伦理委员会所制定的伦理学标准,于入试前获得患者知情同意,批准号:[2022]伦审字(S079)号。

1.1.2 实验动物 6~8周龄C57BL/6J雄性小鼠,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物许可证号SCXK(京)2021-0006,本研究符合山东第一医科大学第一附属医院/山东省千佛山医院伦理委员会所制定的伦理学标准,动物伦理批准号:[2021]动伦审字(S1031)号。

1.1.3 细胞株 实验使用细胞株为3T3-L1脂肪前体细胞,购自美国ATCC细胞库,并由课题组于液氮中冻存保存。

1.1.4 主要试剂与耗材 基础饲料(脂含量10% kcal)和高脂饲料(脂含量60% kcal)均购自北京科奥协力生物技术有限公司。*METTL3*小分子抑制剂STM2457购于Selleck Chem公司(货号S9870);细胞培养用DMEM培养基、新生牛血清(newborn calf serum, NBS)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液、青霉素-链霉素、谷氨酰胺等均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;细胞诱导分化用

3-异丁基-1-甲基-黄嘌呤(isobutylmethylxanthine, IBMX)、胰岛素、地塞米松(dexamethasone, DEX)均购自美国 Sigma 公司。 $m^6A$  抗体购于德国 Synaptic Systems 公司;免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)磁珠购于美国 Med Chem Express 生物科技公司;RNA 结合蛋白免疫沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation assay, RIP)试剂盒购于德国默克密理博公司;RNA 提取、蛋白质提取及免疫组化等相关检测试剂均为实验室常规用品。主要耗材,如离心管、PCR 八联管购于美国 Axygen 公司;细胞培养皿、六孔培养板等购于 Corning 公司;Dot blot 实验用 Hybond-N 膜购于美国 GE Healthcare Systems 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 T2DM 患者的分组及检测** 所有纳入研究的临床标本按照纳排标准,分为 T2DM 组和健康对照组,进行 2 组脂肪组织中 RNA 的提取以及斑点杂交实验(Dot Blot),分析 T2DM 患者脂肪组织中  $m^6A$  甲基化修饰水平变化。

**1.2.2 小鼠 IR 模型的构建及鉴定** 以 6~8 周龄的雄性 C57BL/6J 小鼠为实验材料,随机分为基础组和高脂组,每组 12 只。饲养于无特定病原(specific pathogen free, SPF)级动物房中,饲养期间自由饮水和饮食,进行 12 h/12 h 的明暗循环,适应性饲养 1 周后进行实验分组。其中基础组小鼠喂养啮齿动物基础饲料(control diet, CD 组);高脂组喂养高脂饲料(high fat diet, HFD 组),持续喂养 16 周,期间自由饮食饮水。通过体质量变化、腹腔注射葡萄糖耐量实验(intraperitoneal glucose tolerance tests, IPGTT)和腹腔注射胰岛素耐量实验(intraperitoneal insulin tolerance test, IPITT)实验,以组间体质量差异大于 30%,IPGTT 和 IPITT 实验组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )视为 IR 模型构建成功<sup>[23-25]</sup>。将造模成功后的 小鼠随机分为 DMSO 溶剂对照组和 STM2457 注射组,按照小鼠体质量根据 50 mg/kg 计算 STM2457 的用量,进行腹腔注射。给予 DMSO 对照组小鼠腹腔注射等量的 DMSO。

**1.2.3 IPGTT 和 IPITT** IPGTT 实验:实验小鼠禁食禁水 12 h 后,对每组每只小鼠称重,测量基础血糖水平。按照 1.0 g/kg 体质量计算葡萄糖注射量,使用便携式血糖仪测其 30、60、90、120、150、180 min 时血糖水平,绘制折线图观察不同组间曲线变化趋势。IPITT 实验:实验小鼠禁食 6 h,对每组每只小鼠称重,测量基础血糖水平。以 0.65 U/kg 小鼠体质量计算胰岛素注射量,腹腔注射。使用便携式血糖仪测其 30、60、90、120、150、180 min 后血糖水平,绘制折线图观察不同组间曲线变化趋势。

**1.2.4 表观转录组学 mRNA  $m^6A$  芯片检测** 小鼠附睾周围脂肪组织进行表观转录组学 mRNA  $m^6A$  芯片检测委托上海康成生物工程有限公司进行,检测过程按照公司技术服务常规实验流程开展,其中“ $m^6A$  甲基化水平”分析数据基于 IP(免疫沉淀, Cy3 标记)和 Sup(上清液, Cy3 标记)标准化强度,

将转录物的  $m^6A$  甲基化水平计算为所有 RNA 中修饰 RNA 的百分比(%修饰);两组原始强度用 RNA 强度的  $\log_2$  标度尖峰平均值进行标准化。“ $m^6A$  数量”基于 IP 标准化强度,计算每个转录物的  $m^6A$  甲基化量。

**1.2.5 RNA 提取、反转录和 Real Time PCR 实验** RNA 提取和反转录均按照常规实验室流程进行。其中 RNA 提取借助 Trizol 试剂完成,反转录主要步骤按照试剂盒说明书进行。Real Time PCR 实验主要借助 SYBR Green 完成,所有的实验重复 3 次,通过  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算基因相对表达,以 ATPF1 作为脂肪组织的内参基因,进行数据标准化。

