

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.20.001

· 基础研究 ·

FTO 通过 m6A 调控 3T3-L1 细胞分化的作用及其机制研究 *

李尹^{1,2} 许心怡^{1,2} 陈钰倩^{1,2} 任炼辞³ 李聚学^{1,2Δ}

(1 南京医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系 江苏南京 211166;

2 南京医科大学江苏省人类功能基因组学重点实验室 江苏南京 211166;

3 南京医科大学第一临床医学院 江苏南京 210029)

摘要 目的:探究 m6A 去甲基化酶 FTO 及其下游基因 CLK2 对 3T3-L1 细胞成脂分化的影响,以及 FTO 影响 CLK2 表达水平的分子机制。**方法:**(1)通过成脂分化诱导和后续的油红染色以及油红定量探究 FTO 和 CLK2 对 3T3-L1 细胞成脂分化的影响;(2)通过蛋白免疫印迹和实时荧光定量 PCR 测定 FTO 和 CLK2 蛋白水平和 mRNA 水平的改变;(3)通过生物信息学分析筛选不同分化时期的 3T3-L1 细胞差异化 m6A 修饰位点;(4)通过 MeRIP-qPCR 测定 CLK2 mRNA 上的 m6A 修饰水平;(5)通过放线菌素 D 抑制新生转录本合成探究 CLK2 mRNA 的降解速率;(6)通过胰岛素刺激探究 3T3-L1 细胞 Insulin-AKT 通路激活情况。**结果:**(1)3T3-L1 细胞的成脂分化依赖 FTO 的去甲基化酶活性和 CLK2 的激酶活性;(2)CLK2 5'UTR 区域存在可被 FTO 去甲基化的 m6A 修饰,且该位点 m6A 修饰提高 CLK2 mRNA 的降解速率;(3)CLK2 表达水平与 FTO 表达水平存在正相关,且 CLK2 和 FTO 抑制剂均抑制 3T3-L1 细胞 Insulin-AKT 通路的激活。**结论:**FTO 通过降低 CLK2 5'UTR 区域的 m6A 修饰水平从而抑制 CLK2 mRNA 的降解,促进 CLK2 的蛋白表达,CLK2 进而通过维持 Insulin-AKT 通路活性促进 3T3-L1 细胞成脂分化。

关键词:m6A 修饰;成脂分化;FTO;CLK2

中图分类号:Q291 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)20-3801-08

Effect and Mechanism of FTO in Regulating 3T3-L1 Cell Differentiation through m6A*

LI Yin^{1,2}, XU Xin-yi^{1,2}, CHEN Yu-qian^{1,2}, REN Lian-ci³, LI Ju-xue^{1,2Δ}

(1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211166, China; 2 Key Laboratory of Human Functional Genomics of Jiangsu Province, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211166, China; 3 The First Clinical Medical College of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210029, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects and the molecular mechanism of m6A demethylase FTO and its downstream gene CLK2 on adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. **Methods:** (1) The effects of FTO and CLK2 on adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells were explored by adipogenic differentiation induction, subsequent oil red staining and oil red quantification; (2) The changes of FTO and CLK2 protein levels and mRNA levels were determined by Western blot and real-time PCR; (3) The differential m6A modification sites of 3T3-L1 cells at different differentiation stages were screened by bioinformatics analysis; (4) M6A modification levels on CLK2 mRNA were determined by merip qPCR; (5) The degradation rate of CLK2 mRNA was explored by inhibiting the synthesis of nascent transcripts by actinomycin D; (6) Objective to explore the activation of insulin Akt pathway in 3T3-L1 cells by insulin stimulation. **Results:** (1) Adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells was depended on the demethylase activity of FTO and the kinase activity of CLK2; (2) The m6A modification in the 5'UTR region of CLK2 could be demethylated by FTO, and the m6A modification at this site increased the degradation rate of CLK2 mRNA; (3) There was a positive correlation between CLK2 expression level and FTO expression level, and both CLK2 and FTO inhibitors inhibited the activation of insulin Akt pathway in 3T3-L1 cells. **Conclusions:** FTO inhibits the degradation of CLK2 mRNA and promotes protein expression of CLK2 by reducing the m6A modification level in the CLK2 5'UTR region. CLK2, in turn, promotes adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells by maintaining insulin AKT pathway activity.

Key words: m6A modification; Adipogenic differentiation; FTO; CLK2**Chinese Library Classification(CLC):** Q291 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2024)20-3801-08

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82070872)

作者简介:李尹(1998-),男,硕士研究生,主要研究方向:生物学,E-mail:liyin_ita@qq.com

Δ 通讯作者:李聚学,男,博士生导师,主要研究方向:生物学,E-mail:lijuxue@njmu.edu.cn

(收稿日期:2024-06-27 接受日期:2024-07-18)

前言

表观遗传调控由于不改变基因序列和高度可逆性,成为一种独特的基因表达调控方式。表观遗传学研究范畴包括:DNA甲基化、RNA修饰、组蛋白修饰、染色质重塑、非编码RNA调控和核小体定位等^[1,2]。RNA修饰是表观遗传学的重要分支,已发现150种以上不同类型的化学修饰,其中6-甲基腺嘌呤(m6A)是丰度最高的RNA修饰^[3,4]。m6A的"写入"与pre-mRNA的转录过程偶联,由一类称为Writer的甲基转移酶完成,METTL家族成员是最为常见的m6A Writers,主要包括METTL3、METTL14、METTL5和METTL16等^[5-7]。m6A的"擦除"由一类称为Eraser的去甲基酶完成,ALKBH是经典的去甲基化结构域,主要包括ALKBH5和FTO^[8,9]。m6A阅读蛋白Reader能够识别并结合mRNA上m6A修饰,并调控mRNA的核转运、降解和翻译等过程,主要包括YTH家族蛋白、IGF2BP家族和HNRNP家族等^[2,5,10,11]。m6A在脂肪中的研究起源于FTO(Fat mass and obesity-associated protein,脂肪质量和肥胖相关基因)去甲基化功能的发现,虽然FTO最早被筛选出与肥胖表型强相关,然而直至2011年,研究人员才开始从表观遗传的角度解释FTO对肥胖的调控途径^[9,12],并发现FTO作为m6A修饰的去甲基酶,以m6A依赖途径调控RUNX1T1和PPARG等脂肪分化关键因子,影响脂肪组织的发育^[13-16]。与FTO类似的是METTL3/14对脂肪的调控,它们都基于对下游mRNA的m6A修饰水平动态调控从而改变下游基因的表达水平,例如棕色脂肪早期发育过程中PPARG和UCP1等功能基因的正常表达,很大程度上取决于METTL3对其转录本的高度修饰^[17]。阅读蛋白是m6A修饰发挥功能的效应蛋白,通过特异识别RNA分子中的m6A,对RNA的丰度和功能进行调控^[5]。YTHDC1是YTH家族中唯一的细胞核阅读蛋白,它可以招募剪接因子SRSF3促进pre-mRNA剪接和协助甲基化的mRNA转运出核^[18,19]。其他定位于细胞质的YTH家族蛋白主要调控mRNA的衰减和翻译^[20,21]。Huang等研究证实IGF2BPs是m6A阅读蛋白,以依赖m6A的方式增加癌基因(如Myc)mRNA的稳定性,促进肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)增殖^[2]。

目前的脂肪m6A研究聚焦于脂肪组织病理状态下的异常修饰,而从细胞分化和组织发育角度对脂肪的m6A相关研究相对不足。实际上,Yang等研究者^[22]已通过高通量MeRIP测序绘制出相对完整的3T3-L1细胞分化过程中的m6A修饰时间图谱。对于上述在成脂分化过程中存在的差异化m6A修饰基因,仍需进一步筛选与探究,以对其在脂肪分化过程中的功能与调控关系做出阐释。