PCR 引物由生工生物工程(上海)公司设计并合成,引物序列如下。Acaca 上游引物:5'-GACAGAGGAAGATGGCGTCC-3',下游引物:5'-TACAACCTCTGCTCGCTGGG-3';Srebf1 上游引物:5'-CCAGCTTCAGTCCAGGTAGC-3',下游引物:5'-GGACTTGCTCCTGCCATCAG-3';Akt2 上游引物:5'-GAGGTCCCAGTGATGCCAAG-3',下游引物:5'-GGCTGTCATATCGGTCTGGG-3';Insr 上游引物:5'-GATGAGGCCAACCTTCCTGG-3',下游引物:5'-AGAGGAACGATCCAACGGGA-3'; $\beta$ -actin 上游引物:5'-AGGGCTATGCTCTCCCTCAC-3',下游引物:5'-CTCTCAGCTGTGCTGCTGAA-3';Atpaf1 上游引物:5'-CCCCTTCTACGACCGCTAC-3',下游引物:5'-CCACTGGCTGCTTTGCGAA-3'。

**1.2.6 斑点杂交实验(Dot blot)** 提取的总 RNA 分别稀释至 200 ng/ $\mu$ L、100 ng/ $\mu$ L 和 50 ng/ $\mu$ L 3 个浓度进行 Dot-blot 实验,根据常规实验室流程进行,处理结束后曝光。

**1.2.7 Merip-qPCR 实验** 按照试剂盒说明书进行上清液和 IP 样品的制备,并进一步借助酚氯仿混合物(酚:氯仿:异戊醇=25:24:1)进行上清液及 IP 样品的 RNA 分离提取,具体步骤参考试剂盒说明书。后续根据反转录及 PCR 过程进行 PCR 扩增。Merip-qPCR 引物序列如下。Acaca 上游引物:5'-AGAATCTCCTGGTGACAATGCTT-3',下游引物:5'-GTGGTCTTGCTGAGTTGGGTTA-3';Srebf1 上游引物:5'-AAACTGCCCATCCACCGAC-3',下游引物:5'-ACTTCGTAGGCTCAGTTCTCC-3';Akt2 上游引物:5'-CAGATGGTCGCCAACAGT-3',下游引物:5'-TGCCGAGGAGTTTGAGATA-3';Insr 上游引物:5'-CAGATGGTCGCCAACAGT-3',下游引物:5'-TGCCGAGGAGTTTGAGATA-3';Pik3r1 上游引物:5'-TCTACCCAGTGTCCTCAATACCAG-3',下游引物:5'-TAAATGCTTCGATAGCCGTTTC-3'。

**1.2.8 脂肪组织快速冰冻切片的 HE 染色和 Glut4 荧光染色** 按照病理实验室常规流程完成脂肪组织的快速冰冻切片,并置于 -80 度保存。后续 HE 染色和 Glut4 荧光染色均按照实验室常规流程完成,分别置于正置显微镜和荧光显微镜下镜检。



### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计软件进行处理。计量资料采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,对于 2 组数据间的比较采用独立样本  $t$  检验,多组之间的比较采用方差分析,进一步的两两比较采用  $q$  检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 检测 T2DM 患者脂肪组织中的总体 m<sup>6</sup>A 修饰水平

与健康对照组比较,T2DM 患者脂肪组织中 m<sup>6</sup>A 甲基化水平升高(图 1A),基于 Image J 软件进行灰度值半定量分析,发现 RNA 200 ng、100 ng 和 50 ng 浓度下,T2DM 患者脂肪组织中 m<sup>6</sup>A 修饰水平分别上调(2.17  $\pm$  0.53)倍( $t=-8.375$ ;  $P<0.001$ )、(1.69  $\pm$  0.34)倍( $t=-3.722$ ;  $P=0.006$ )和(1.55  $\pm$  0.81)倍( $t=-4.937$ ;  $P=0.001$ )(图 1B)。

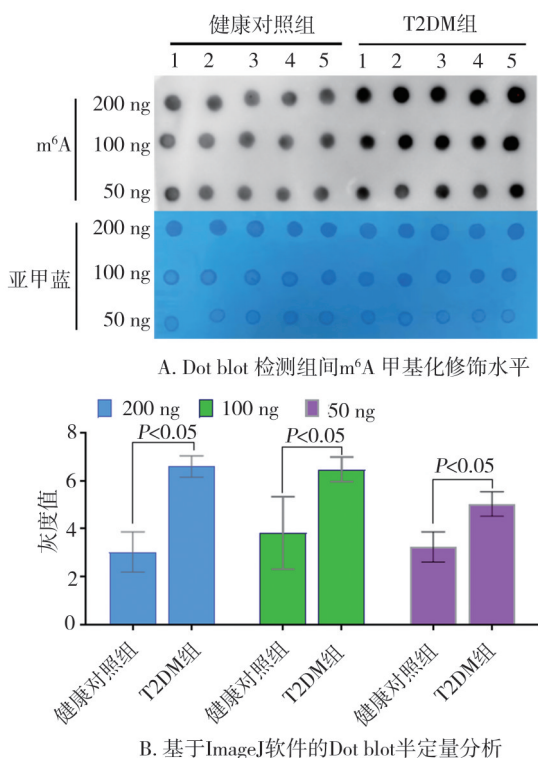


图1 健康对照受试者与 T2DM 患者 m<sup>6</sup>A 水平差异

### 2.2 检测高脂饮食诱导的小鼠 IR 模型中,脂肪组织总体 m<sup>6</sup>A 修饰水平

C57BL/6J 小鼠经不同饲料喂养 16 周后,IPGTT 实验显示基础组血糖 30 min 后开始下降,高脂组 90 min 后血糖才开始缓慢下降;IPITT 实验显示基础组较高脂组血糖更早出现恢复趋势,且恢复时间更快。至测量终点 180 min 时,基础组小鼠血糖已基本恢复起始数值,但高脂组无法恢复到起始血糖水平(图 2A、B)。