本研究以3T3-L1脂肪前体细胞为模型,利用3T3-L1细胞能够进行成脂分化的特性,探究FTO在m6A的介导下通过哪些下游基因影响成脂分化,以及FTO影响下游基因表达进而影响成脂分化的分子机制。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 Lipofectamine™ 2000 CD转染试剂(Invitrogen, 12566014),DMEM高糖培养基(Gibco, C11995500BT),新生

牛血清(Gibco, 16010142),青霉素-链霉素(Gibco, 15140122),RIPA细胞裂解液(碧云天, P0013B),RNAiso Plus(Takara, 9108),HiScript II Q RT SuperMix for qPCR(诺唯赞, R223-01),ChamQ SYBR qPCR Master Mix(诺唯赞, Q331-02),IBMX(MCE, HY-12318),地塞米松(MCE, HY-B1829A),胰岛素(CME, HY-P0035),罗格列酮(MCE, HY-17386),油红O染色试剂(碧云天, C0157S),FB23-2(MCE, HY-127103),CC-671(MCE, HY-108709),放线菌素D(MCE, HY-17559),CLK2一抗(Santa Cruz, sc-393909),m6A一抗(Active Motif, 91261),FTO一抗(Proteintech, 27226-1-AP),ACTB一抗(碧云天, AF0003),Tubulin一抗(碧云天, AF5012),HRP标记山羊抗小鼠IgG(碧云天, A0216),HRP标记山羊抗兔IgG(碧云天, A0208),鼠IgG(碧云天, 7208)。

1.1.2 仪器 CO₂细胞培养箱(Thermo),生物安全柜(Airstream),Nanodrop 2000(Thermo),倒置荧光显微镜(Nikon),琼脂糖凝胶电泳仪(Tanon),凝胶成像仪(Tanon),垂直蛋白电泳槽(Tanon),酶标仪(Biotek),实时荧光定量PCR仪(Thermo),化学发光成像系统(Tanon)。

1.2 方法

1.2.1 蛋白免疫印迹 为了定量不同方法处理的3T3细胞中FTO、CLK2,以及pAKT/AKT的蛋白表达,我们进行蛋白免疫印迹实验,以在同一内参ACTB的标准下比较蛋白质表达。将配制好的分离胶加入玻璃板中并用无水乙醇将胶面压平,分离胶完全凝固后,去除无水乙醇,倒入4%浓缩胶并插入梳子。待浓缩胶凝固后将玻璃板及凝胶一并取下,放入电泳槽中,加入1×电泳缓冲液,拔出梳子并将蛋白样品加入上样孔中,同时需加入蛋白Marker以指示蛋白质相对分子量大小。先以80V恒定电压进行电泳,待蛋白样品进入分离胶后,再以120V继续电泳,待蛋白Marker充分分离后结束电泳。根据覆盖区域,剪取合适大小及形状的PVDF膜,用甲醇激活30s后浸泡在预冷的电转液中。从玻璃板上取下凝胶,只保留分离胶。按照黑色夹板、海绵、三层滤纸、分离胶、PVDF膜、三层滤纸、海绵、白色夹板的顺序放入夹板中,插入电转槽,300mA恒流电转120min。将PVDF膜取出,于5%脱脂奶中浸泡,于摇床上摇动封闭2h。将封闭后的PVDF膜裁剪成合适大小,放入抗体稀释液稀释的一抗,于摇床上4℃孵育过夜。将过夜的PVDF膜用TBST在摇床上清洗5min,重复三次。以5%脱脂牛奶稀释二抗,将清洗后的PVDF膜浸泡在二抗稀释液中,于摇床上常温孵育1h。将二抗孵育后的PVDF膜用TBST在摇床上清洗10min,重复三次。以1:1的比例配制化学发光工作液,将其滴加于PVDF膜上并用凝胶成像仪曝光显影。

1.2.2 实时荧光定量PCR 为了定量不同方法处理的3T3细胞中FTO和CLK2的mRNA表达,我们进行实时荧光定量PCR实验,在同一内参ACTB的标准下比较mRNA表达。RNA的反转录按照诺唯赞HiScript III RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)试剂说明书进行。实时荧光定量PCR按照诺唯赞ChamQ SYBR qPCR Master Mix(Low ROX Premixed)说明书进行,以稀释10倍后的体外反转录产物为模板。反应完成后记录Ct值,按 $\Delta\Delta Ct$ 方法计算相对表达量。

1.2.3 细胞培养 3T3-L1 细胞培养使用生长培养基 (45 mL DMEM 高糖培养基, 5 mL 新生牛血清, 0.5 mL 青霉素 - 链霉素)。传代时使用胰蛋白酶 37°C 消化 30 s, 生长培养基终止消化, 吹打均匀后接种入新的培养皿。

1.2.4 细胞药物处理 为了探究 FTO 的去甲基化酶活性和 CLK2 的激酶活性对 3T3-L1 细胞成脂分化途径的影响, 我们分别应用了 FB23-2 和 CC-671 两种特异性酶活性抑制剂处理 3T3-L1 细胞, 随后观察其成脂分化效率的改变。FB23-2 和 CC-671 处理细胞时选用 80% 汇合度的 3T3-L1 细胞, 将一定浓度的药物加入生长培养基后对细胞进行换液, 处理 48 h 后进行后续实验。为了抑制新生 RNA 的合成以探究 CLK2 mRNA 的降解速率, 我们应用放线菌素 D 处理 3T3-L1 细胞。放线菌素 D 处理细胞时选用 80% 汇合度的 3T3-L1 细胞, 将一定浓度的放线菌素 D 加入生长培养基后对细胞进行换液, 分别处理 0, 2, 4, 6 h 后进行后续实验。为了探究不同处理条件下 3T3-L1 细胞对胰岛素信号的响应, 我们应用外源性胰岛素刺激细胞。胰岛素处理细胞时选用 70% 汇合度的 3T3-L1 细胞, 处理前 12 h 将生长培养基更换为 DMEM 高糖培养基, 将一定浓度的胰岛素加入 DMEM 高糖培养基后对细胞进行换液, 处理 30 min 后进行后续实验。

1.2.5 细胞成脂诱导 为了探究 3T3 细胞成脂分化过程中 FTO 和下游基因 CLK2 的表达量变化, 以及评估 FTO 和 CLK2 抑制对分化途径所造成的影响, 我们在不同的处理条件下对 3T3 细胞进行成脂分化诱导。3T3-L1 细胞分化处理时, 待 3T3-L1 细胞铺满后的第 3 天, 更换为分化培养基 (DMEM 高糖 +10% 胎牛血清, 1% 青霉素 - 链霉素, 0.5 Mm IBMX, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰岛素, 0.25 μM 地塞米松, 2 μM 罗格列酮) 处理 3 天, 之后更换为维持培养基 (DMEM 高糖 +10% 胎牛血清, 1% 青霉素 - 链霉素, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胰岛素) 处理 3 天。对于基因表达定量, 将加入分化培养基处理记为第 0 天, 每隔 24 小时对细胞取样进行 RNA 和蛋白质提取, 直至第 6 天维持培养基处理结束。

1.2.6 油红染色与定量 为了反映 3T3-L1 细胞的成脂分化效率, 我们应用油红染色方法将分化后的脂肪细胞脂滴进行染色, 并且进一步通过吸光度定量染色水平。油红染色按碧云天油红 O 染色试剂盒说明书进行。镜下观察完毕后, PBS 洗涤细胞 3 次, 之后加入 1 mL/6 cm 培养皿异丙醇, 摇床上震荡洗脱 10 min, 收集洗脱液, 用酶标仪定量 490 nm 波长的吸光度。

1.2.7 甲基化 RNA 免疫沉淀 (MeRIP) 为了定量 CLK2 mRNA 不同区域在不同处理条件下的 m6A 修饰丰度, 我们进行 MeRIP 实验, 通过 RNA 产物的实时荧光定量循环数反映 m6A 修饰化的 mRNA 水平。按照细胞 RNA 提取步骤提取总 RNA, 浓度确保 1000 ng/ μL 以上。按 NEBNext[®] Magnesium RNA Fragmentation Module 说明书进行 RNA 片段化以及片段回收。取 30 μL 磁珠, 用 MeRIP-Wash- I (150 mM LiCl, 10 mM Tris, 0.5% NP-40) 颠倒洗涤两次。向洗涤后的磁珠加入 500 μL MeRIP-Wash- I 和 3 μg 抗体 /IgG, IP 摇架上 4°C 孵育过夜。将过夜后的磁珠用 MeRIP-Wash- I 颠倒洗涤两次, 加入 500 μL MeRIP-Wash- I 和 25 μg 片段化的 RNA, IP 摇架上 4°C 孵育 4h。将孵育后的磁珠依次用 MeRIP-Wash- I, MeRIP-Wash- II (MeRIP-Wash- I + 150 mM LiCl), MeRIP-Wash- III (MeRIP-

Wash- I + 300 mM LiCl), MeRIP-Wash- I 洗涤, 共四次。向洗涤后的磁珠加入 500 μL RNAiso, 涡旋 30 s, 加入 100 μL 氯仿后涡旋 30 s, 之后 12000 rpm 4°C 离心 10 min, 将上层水相转移至新的 EP 管。向水相中加入 1/6 上清体积的 5M 乙酸铵, 5% 上清体积的 7.5 M LiCl, 0.5% 上清体积的 5 mg/mL 线性化丙烯酰胺, 2 倍上清体积的无水乙醇, 于 -80°C 静置 1 h。静置后 12000 rpm 4°C 离心 30 min, 去上清, 300 μL 75% 乙醇洗涤 2 次, 晾干沉淀后加入 DEPC 水溶解备用。

1.3 统计分析

作图及统计分析使用 Graphpad Prism 8, 采用独立样本 t 检验比较两组数据差异性, 采用单因素方差分析来分析三组以上数据差异性, 利用平均值 \pm 标准差 (S.D.) 表示数据, * 号表示显著差异 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$), ns 表示无显著性差异 (No significance)。

2 结果

2.1 FTO 在 3T3-L1 细胞分化过程中表达上调

我们首先探究了 FTO 在 3T3-L1 细胞成脂分化过程中的表达量变化。蛋白免疫印迹实验结果显示, 第 0 天分化处理后, FTO 蛋白水平开始上升, 除第 1~2 天 FTO 蛋白水平有所下降外, FTO 的蛋白水平总体显示上升趋势 (图 1A, B)。实时荧光定量 PCR 结果显示, FTO mRNA 水平在第 0~5 天上升, 与蛋白水平的改变基本一致, 第 5~6 天出现下降 (图 1C)。以上结果表明, FTO 在 3T3-L1 细胞中随着分化进程而表达上调, 这提示 FTO 可能参与了 3T3-L1 细胞的正常分化。

2.2 FTO 抑制剂显著抑制 3T3-L1 细胞的分化

我们对 FTO 去甲基化酶特异性抑制剂 FB23-2 处理后的 3T3-L1 细胞进行了成脂诱导。油红染色后镜下观察, 结果显示 20 μM FB23-2 处理后, 3T3-L1 细胞的成脂分化被显著抑制 (图 1D), 油红定量结果显示, 低浓度 FB23-2 处理 (5 μM) 促进了 3T3-L1 细胞的成脂分化, 高浓度 FB23-2 处理 (20 μM) 显著抑制了 3T3-L1 细胞的成脂分化 (图 1E)。以上结果表明, 3T3-L1 细胞成脂分化的正常进行依赖 FTO 的去甲基化酶活性。

2.3 FTO 下游基因的筛选

在前言部分所述 3T3-L1 细胞分化过程中的差异化 m6A 修饰图谱中, 我们发现 886 个末期 m6A 高水平修饰位点 (图 2A), 我们注意到 CLK2 mRNA 上包含 5'UTR 和 CDS 在内的 6 个位点在 3T3-L1 细胞分化处理后 m6A 修饰水平发生改变。我们进一步发现 CLK2 5'UTR 位点的 m6A 水平在第 2~10 天持续下降, 这与 FTO 作为去甲基化酶在分化过程中的持续表达上调趋势一致 (图 2B)。

2.4 FTO 调控 CLK2 mRNA 的 m6A 修饰

我们利用靶向于 CLK2 mRNA 的 3 个区域特异性引物 (图 2C) 进行了 MeRIP-qPCR 实验。3T3-L1 细胞的 MeRIP-qPCR 结果显示, 5'UTR 区域在对照组和 FB23-2 处理条件下均存在显著性的 m6A 富集, 而 NC 和 3'UTR 区域未显示 m6A 富集 (图 2D)。m6A/IgG 组的 mRNA 富集倍数显示, 5'UTR 的 m6A 富集在 FB23-2 处理的细胞中显著上升, 约为对照组的 2.5 倍 (图 2E), 表明此位点的去甲基化被抑制。以上结果表明, CLK2 mRNA 上 5'UTR 区域的 m6A 受到 FTO 去甲基化酶活性的调控。

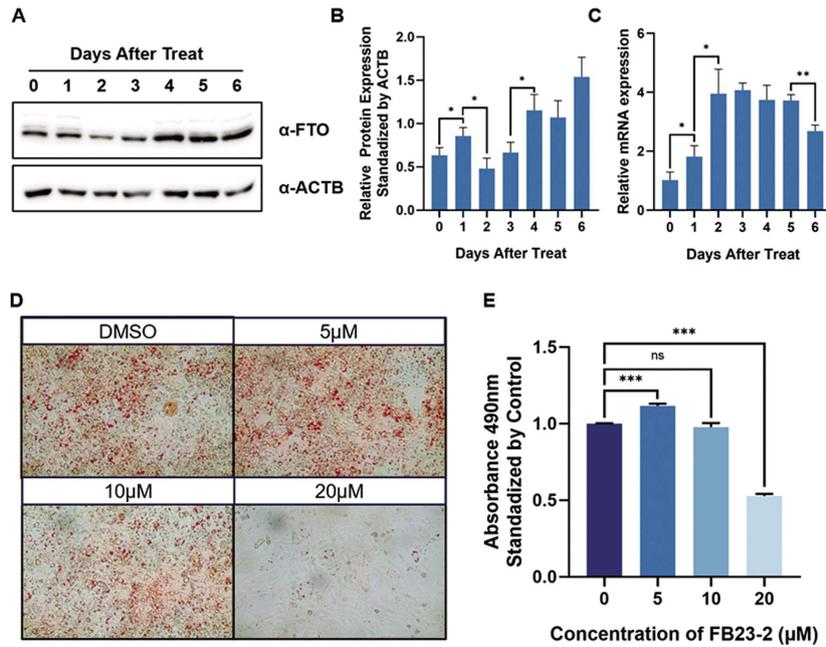


图 1 FTO 对 3T3-L1 细胞成脂分化的影响

Fig. 1 Effect of FTO on adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells

(A) 蛋白免疫印迹检测 3T3-L1 细胞成脂分化第 0~6 天的 FTO 蛋白水平; (B) 蛋白免疫印迹检测 FTO 蛋白水平的条带灰度值定量, n=3, *P<0.05; (C) 实时荧光定量 PCR 检测 3T3-L1 细胞成脂分化第 0~6 天的 FTO mRNA 水平, n=3, *P<0.05, **P<0.01; (D) FB23-2 处理后的 3T3-L1 细胞成脂分化细胞油红染色。 (E) FB23-2 处理后的 3T3-L1 细胞成脂分化细胞油红染色定量, n=3, ***P<0.001。

(A) FTO protein levels of 3T3-L1 cells at 0-6 days of adipogenic differentiation were detected by Western blot; (B) The band gray value of FTO protein level was quantified by Western blot, n=3, *P<0.05; (c) the FTO mRNA level of 3T3-L1 cells at 0-6 days of adipogenic differentiation was detected by real-time PCR, n=3, *P<0.05, **P<0.01; (D) Oil red staining of adipogenic differentiated cells of 3T3-L1 cells after fb23-2 treatment. (E) Quantification of oil red staining of adipogenic differentiated cells of 3T3-L1 cells after fb23-2 treatment, n=3, ***P<0.001.