HE 染色和 Glut4 荧光染色显示,基础组切片为正常脂肪细胞,球形或卵圆形,胞质内含有大脂肪滴,细胞核被挤到一侧,呈新月形。高脂组脂肪细胞更加饱满,细胞空泡状明显变大,细胞膜变得杂乱不规则(图 2C)。细胞膜上 Glut4 荧光信号在基础组较强,高脂组明显减弱(图 2C)。

Dot blot 实验结果显示,高脂组斑点强度明显强于基础组,表明高脂组附睾周围脂肪组织中 m<sup>6</sup>A 甲基化水平明显升高(图 2D)。利用 Image J 软件进行灰度值半定量分析,在 RNA 100 ng 和 50 ng 浓度下,与基础组小鼠比较,高脂组小鼠脂肪组织中 m<sup>6</sup>A 修饰水平分别上调(1.59  $\pm$  0.43)倍( $t=-3.590$ ;  $P=0.023$ )和(1.40  $\pm$  0.33)倍( $t=-2.760$ ;  $P=0.025$ )(图 2D、E)。

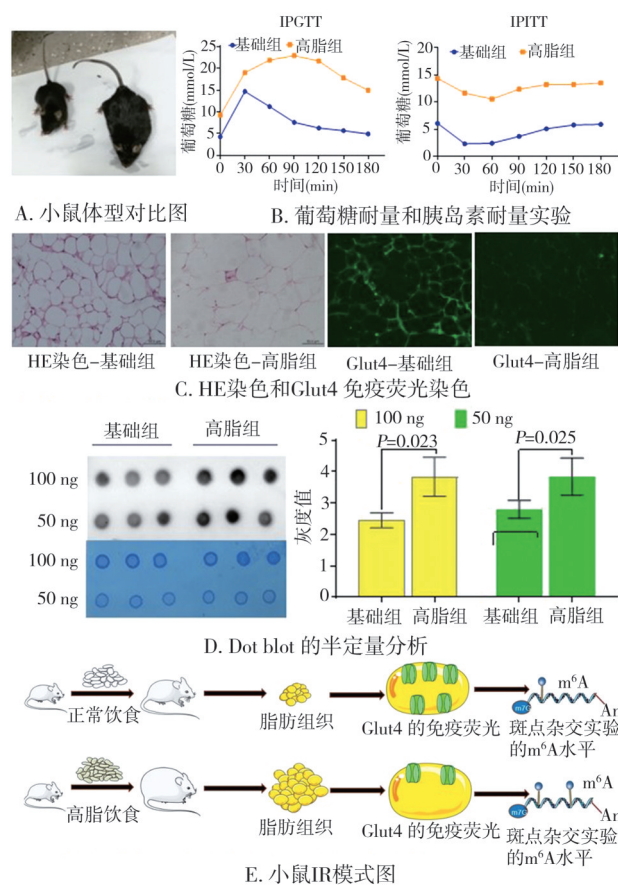


图2 高脂饮食诱导的小鼠 IR 脂肪组织总体 m<sup>6</sup>A 修饰水平

### 2.3 高脂饮食诱导的 IR 小鼠脂肪组织 m<sup>6</sup>A 修饰差异基因图谱分析

表观转录组学 mRNA m<sup>6</sup>A 芯片检测结果显示,与基础组相比,高脂组的总转录物(1 230 个 mRNAs)的 m<sup>6</sup>A 甲基化程度有明显差异( $FC \geq 1.5$ ,  $P<0.05$ ),其中 1 175 个 mRNAs 发生高 m<sup>6</sup>A 甲基化,55 个发生低 m<sup>6</sup>A 甲基化(图 3A)。

通过 KEGG 代谢通路(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway)数据库分析转录物与代谢途径、代谢通路的联系,发现脂肪细胞中发生甲基化改变的基因与脂肪细胞

中多种信号通路相关。其中高甲基化基因 KEGG 分析显示胰岛素信号传导途径位于第 4 位,共有 19 个基因被富集(图 3B);低甲基化基因 KEGG 分析显示胰岛素信号传导途径位于第 5 位,共有 2 个基因被富集(图 3C),说明高脂饮食诱导下的基因高甲基化在 IR 中发挥重要作用。

进一步分析这些 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰变化的基因在高脂组中的表达情况,并进行取交集分析,发现 101 个基因发生高甲基化且表达上调,182 个基因发生高甲基化且低表达(图 3D),提示高甲基化基因可能在脂肪细胞胰岛素敏感性调控中发挥了重要作用。

#### 2.4 验证胰岛素信号转导通路主要差异基因的 m<sup>6</sup>A 修饰变化

通过 KEGG pathway 分析有统计学意义且被低表达的基因,显示这些基因在胰岛素抵抗、AMPK 信号传导通路、胰岛素信号传导通路等过程中发挥重要作用,其中胰岛素信号转导通路中有 17 个基因参与(富集得分=3.925, FDR=0.011,  $P=0.0001$ )(图 4A)。由于该通路受高甲基化基因影响显著,提取 KEGG 分析在该通路的 19 个高甲基化基因(富集得分=4.604, FDR=0.002,  $P<0.001$ )(图 4B)。进一步对图 4A 和图

4B 取交集,得到 5 个基因(图 4C), Merip-PCR 验证发现其中 *AKT2*、*INSR*、*ACACA*、*SREBF1* 等 4 个基因一致(图 4D)。