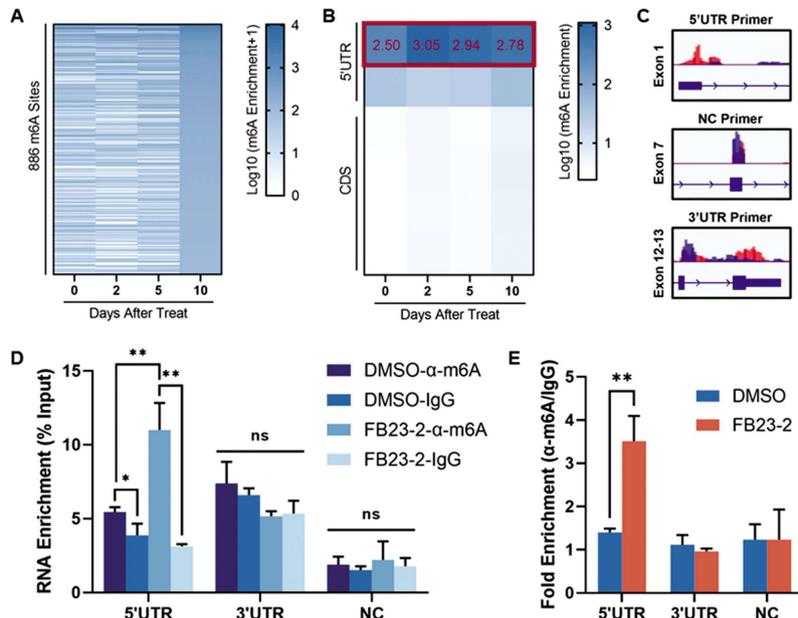


图 2 FTO 下游基因的筛选和验证

Fig. 2 Screening and validation of FTO downstream genes

(A) 分化第 10 天 m6A Enrichment>100 的 886 个 m6A 位点热图; (B) CLK2 的 6 个 m6A 位点热图;

(C) CLK2 MeRIP-qPCR 引物设计, 红色: m6A 峰, 蓝色: Input 峰; (D) MeRIP-qPCR 验证 CLK2 不同区域的 m6A 修饰, n=3, *P<0.05, **P<0.01;

(E) MeRIP-qPCR 结果的差异倍数, 差异倍数 = α -m6A 表达量 / IgG 表达量, n=3, **P<0.01。

(A) Heatmap of 886 m6A sites with m6A enrichment>100 on day 10 of differentiation; (B) Heatmap of six m6A sites of CLK2; (C) CLK2 merip qPCR primer design, red: m6A peak, blue: input peak; (D) MeRIP-qPCR validated m6A modification in different regions of CLK2, n=3, *P<0.05, **P<0.01;

(E) Fold enrichment of MeRIP-qPCR results, fold enrichment = α -m6a expression / IgG expression, n=3, **P<0.01.

2.5 CLK2 在 3T3-L1 细胞分化过程中表达上调

我们在 3T3-L1 细胞的成脂分化过程中探究了 CLK2 的蛋白和 mRNA 表达。蛋白免疫印迹实验结果显示,分化第 0~2 天 CLK2 几乎不表达,3~6 天 CLK2 开始表达且蛋白水平持续升高(图 3A,B)。实时荧光定量 PCR 结果显示分化第 0~4 天 CLK2 mRNA 水平持续升高,第 4 天后开始下降(图 3C)。以上结果表明,CLK2 在 3T3-L1 细胞中随着分化进程而表达上调,提示其有可能参与了 3T3-L1 细胞的正常分化过程,且 CLK2 表达模式与 FTO 相似,提示了 CLK2 作为 FTO 的下游基因,可能受 FTO 表达水平的调控。

2.6 FTO 抑制剂显著降低 CLK2 的表达水平

我们应用梯度浓度的 FB23-2 处理 3T3-L1 细胞后,对 CLK2 的表达水平进行定量。蛋白免疫印迹实验结果显示,10 μ M FB23-2 对 CLK2 蛋白水平产生了抑制,20 μ M 以上的 FB23-2 对 CLK2 蛋白水平的抑制效果达到最大(图 3D,E)。实时荧光定量 PCR 结果显示,20 μ M 以上的 FB23-2 对 CLK2 mRNA 水平产生显著性抑制(图 3F)。以上结果表明,CLK2 的蛋白和 mRNA 水平受到 FTO 去甲基化酶活性的调控。

2.7 过表达 FTO 上调 CLK2 的表达水平

我们随后在过表达 FTO 的 3T3-L1 细胞中定量 CLK2 的表达。蛋白免疫印迹实验结果显示,FTO 过表达能显著提高 CLK2 的蛋白表达水平(图 3G,H)。实时荧光定量 PCR 结果显示,FTO 过表达能显著提高 CLK2 mRNA 表达水平。以上结果表明,CLK2 的蛋白和 mRNA 水平受到 FTO 去甲基化酶活性的调控,且 CLK2 表达水平和 FTO 水平呈正相关。

2.8 CLK2 5'UTR 区域的 m6A 修饰影响 mRNA 稳定性

我们应用放线菌素 D 处理 3T3-L1 细胞后进行实时荧光定量 PCR。结果显示,20 μ M FB23-2 处理的细胞第 2,4,6 小时 CLK2 mRNA 水平显著低于对照组(图 3J),这表明 FTO 的表达可能通过降低 CLK2 5'UTR 区域的 m6A 水平,延缓了 CLK2 mRNA 的降解,进而提高了 CLK2 的蛋白表达水平。

2.9 CLK2 抑制剂显著抑制 3T3-L1 细胞的分化

我们对 CC-671 处理后的 3T3-L1 细胞进行了成脂诱导。油红染色后镜下观察,结果显示低浓度 CC-671 处理(50 nM)即可显著抑制 3T3-L1 细胞成脂分化(图 4A)。油红定量结果显示,CC-671 对于 3T3-L1 细胞分化的抑制效果呈现剂量依赖性(图 4B)。以上结果表明,3T3-L1 细胞成脂分化的正常进行依赖 CLK2 的激酶活性。

2.10 CLK2 抑制剂显著抑制了 3T3-L1 细胞的胰岛素敏感性

我们对 FB23-2 和 CC-671 处理后的 3T3-L1 细胞进行胰岛素刺激。结果显示,FB23-2 处理后的细胞 AKT 磷酸化几乎被完全抑制(图 4C,D);CC-671 处理后的细胞 AKT 磷酸化水平在 0.2,0.4,0.8 和 1.6 mM 胰岛素刺激下相比对照组均显著降低(图 4E,F)。以上结果表明 FTO 的去甲基化酶活性抑制和 CLK2 的激酶活性抑制均能降低胰岛素刺激下 AKT 通路的活性,进而抑制 3T3-L1 细胞的成脂分化。

3 讨论

m6A 是真核生物 mRNA 中最常见的修饰之一,其在基因表达调控中扮演着重要角色^[23,24]。近年来,m6A 修饰在脂肪生

成和分化过程中的作用逐渐受到关注,成为代谢性疾病研究的热点^[25,26]。FTO 是关键的 m6A 去甲基化酶,其活性与脂肪生成和肥胖的发生发展密切相关。研究表明,FTO 通过去甲基化作用改变脂代谢相关基因的 mRNA 加工和翻译,促进前脂肪细胞向成熟脂肪细胞的分化^[25,27,28]。此外,在肝脏中,FTO 的过表达促进了脂肪生成和脂滴增大,通过 SREBP1C 途径抑制脂肪酸氧化,导致脂质过度储存和非酒精性脂肪肝疾病的发展^[29]。而在脂肪中,FTO 通过 C/EBP- β 通路增强前脂肪细胞分化,并影响相关基因的表达和剪接,促进脂肪生成和脂肪沉积^[30]。基于目前报道,FTO 在脂肪的分化与脂质积累过程中尚有充足的研究潜力,并且随着下游基因的发现,FTO 对脂肪的调控途径被不断补充完善。本研究利用 3T3-L1 细胞的成脂分化潜力^[31]来探究 m6A 修饰和 FTO 对脂肪分化调控的新途径。

本研究首先验证了 m6A 去甲基化酶 FTO 在 3T3-L1 细胞成脂分化过程中上调表达,这与部分研究报道的结果一致^[32],然而与之不同的是,我们首次在 FTO 的蛋白水平定量中发现分化早期(第 1-2 天)FTO 的蛋白水平有短暂性下调,这可能意味着 FTO 对成脂分化过程有着更精细的调控节律。对于 FTO 在 3T3-L1 成脂分化调控过程中的功能定位,我们应用特异性抑制剂 FB23-2 处理细胞并进行成脂分化诱导,通过结果证明了 FTO 的 m6A 去甲基化功能对成脂分化过程必不可少。

目前基于 3T3-L1 成脂分化过程的 m6A 甲基化图谱已有诸多报道,大量的差异化修饰基因在预示着 FTO 深度参与成脂分化调控的同时,也为我们的 FTO 下游基因选择提供了足够的空间^[33]。在上述候选基因中,我们发现 CLK2 m6A 甲基化的时间变化模式与 FTO 在成脂分化过程中的变化模式有一定相关性,进而我们通过 MeRIP 证实了 CLK2 mRNA 5'UTR 区域的 m6A 修饰受到了 FTO 的调控,即上述位点的 m6A 修饰是 FTO 的去甲基化酶活性靶点之一。与此同时,我们通过 3T3-L1 的 FTO 抑制剂模型和 FTO 过表达模型验证了 CLK2 的表达与 FTO 的表达存在正相关性,也即 CLK2 mRNA 上的 m6A 修饰负向调控 CLK2 的蛋白表达水平。

对于 FTO 正向调控 CLK2 表达的分子机制,我们根据 FTO 对 CLK2 mRNA 水平和蛋白水平的双重影响推测,FTO 可能通过 m6A 修饰在转录水平之后到翻译水平之前,对 CLK2 mRNA 进行调控。我们随后应用放线菌素 D 对 mRNA 的降解动力学探究证实了 FTO 通过去除 CLK2 mRNA 5'UTR 区域的 m6A,延长了 CLK2 mRNA 在胞质中的半衰期,进而使其能够翻译出更多的 CLK2 蛋白,对 3T3-L1 的成脂分化产生促进效果。值得注意的是,m6A 对 mRNA 命运的影响取决于结合 mRNA 的 m6A reader 种类,目前已知能够影响 mRNA 降解速率的 readers 包括 YTHDF 家族和 IGF2BP 家族等^[34,35]。此外,不同的 m6A writer 和 m6A reader 家族有着差异化的 RNA 保守识别基序^[36],本研究有待进一步明确 CLK2 mRNA 5'UTR 的 m6A 修饰基序,以确定此处功能性 m6A 修饰的来源(writer)和 mRNA 降解的执行人(reader)。

最后,我们验证了 CLK2 参与 3T3-L1 细胞成脂分化途径的调控。我们首先在分化过程中验证了 CLK2 与 FTO 高度相似的表达模式,这与前述的 FTO-CLK2 正向调控模式高度符合,且 CLK2 的抑制也产生了与 FTO 抑制相似的细胞分化结