#### 2.5 甲基转移酶 METTL3 对胰岛素信号转导通路主要差异基因的调控作用

对催化 m<sup>6</sup>A 甲基化发生的甲基转移酶 METTL3、METTL14、WTAP 转录水平进行检测,发现与基础组比较,高脂组小鼠脂肪组织中 *Mettl3* 转录水平上调(图 5A,  $t=5.287$ ,  $P=0.006$ )。RNA 结合蛋白免疫沉淀实验(RNA Binding Protein Immunoprecipitation Assay, RIP)证实 *AKT2*、*INSR*、*ACACA*、*SREBF1* 4 个基因均与 METTL3 有直接结合(图 5B)。

高脂组小鼠给予腹腔注射 METTL3 小分子抑制剂 STM2457(50 mg/kg, 每天 1 次, 2 周)后,体质量下降明显,胰岛素敏感性和葡萄糖耐量都有所提高(图 5C)。小鼠附睾周围脂肪组织 Glut4 免疫荧光染色(图 5D, 绿色荧光为 FITC 标记的荧光二抗)结果显示,基础组绿色荧光较强,盐水组和溶剂组荧光明显减弱,STM2457 组较盐水组和溶剂组明显增强。进一步 RT-qPCR 实验发现 STM2457 组脂肪组织中 *AKT2*、*INSR*、*ACACA*、*SREBF1* 4 个基因转录水平均升高较明显(图 5E)。

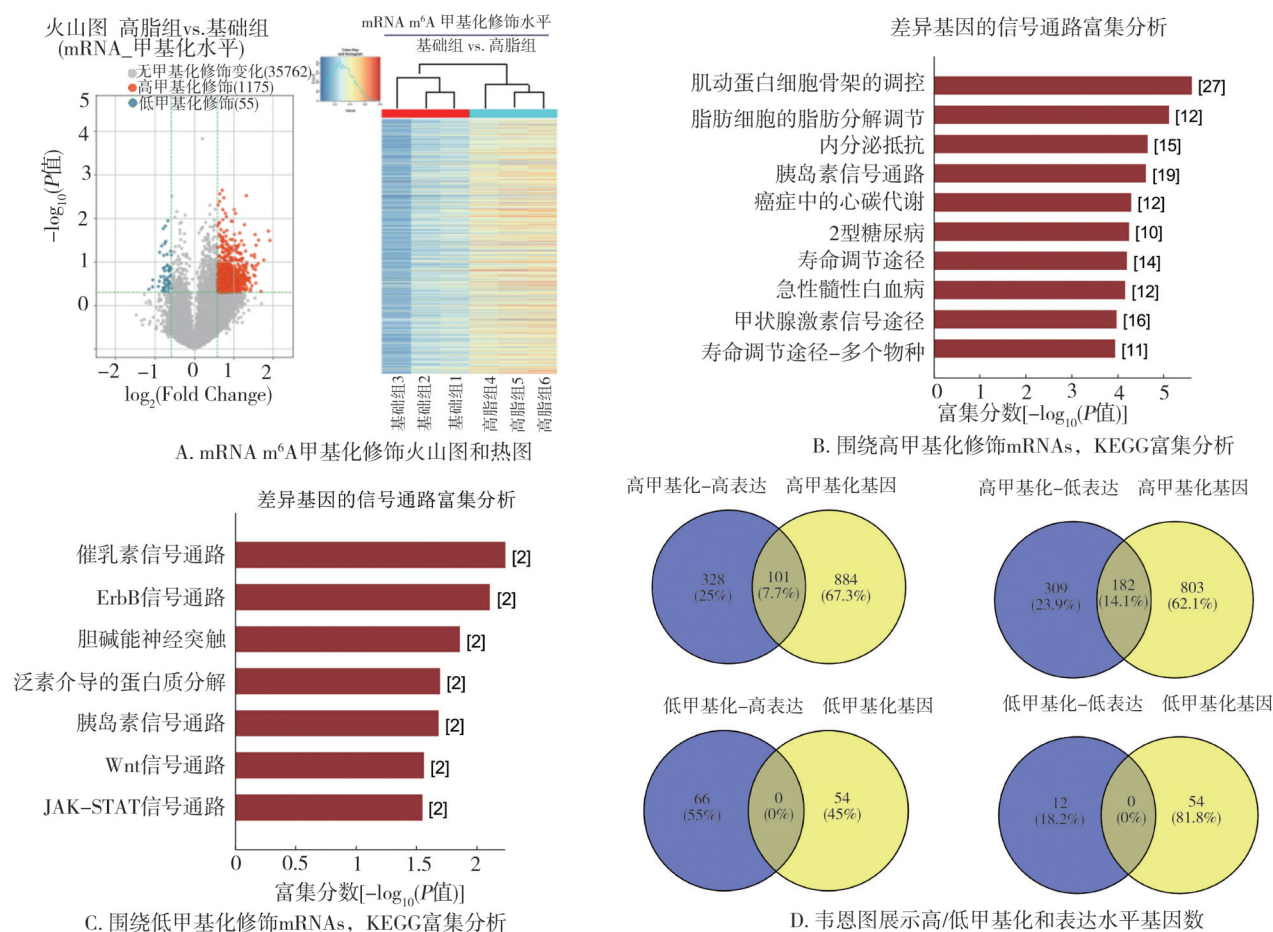
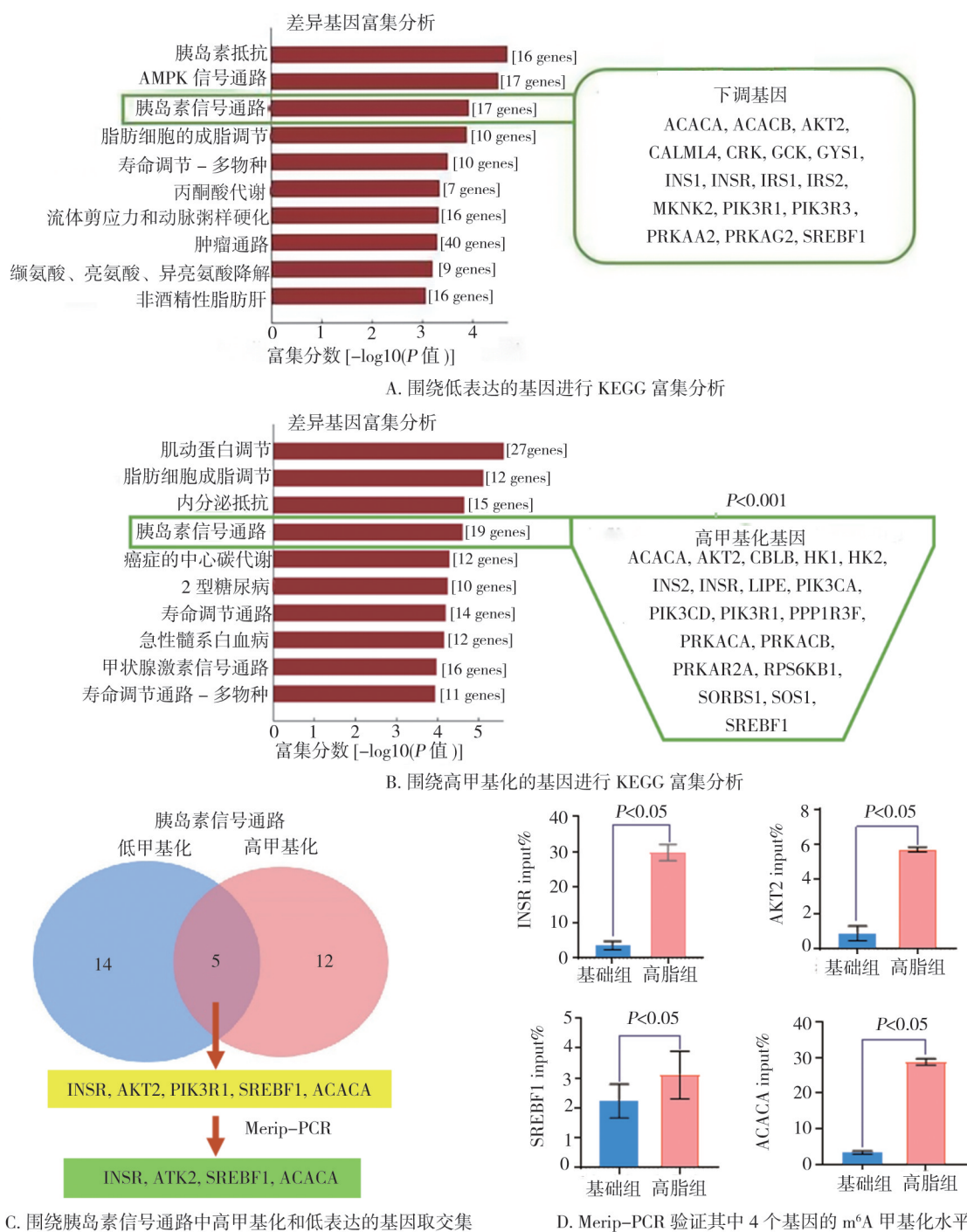