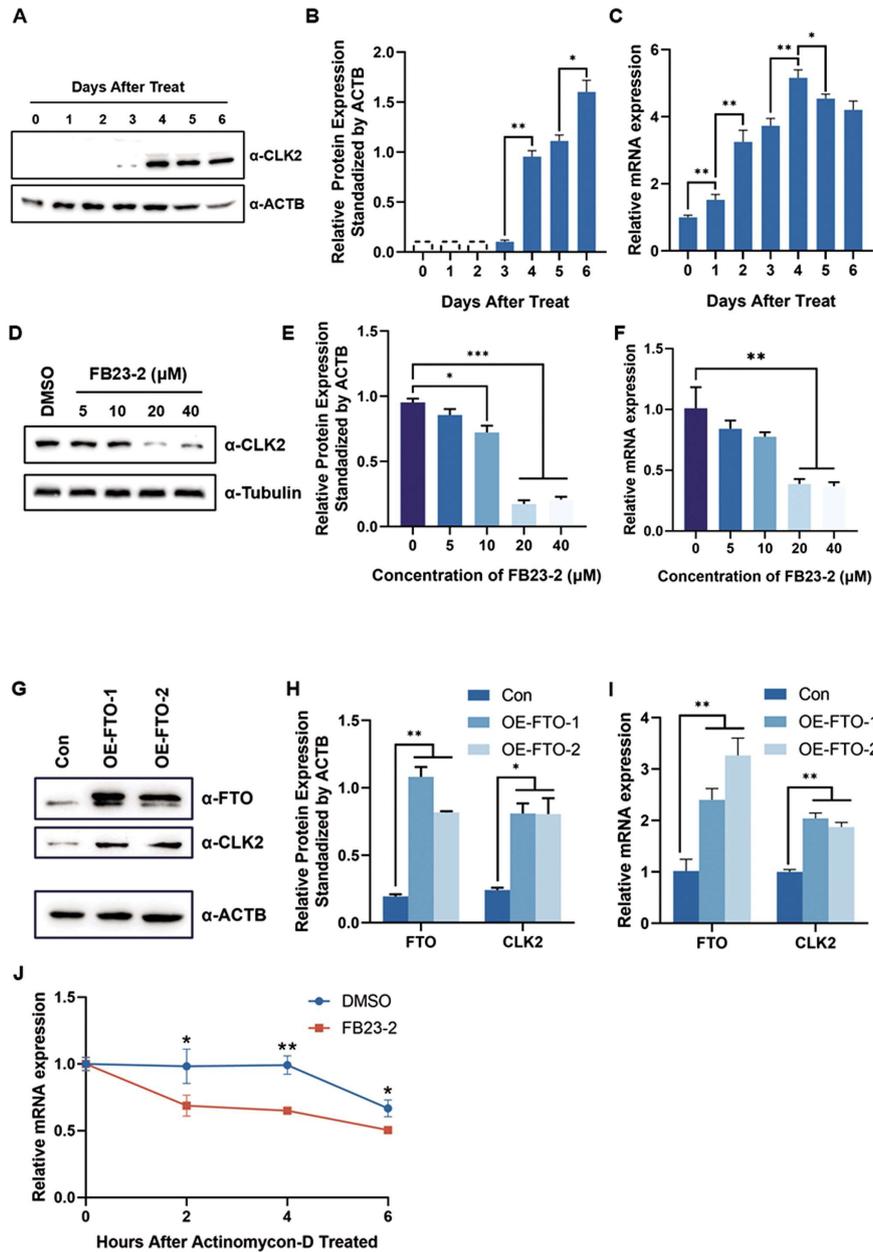


图 3 FTO 通过 mRNA 降解速率影响 CLK2 表达

Fig. 3 FTO affects CLK2 expression through mRNA degradation rate

(A) 蛋白免疫印迹检测 3T3-L1 细胞成脂分化第 0~6 天的 CLK2 蛋白水平; (B) 蛋白免疫印迹检测 CLK2 蛋白水平的条带灰度值定量, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$; (C) 实时荧光定量 PCR 检测 3T3-L1 细胞成脂分化第 0~6 天的 CLK2 mRNA 水平, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$; (D) 蛋白免疫印迹检测 FB23-2 处理后 3T3-L1 细胞的 CLK2 蛋白水平; (E) 蛋白免疫印迹检测 FB23-2 处理后 3T3-L1 细胞的 CLK2 蛋白水平的条带灰度值定量, $n=3$, $*P<0.05$, $***P<0.001$; (F) 实时荧光定量 PCR 检测 FB23-2 处理后 3T3-L1 细胞的 CLK2 mRNA 水平, $n=3$, $**P<0.01$; (G) 蛋白免疫印迹检测 FTO 过表达 3T3-L1 细胞的 CLK2 蛋白水平; (H) 蛋白免疫印迹检测 FTO 过表达 3T3-L1 细胞的 CLK2 蛋白水平的条带灰度值定量, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$; (I) 实时荧光定量 PCR 检测 FTO 过表达 3T3-L1 细胞的 CLK2 mRNA 水平; $n=3$, $**P<0.01$; (J) 实时荧光定量 PCR 检测放线菌素 D 处理后第 0, 2, 4, 6 小时 3T3-L1 细胞的 CLK2 mRNA 水平, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。

(A) The protein levels of CLK2 in 3T3-L1 cells at 0-6 days of adipogenic differentiation were detected by Western blot; (B) The band gray value quantification of CLK2 protein level was detected by Western blot, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$; (C) The CLK2 mRNA level of 3T3-L1 cells at 0-6 days of adipogenic differentiation was detected by real-time PCR, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$; (D) The protein level of CLK2 in 3T3-L1 cells after FB23-2 treatment was detected by Western blot; (E) The band gray value of CLK2 protein level of 3T3-L1 cells after FB23-2 treatment was quantified by Western blot, $n=3$, $*P<0.05$, $***P<0.001$; (F) The CLK2 mRNA level of 3T3-L1 cells after FB23-2 treatment was detected by real-time PCR, $n=3$, $**P<0.01$; (G) the CLK2 protein level of FTO overexpressing 3T3-L1 cells was detected by Western blot; (H) The band gray value quantification of CLK2 protein level in FTO overexpressing 3T3-L1 cells was detected by Western blot, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$; (I) The CLK2 mRNA level of FTO overexpressing 3T3-L1 cells was detected by real-time PCR; $n=3$, $**P<0.01$; (J) The CLK2 mRNA levels of 3T3-L1 cells at 0, 2, 4, and 6 hours after actinomycin D treatment were detected by real-time PCR, $n=3$, $*P<0.05$, $**P<0.01$.

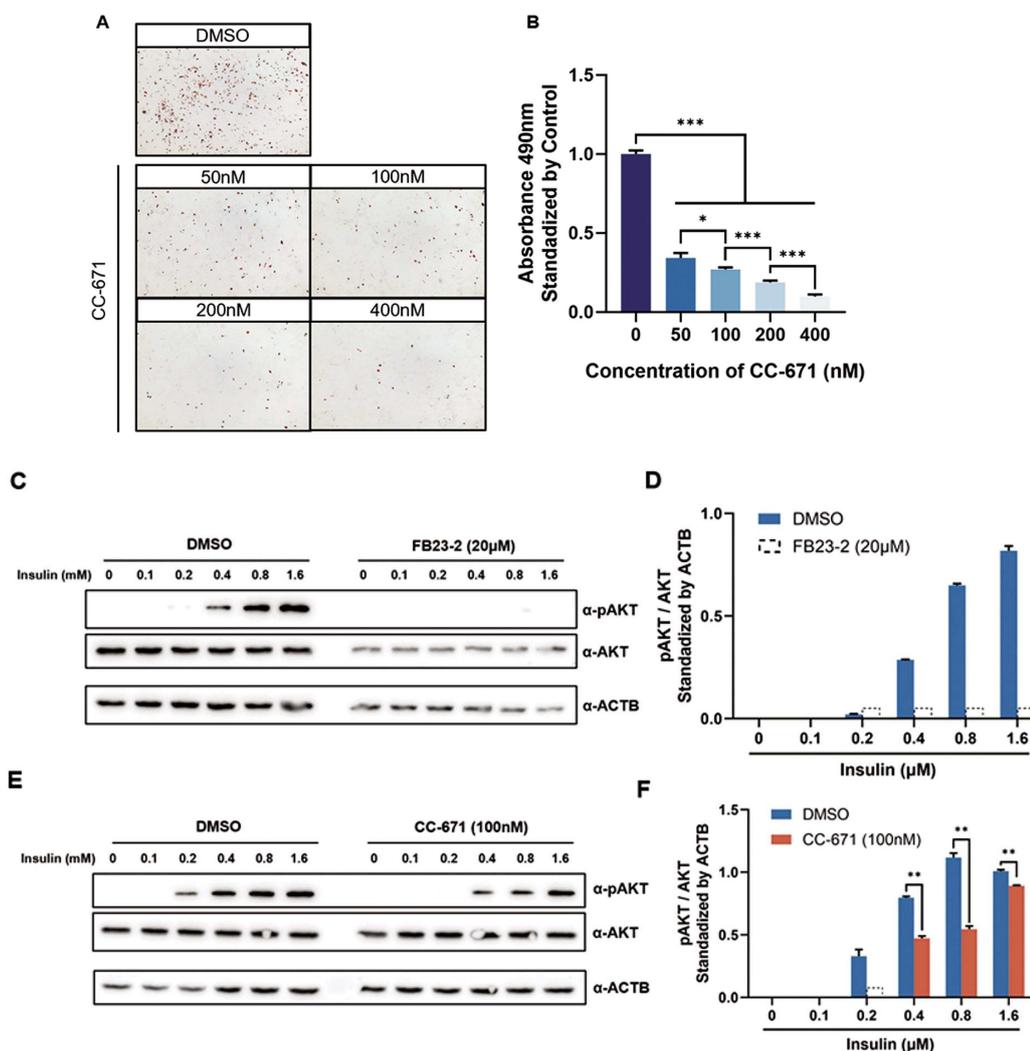


图 4 CLK2 通过胰岛素 -AKT 通路影响 3T3-L1 细胞的成脂分化

Fig. 4 CLK2 affects adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells through insulin-AKT pathway

(A)CC-671 处理后的 3T3-L1 细胞成脂分化细胞油红染色。(B)CC-671 处理后的 3T3-L1 细胞成脂分化细胞油红染色定量, $n=3$, $*P<0.05$, $***P<0.001$;(C)蛋白免疫印迹测定 FB23-2 处理后 3T3-L1 细胞的 pAKT/AKT 蛋白水平;(D)蛋白免疫印迹测定 FB23-2 处理后 3T3-L1 细胞的 pAKT/AKT 蛋白水平条带灰度值定量, $n=3$;(E)蛋白免疫印迹测定 CC-671 处理后 3T3-L1 细胞的 pAKT/AKT 蛋白水平;(F)蛋白免疫印迹测定 CC-671 处理后 3T3-L1 细胞的 pAKT/AKT 蛋白水平条带灰度值定量, $n=3$, $**P<0.01$ 。

(A) Oil red staining of adipogenic differentiated cells of 3T3-L1 cells after CC-671 treatment. (B) Quantification of oil red staining of adipogenic differentiated cells of 3T3-L1 cells after CC-671 treatment, $n=3$, $*P<0.05$, $***P<0.001$; (C) The pAKT / AKT protein levels of 3T3-L1 cells after FB23-2 treatment were determined by Western blot; (D) The pAKT / AKT protein levels of 3T3-L1 cells after FB23-2 treatment were determined by Western blot, and the gray value of the bands was quantified, $n=3$; (E) the pAKT / AKT protein levels of 3T3-L1 cells after CC-671 treatment were determined by Western blot; (F) The pAKT/AKT protein level of 3T3-L1 cells after CC-671 treatment was quantified by Western blot, $n=3$, $**P<0.01$.