图 3 高脂诱导的小鼠 IR 脂肪组织中 m<sup>6</sup>A 修饰差异 mRNA 图谱

图 4 胰岛素信号转导通路主要差异基因的 m<sup>6</sup>A 修饰变化及验证

### 3 讨论

肥胖和 T2DM 是全球性公共健康问题,同时肥胖加重胰岛素抵抗,加剧 T2DM<sup>[26-27]</sup>。脂肪组织中 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰的研究相对比较少<sup>[13,28]</sup>,高脂饮食下脂肪组织 m<sup>6</sup>A 修饰的变化和功能尚存争议,因此, m<sup>6</sup>A 甲基化修饰在脂肪组织中胰岛素抵抗中的

作用和机制仍需进一步研究。本研究通过分析基础饮食和高脂饮食疾病模型的脂肪组织,以 m<sup>6</sup>A 修饰水平差异为切入点,通过人体脂肪组织、胰岛素抵抗模型小鼠附睾周围脂肪组织的验证,证实高脂饮食导致脂肪组织内 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰水平升高,与已有文献报道一致<sup>[29-30]</sup>,本研究的结果丰富了脂肪组织中 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰的作用。



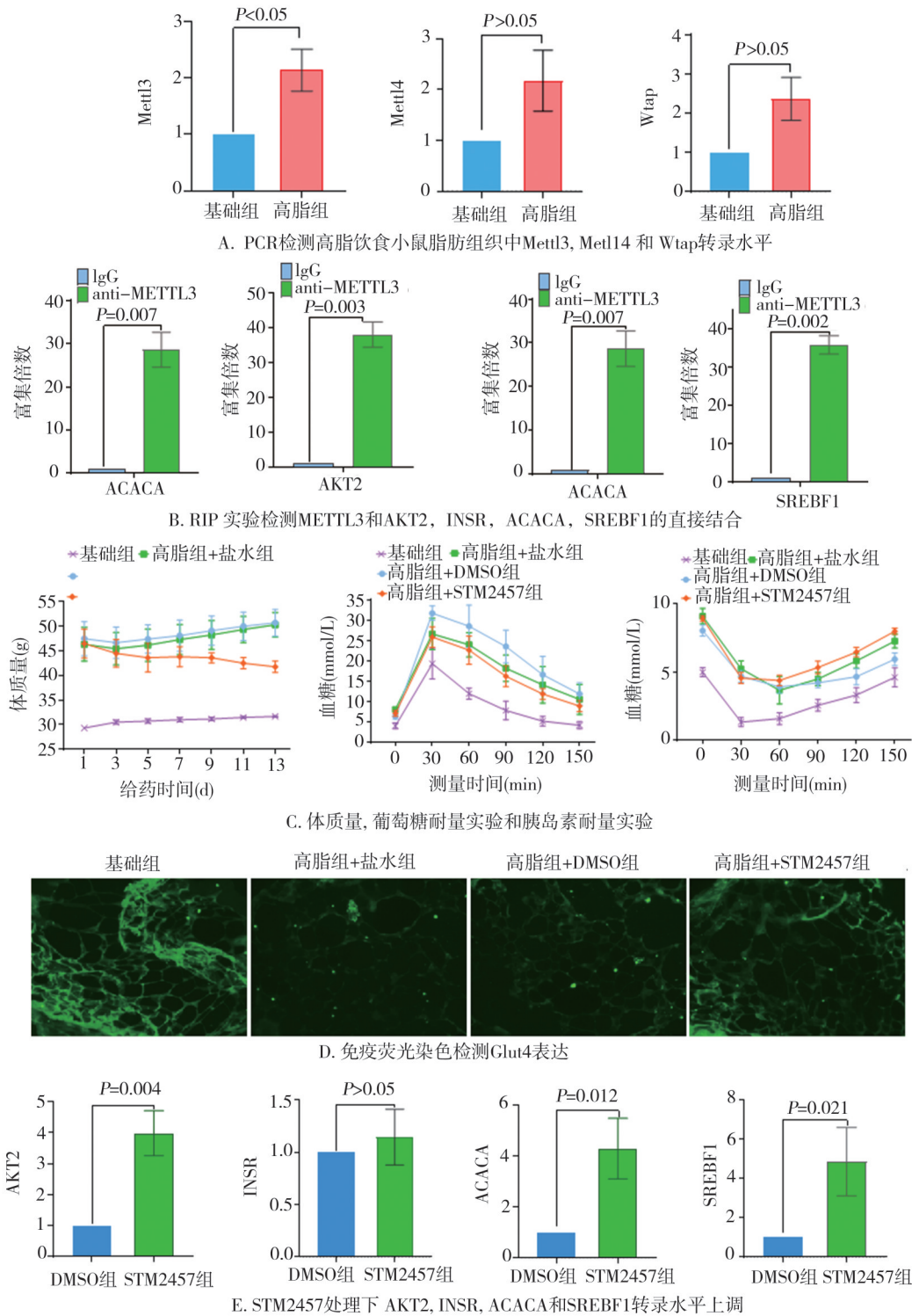
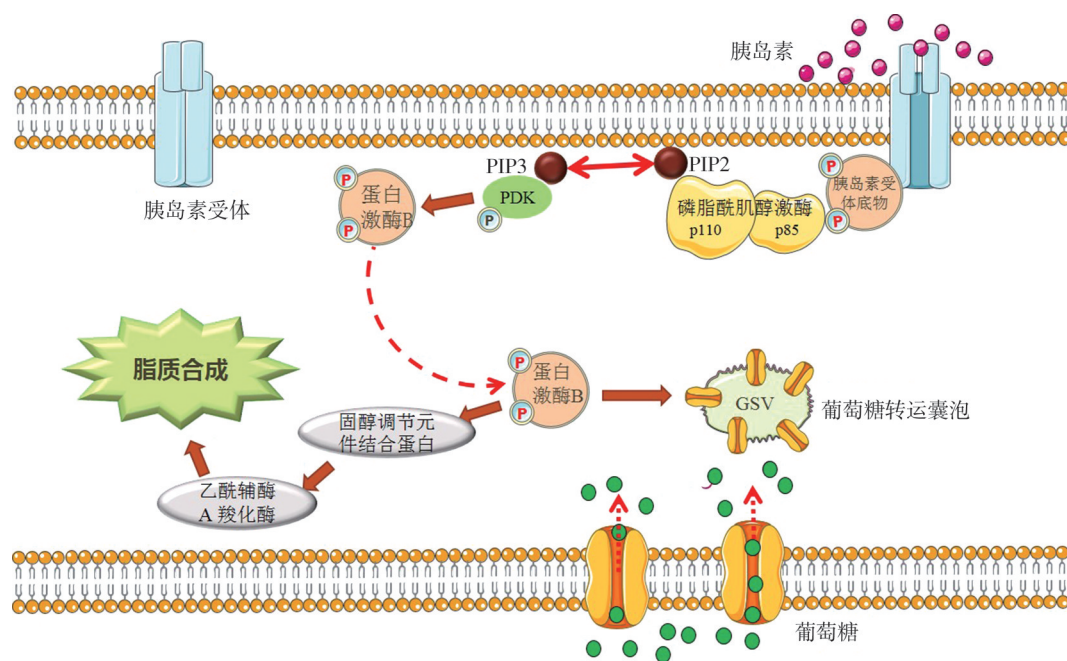


图5 METTL3对胰岛素信号转导通路主要差异基因的调控作用

mRNAs 直接参与基因转录和表达,本研究在高脂饮食诱导的IR小鼠模型中,对附睾周围脂肪组织送检 mRNA 转录组 m<sup>6</sup>A 甲基化芯片检测,结果揭示了大量 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰水平变化的基因,建立了 mRNA m<sup>6</sup>A 甲基化修饰图谱,提示 m<sup>6</sup>A 甲基化修饰

在小鼠 IR 发生发展中的作用和潜在价值,与以往研究报道一致。同时,通过对 m<sup>6</sup>A 甲基转移酶的检测,证实高脂饮食诱导下 Mettl3 上调,因此,后续围绕 Mettl3 开展了进一步研究。

胰岛素信号转导异常是胰岛素抵抗的关键环

图6 高脂饮食诱导下脂肪组织胰岛素信号转导关键m<sup>6</sup>A修饰差异基因模式图

节,基于m<sup>6</sup>A甲基化修饰差异明显基因的KEGG分析发现胰岛素信号转导通路被显著富集,主要表现为高甲基化和低表达。对高甲基化和低表达的差异基因取交集,发现胰岛素信号转导通路4个关键基因*INSR*、*AKT2*、*SREBF1*、*ACACA*发生m<sup>6</sup>A高甲基化且低表达,RIP实验反应出METTL3与4个基因有直接结合,使4个因子发生m<sup>6</sup>A甲基化修饰。进一步通过小分子抑制剂STM2457抑制METTL3甲基转移酶活性,发现小鼠胰岛素抵抗得到改善,推测机制可能与*INSR*、*AKT2*、*SREBF1*、*ACACA*4个基因RNA转录本表达水平升高,促进胰岛素信号传导有关。Xie W等<sup>[31]</sup>以20例T2DM和20例非糖尿病患者的肝脏组织作为研究对象,发现T2DM患者组肝脏组织的RNA m<sup>6</sup>A甲基化水平与非糖尿病患者组的相比显著升高<sup>1</sup>。Dang YQ等<sup>[32]</sup>对高脂饮食喂养小鼠肝脏中的m<sup>6</sup>A甲基化水平进行分析,结果表明与正常饮食组相比,HFD组小鼠肝脏m<sup>6</sup>A甲基化水平增加显著,这些已有的报道与本研究的结果一致。

基于以上结果,研究者绘制了高脂饮食诱导下脂肪组织胰岛素信号转导通路关键m<sup>6</sup>A修饰差异基因逻辑模式图(图6),证实高脂饮食组脂肪组织总m<sup>6</sup>A甲基化水平升高,在甲基转移酶METTL3调控下,胰岛素信号转导通路中*AKT2*、*INSR*、*ACACA*、*SREBF1*基因发生RNA m<sup>6</sup>A高甲基化修饰,并降低表达水平,阻滞胰岛素信号转导,诱发IR,提供了

m<sup>6</sup>A甲基化修饰与IR的直接线索。

本研究存在一定的局限性,胰岛素信号通路相关基因的高甲基化导致胰岛素抵抗的机制仍需深入地研究。例如缺少METTL3调控*INSR*、*AKT2*、*SREBF1*、*ACACA* m<sup>6</sup>A甲基化修饰的分子机制和功能;围绕信号通路开展增强和抑制实验,对信号通路相关分子机制的研究也将是课题组下一步的重点工作。同时,有必要探索组织靶向性给药方式,能够使METTL3抑制剂STM2457的临床价值得到更加充分的验证。

综合以上,本研究丰富了m<sup>6</sup>A修饰在脂肪组织胰岛素抵抗中的作用,为预防及治疗IR提供新靶点新思路。在未来,有可能通过METTL3小分子抑制剂实现改善胰岛素抵抗,最终纠正糖脂代谢紊乱,治疗胰岛素抵抗和T2DM。

## 参 考 文 献

- [1] Shi QY, Nong KL, Vandvik PO, et al. Benefits and harms of drug treatment for type 2 diabetes: systematic review and network meta-analysis of randomised controlled trials[J]. BMJ, 2023, 381: e074068.
- [2] Jonas DE, Vander Schaaf EB, Riley S, et al. Screening for prediabetes and type 2 diabetes in children and adolescents: evidence report and systematic review for the US preventive services task force[J]. JAMA, 2022, 328(10): 968-979.
- [3] Saltiel AR. Insulin signaling in health and disease[J]. J Clin Invest, 2021, 131(1): e142241.