果。根据 Pauli 等的报道^[37-39],我们推测 CLK2 通过胰岛素 -AKT 通路影响了 3T3-L1 细胞对于胰岛素信号的响应,进而影响了分化途径的开启。我们通过外源性胰岛素刺激后的 pAKT/AKT 蛋白定量发现了 CLK2 抑制后 3T3-L1 细胞对胰岛素的反应性下降,这会导致胰岛素 -AKT 通路末端的大量基因表达受到抑制,包括成脂分化必须的基因^[40,41]。

综上,我们首次报道了 CLK2 作为 FTO 的下游基因,在 m6A 修饰的介导下通过 mRNA 降解的方式受到 FTO 的调控,进而影响了脂肪前体细胞的成脂分化效率。

基于上述发现,在未来的研究中我们将进一步探索 CLK2 mRNA 上的 m6A 修饰由何种 m6A writer 写入,又由何种 m6A

reader 读取,以构成调控 CLK2 mRNA 完整的 writer-eraser-reader 轴,从而揭示 CLK2 调控脂肪分化的完整 m6A 依赖性途径。

参考文献(References)

- [1] CHEN L, GAO Y, XU S, et al. N6-methyladenosine reader YTHDF family in biological processes: Structures, roles, and mechanisms[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1162607.
- [2] HUANG H L, WENG H Y, SUN W J, et al. Recognition of RNA -methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation (vol 20, pg 285, 2018)[J]. Nat Cell Biol, 2020, 22(10): 1288-1288.
- [3] BOCCALETTO P, STEFANIAK F, RAY A, et al. MODOMICS: a

- database of RNA modification pathways. 2021 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(D1): D231-d235.
- [4] LIU J, DO X Y, CHEN C Y, et al. N6-methyladenosine of chromosome-associated regulatory RNA regulates chromatin state and transcription[J]. *Science*, 2020, 367(6477): 580-586.
- [5] SHI H L, WEI J B, HE C. Where, When, and How: Context-Dependent Functions of RNA Methylation Writers, Readers, and Erasers[J]. *Mol Cell*, 2019, 74(4): 640-650.
- [6] VAN TRAN N, ERNST F G M, HAWLEY B R, et al. The human 18S rRNA m6A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(15): 7719-7733.
- [7] PENDLETON K E, CHEN B, LIU K, et al. The U6 snRNA m(6A) Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention[J]. *Cell*, 2017, 169(5): 824-835. e814.
- [8] ZHENG G Q, DAHL J A, NIU Y M, et al. ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility[J]. *Mol Cell*, 2013, 49(1): 18-29.
- [9] JIA G F, FU Y, ZHAO X, et al. 6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(12): 885-887.
- [10] WU B X, SU S C, PATIL D P, et al. Molecular basis for the specific and multivalent recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 420.
- [11] WANG X, ZHAO B S, ROUNDTREE I A, et al. N6-methyladenosine Modulates Messenger RNA Translation Efficiency[J]. *Cell*, 2015, 161(6): 1388-1399.
- [12] SUN M L, ZHAN G X A. Epigenetic regulation of N6-methyladenosine modifications in obesity[J]. *J Diabetes Invest*, 2021, 12(8): 1306-1315.
- [13] HAN X, GUO J, FAN Z. Interactions between m6A modification and miRNAs in malignant tumors[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6): 598.
- [14] XU Z J, PENG B, CAI Y, et al. N6-methyladenosine RNA modification in cancer therapeutic resistance: Current status and perspectives[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 182: 114258.
- [15] LIU N, PAN T. N6-methyladenosine-encoded epitranscriptomics[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23(2): 98-102.
- [16] WU R, CHEN Y, LIU Y, et al. m6A methylation promotes white-to-beige fat transition by facilitating Hif1a translation [J]. *EMBO Rep*, 2021, 22(11): e52348.
- [17] WANG Y, GAO M, ZHU F, et al. METTL3 is essential for postnatal development of brown adipose tissue and energy expenditure in mice [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1648.
- [18] XIAO W, ADHIKARI S, DAHAL U, et al. Nuclear m6A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing[J]. *Mol Cell*, 2016, 61(4): 507-519.
- [19] ROUNDTREE I A, LUO G Z, ZHANG Z J, et al. YTHDC1 mediates nuclear export of N6-methyladenosine methylated mRNAs [J]. *Elife*, 2017, 6: e31311.
- [20] HSU P J, ZHU Y F, MA H H, et al. Ythdc2 is an N6-methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis [J]. *Cell Research*, 2017, 27(9): 1115-1127.
- [21] SHI H L, WANG X, LU Z K, et al. YTHDF3 facilitates translation and decay of N6-methyladenosine-modified RNA [J]. *Cell Research*, 2017, 27(3): 315-328.
- [22] ZHAO X, YANG Y, SUN B F, et al. FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis[J]. *Cell Res*, 2014, 24(12): 1403-1419.
- [23] DE JESUS D F, ZHANG Z J, KAHRAMAN S, et al. m6A mRNA methylation regulates human β -cell biology in physiological states and in type 2 diabetes[J]. *Nat Metab*, 2019, 1(8): 765-774.
- [24] WU R, GUO G, BI Z, et al. m(6A) methylation modulates adipogenesis through JAK2-STAT3-C/EBP β signaling [J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2019, 1862(8): 796-806.
- [25] YAN S J, ZHOU X L, WU C L, et al. Adipocyte YTH N(6)-methyladenosine RNA-binding protein 1 protects against obesity by promoting white adipose tissue beiging in male mice[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1).
- [26] ZHANG X, YIN H, ZHANG X, et al. N6-methyladenosine modification governs liver glycogenesis by stabilizing the glycogen synthase 2 mRNA[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 7038.
- [27] WANG Y T, WANG Y J, GU J R, et al. The role of RNA m6A methylation in lipid metabolism[J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 866116.
- [28] SUN J, WANG Y, FU H, et al. Mettl3-Mediated m6A Methylation Controls Pancreatic Bipotent Progenitor Fate and Islet Formation[J]. *Diabetes*, 2024, 73(2): 237-249.
- [29] ESLAM M, VALENTI L, ROMEO S. Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact[J]. *J Hepatol*, 2018, 68(2): 268-279.
- [30] WANG X, ZHU L, CHEN J, et al. mRNA m6A methylation downregulates adipogenesis in porcine adipocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 459(2): 201-207.
- [31] WU L, XIAO X, DENG J, et al. Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on the Regulation of Free Fatty Acid Release in 3T3-L1 Cells[J]. *J Ultrasound Med*, 2024, 43(8): 1449-1460.
- [32] WU R, LIU Y, YAO Y, et al. FTO regulates adipogenesis by controlling cell cycle progression via m(6A)-YTHDF2 dependent mechanism [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018, 1863(10): 1323-1330.
- [33] ZHAO X, YANG Y, SUN B F, et al. FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis[J]. *Cell Research*, 2014, 24(12): 1403-1419.
- [34] FLORES-TÉLLEZ D, TANKMAR M D, VON BÜLOW S, et al. Insights into the conservation and diversification of the molecular functions of YTHDF proteins[J]. *PLoS Genet*, 2023, 19(10): e1010980.
- [35] CAI Y, WANG Y, MAO B, et al. Targeting insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs) for the treatment of cancer[J]. *Eur J Med Chem*, 2024, 268: 116241.
- [36] MENG J, LI J, ZHAO Y. Comprehensive analysis of lncRNAs modified by m6A methylation in sheep skin[J]. *Anim Biosci*, 2024.
- [37] MUÑOZ V R, GASPAR R C, KUGA G K, et al. Exercise decreases CLK2 in the liver of obese mice and prevents hepatic fat accumulation[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(7): 5885-5892.