- [4] Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, et al. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(17):6275.
- [5] Yang Q, Vijayakumar A, Kahn BB. Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(10):654–672.
- [6] Prudente S, Morini E, Trischitta V. Insulin signaling regulating genes: effect on T2DM and cardiovascular risk[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2009, 5(12):682–693.
- [7] Sharma M, Dey CS. AKT ISOFORMS-AS160-GLUT4: the defining axis of insulin resistance[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2021, 22(4):973–986.
- [8] Zaccara S, Ries RJ, Jaffrey SR. Reading, writing and erasing mRNA methylation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(10):608–624.
- [9] Horiuchi K, Kawamura T, Hamakubo T. Wilms' tumor 1-associated protein complex regulates alternative splicing and polyadenylation at potential G-quadruplex-forming splice site sequences[J]. *J Biol Chem*, 2021, 297(5):101248.
- [10] Zhou B, Liu CZ, Xu LY, et al. N<sup>6</sup>-methyladenosine reader protein YT521-B homology domain-containing 2 suppresses liver steatosis by regulation of mRNA stability of lipogenic genes[J]. *Hepatology*, 2021, 73(1):91–103.
- [11] Chen YS, Ouyang XP, Yu XH, et al. N<sup>6</sup>-adenosine methylation (m<sup>6</sup>A) RNA modification: an emerging role in cardiovascular diseases[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2021, 14(5):857–872.
- [12] Ben-Haim MS, Pinto Y, Moshitch-Moshkovitz S, et al. Dynamic regulation of N<sup>6</sup>, 2'-O-dimethyladenosine (m<sup>6</sup>Am) in obesity[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):7185.
- [13] Sun ML, Zhang XN. Epigenetic regulation of N<sup>6</sup>-methyladenosine modifications in obesity[J]. *J Diabetes Investig*, 2021, 12(8):1306–1315.
- [14] Tao XX, Du RL, Guo SM, et al. PGE<sub>2</sub>-EP3 axis promotes brown adipose tissue formation through stabilization of WTAP RNA methyltransferase[J]. *EMBO J*, 2022, 41(16):e110439.
- [15] 中国超重/肥胖医学营养治疗指南(2021)[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2021, 13(11):1–55.  
Chinese Guidelines for Medical Nutrition Therapy of Overweight/Obesity (2021)[J]. *Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science (Electronic Version)*, 2021, 13(11):1–55.
- [16] Xu ZJ, Lv BB, Qin Y, et al. Emerging roles and mechanism of m<sup>6</sup>A methylation in cardiometabolic diseases[J]. *Cells*, 2022, 11(7):1101.
- [17] Zhu LY, Fu J, Xiao X, et al. Faecal microbiota transplantation-mediated jejunal microbiota changes halt high-fat diet-induced obesity in mice via retarding intestinal fat absorption[J]. *Microb Biotechnol*, 2022, 15(1):337–352.
- [18] Chen JQ, Lai K, Yong X, et al. Silencing METTL3 stabilizes atherosclerotic plaques by regulating the phenotypic transformation of vascular smooth muscle cells via the miR-375-3p/PDK1 axis[J]. *Cardio-vascular Drugs Ther*, 2023, 37(3):471–486.
- [19] Yu ZH, Zheng XL, Wang CH, et al. The traditional Chinese medicine *Hua Tuo Zai Zao Wan* alleviates atherosclerosis by deactivation of inflammatory macrophages[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022:2200662.
- [20] Xie RX, Yan SJ, Zhou XL, et al. Activation of METTL3 promotes white adipose tissue beiging and combats obesity[J]. *Diabetes*, 2023, 72(8):1083–1094.
- [21] Bataglia L, Simões ZLP, Nunes FMF. Transcriptional expression of m<sup>6</sup>A and m<sup>5</sup>C RNA methyltransferase genes in the brain and fat body of honey bee adult workers[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10:921503.
- [22] Wang XX, Zhu LN, Chen JQ, et al. mRNA m<sup>6</sup>A methylation down-regulates adipogenesis in porcine adipocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 459(2):201–207.
- [23] Zhou N, Qi HL, Liu JJ, et al. Deubiquitinase OTUD3 regulates metabolism homeostasis in response to nutritional stresses[J]. *Cell Metab*, 2022, 34(7):1023–1041.
- [24] Li YQ, Zhang DT, Gao YN, et al. METTL3 exacerbates insulin resistance in hepatocytes by regulating m<sup>6</sup>A modification of cytochrome P450 2B6[J]. *Nutr Metab*, 2023, 20(1):1–14.
- [25] Wang ZQ, Zhang XH, Yu YM, et al. *Artemisia scoparia* extract attenuates non-alcoholic fatty liver disease in diet-induced obesity mice by enhancing hepatic insulin and AMPK signaling independently of FGF21 pathway[J]. *Metabolism*, 2013, 62(9):1239–1249.
- [26] Chen C, Nott TJ, Jin J, et al. Deciphering arginine methylation: Tudor tells the tale[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(10):629–642.
- [27] AlAbdulKader AM, Tuwairqi K, Rao G. Obesity and cardiovascular risk in the Arab Gulf states[J]. *Curr Cardiovasc Risk Rep*, 2020, 14(7):1–9.
- [28] Li YL, Li L, Liu YH, et al. Identification of metabolism-related proteins as biomarkers of insulin resistance and potential mechanisms of m<sup>6</sup>A modification[J]. *Nutrients*, 2023, 15(8):1839.
- [29] Wu RF, Chen YS, Liu YH, et al. m<sup>6</sup>A methylation promotes white-to-beige fat transition by facilitating Hif1a translation[J]. *EMBO Rep*, 2021, 22(11):e52348.
- [30] Wang XX, Wu RF, Liu YH, et al. m<sup>6</sup>A mRNA methylation controls autophagy and adipogenesis by targeting *Atg5* and *Atg7*[J]. *Autophagy*, 2020, 16(7):1221–1235.
- [31] Xie W, Ma LL, Xu YQ, et al. METTL3 inhibits hepatic insulin sensitivity via N<sup>6</sup>-methyladenosine modification of *Fasn* mRNA and promoting fatty acid metabolism[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 518(1):120–126.
- [32] Dang YQ, Xu JJ, Yang Y, et al. Ling-Gui-Zhu-Gan decoction alleviates hepatic steatosis through SOCS<sub>2</sub> modification by N<sup>6</sup>-methyladenosine[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2020, 127:109976.

(责任编辑:曾 玲)