炎症反应刺激等级、胶原沉积和胶原分型等组织形态学观察。在衰老模型上组织病理学染色方法结合分子病理检测手段可更加全面对聚乳酸面部填充剂临床前动物试验功效性考察。

参考文献(References)

- [1] 刘文博, 张旭, 赵鹏, 等. 可吸收聚酯类注射填充剂概况及性能评价考量[J]. 实用皮肤病学杂志, 2022, 15(4): 243-247.
- [2] 张译心, 罗倩, 梁瀚文, 等. 注射用聚左旋乳酸微球体内可促胶原再生[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(34): 5448-5453.
- [3] 龚亚辉, 王舒. 新型生物医用材料聚乳酸产业及植入应用现状研究[J]. 当代化工研究, 2024, (06): 24-26.
- [4] 王婧, 崔反东. 聚乳酸的合成及应用研究[J]. 江西化工, 2023, 39(4): 5-8.
- [5] 黄乃艳, 贾康, 刘红梅, 等. 基于聚己内酯微球的胶原刺激填充剂的基础及临床研究进展[J]. 中国美容医学, 2023, 32(10): 201-205.
- [6] 顾馨, 许宇佼, 孙家锐, 等. 成纤维细胞激活在组织纤维化、自身免疫病和肿瘤中作用的研究进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2024, 38(3): 200-210.
- [7] 毕雪婵, 吴艳. 真皮注射交联透明质酸的抗衰老机制 [J]. 临床皮肤科杂志, 2022, 51(8): 498-500.
- [8] 曾行, 王涵, 何牧野, 等. 皮肤修复材料有效性评价方法研究进展[J]. 组织工程与重建外科, 2021, 17(5): 437-441.
- [9] 白爽, 夏志宽, 敖俊红, 等. 胶原蛋白与皮肤创伤修复 [J]. 实用皮肤病学杂志, 2022, 15(5): 296-298.
- [10] 赵鹏, 史新立, 刘文博, 等. 注射填充物产品的安全性和有效性[J]. 实用皮肤病学杂志, 2021, 14(3): 167-170.
- [11] 李天任, 邵安良, 魏利娜, 等. 医疗器械临床前动物试验研究的考虑要点[J]. 中国药事, 2019, 33(10): 1121-1128.
- [12] 曹穗兰, 向健, 杨立峰, 等. 医疗器械/医用材料动物实验研究[J]. 中国医疗器械杂志, 2019, 43(1): 58-62.
- [13] 国家药品监督管理局. 《医疗器械动物试验研究注册审查指导原则第二部分 试验设计、实施质量保证》(2021年第75号). URL <httpswww.nmpa.gov.cn/yqylqxqggtg20210927153130147.html>.
- [14] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. GB/T16886.6-2022 医疗器械生物学评价 第6部分: 植入后局部反应试验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
- [15] 聂卫, 刘伟伟, 刘大卫, 等. 不同交联透明质酸复合凝胶在体内的宿主反应及基质金属蛋白酶9表达 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(10): 1557-1562.
- [16] 黄利, 李利民. 利用 Masson 染色方法原位标识凋亡肝细胞效果观察[J]. 中药药理与临床, 2023, 39(10): 74-77.
- [17] 潘恋恋, 薛先亚, 韩泉, 等. H 离子对 Masson 染色影响的机制探究与改进方法[J]. 诊断病理学杂志, 2023, 30(12): 1145-1146.
- [18] 谢文林, 唐翠兰, 连家燕. 纤维蛋白的两种特殊染色效果比较[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2023, 32(5): 507-509.
- [19] 孙炎, 苟继周, 李晓星, 等. Gomori 网染套染天狼猩红染色在肝活检中的应用[J]. 临床与实验病理学杂志, 2023, 39(1): 115-117.
- [20] 刘彤, 郑兴锋, 李海航, 等. 重组人III型胶原蛋白水凝胶对猪全层皮肤缺损创面修复的影响[J]. 中华损伤与修复杂志(电子版), 2019, 14(2): 97-102.
- [21] 陈醒, 毛乐乐, 周应芳, 等. 三种胶原纤维染色法评价宫腔粘连的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(5): 34-38.
- [22] 朱晓琳, 尚宇. 全自动免疫组织化学染色技术的应用效果分析[J]. 中国医药指南, 2022, 20(34): 17-20.
- [23] 陈学士, 褚俊, 杨利军. 免疫组织化学及特殊染色技术在法医损伤病理学鉴定中的应用[J]. 法医学杂志, 2021, 37(5): 666-672.
- [24] 张扬, 陈毅, 高建萍, 等. 猪小肠黏膜下层脱细胞基质中 I、III 型胶原检测方法研究[J]. 生物学杂志, 2020, 37(5): 108-111.
- [25] 袁野, 李佳林. 胶原蛋白检测方法研究进展 [J]. 明胶科学与技术, 2014, 34(4): 175-179.
- [26] 王伟, 姜成, 黄春明, 等. 巨噬细胞极化在椎间盘退变的作用研究现状[J]. 中国矫形外科杂志, 2024, 32(8): 715-720.
- [27] 王醇怡, 刘建辉, 周建庆. M2 型巨噬细胞在冠心病病态形成中的作用及研究进展[J]. 现代实用医学, 2024, 36(4): 557-560.
- [28] 王冰倩, 夏芸. 皮肤衰老体外模型构建的组织工程策略研究进展 [J]. 中国美容整形外科杂志, 2023, 34(8): 502-505.
- [29] 周飞飞. 光响应型组织黏附性水凝胶用于软组织修复再生的研究 [D]. 浙江大学, 2020.

(上接第 3808 页)

- [38] HATTING M, RINES A K, LUO C, et al. Adipose Tissue CLK2 Promotes Energy Expenditure during High-Fat Diet Intermittent Fasting[J]. Cell Metab, 2017, 25(2): 428-437.
- [39] TABATA M, RODGERS J T, HALL J A, et al. Cdc2-like kinase 2 suppresses hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis through disruption of the PGC-1 α and MED1 complex[J]. Diabetes, 2014, 63(5): 1519-1532.
- [40] SHEARER A M, WANG Y, FLETCHER E K, et al. PAR2 promotes impaired glucose uptake and insulin resistance in NAFLD through GLUT2 and Akt interference[J]. Hepatology, 2022, 76(6): 1778-1793.
- [41] JIMÉNEZ-CHAVEZ A, MORALES-RUBIO R, SANCHEZ-GASCA E, et al. Subchronic co-exposure to particulate matter and fructose-rich-diet induces insulin resistance in male Sprague Dawley rats[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2023, 100: 104115.