

# miR-146a过表达缓解高脂饮食模型小鼠的炎症及胰岛素抵抗

毛婷婷<sup>1,2</sup> 刘叶文<sup>1</sup> 黄亚洲<sup>1</sup> 王玲玲<sup>1</sup> 金晶<sup>1,3</sup> 李伟<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 温州 325035; <sup>2</sup>温州市中心医院, 温州 325035;

<sup>3</sup>浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035)

**摘要** 该研究探讨了外源miR-146a对高脂饮食诱导的小鼠体内炎症及胰岛素抵抗的影响。使用45%高脂饲料连续喂养小鼠18周, 第5周开始尾静脉注射腺病毒载体(30  $\mu$ L), 每隔3周注射1次, 共注射5次; 第17周、18周分别对小鼠模型进行葡萄糖耐量和胰岛素耐量检测; 第19周处死小鼠后, 取血清、肝脏和附睾脂肪组织。利用酶联免疫法检测血清TNF- $\alpha$ 和IL-6含量, 并分别用Real-time PCR和免疫组化法检测肝脏和附睾脂肪组织中miR-146a和CD68表达, 同时用Western blot观察了胰岛素作用前后肝脏中Akt磷酸化水平。结果显示, 与对照组相比, 尾静脉注射miR-146a腺病毒表达载体, 可显著提高肝脏和附睾脂肪组织中miR-146a的表达水平( $P < 0.05$ ), 降低CD68表达量( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 同时显著降低血清中TNF- $\alpha$ 和IL-6含量( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 胰岛素作用之后肝脏p-Akt<sup>Ser473</sup>磷酸化水平明显升高( $P < 0.05$ ), 葡萄糖耐量和胰岛素耐量试验结果提示, 小鼠糖耐量和胰岛素敏感性均有所提高( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。研究结果表明, 通过尾静脉注射miR-146a腺病毒表达载体, 可提高小鼠体内miR-146a表达量, 从而缓解慢性炎症, 减轻胰岛素抵抗状态。

**关键词** 腺病毒; miR-146a; 高脂饮食; 慢性炎症; 胰岛素抵抗

## miR-146a Overexpression Alleviated Inflammation and Insulin Resistance in High-Fat Diet Mice

Mao Tingting<sup>1,2</sup>, Liu Yewen<sup>1</sup>, Huang Yazhou<sup>1</sup>, Wang Lingling<sup>1</sup>, Jin Jing<sup>1,3</sup>, Li Wei<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;

<sup>2</sup>Wenzhou Central Hospital, Wenzhou 325035, China;

<sup>3</sup>Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou 325035, China)

**Abstract** In this paper, the effect of exogenous miR-146a on high-fat diet-induced chronic inflammation and insulin resistance in mice was investigated. The mice models were fed with a high-fat diet (HFD, 45% calories from fat) for 18 weeks. The adenovirus products (30  $\mu$ L) were injected into mice tail veins since the 5th week, which were carried out every 3-week for 5 total injections. Then glucose tolerance tests (GTT) and insulin tolerance tests (ITT) were conducted for the mice model during the 17th and 18th weeks. After 18 weeks, serum, livers and epididymal adipose tissues were taken from mice models, followed by the measurements of inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  and IL-6 in serum via enzyme-linked immunosorbent assay, the detection of miR-146a and CD68 expressions in liver and epididymal adipose tissue via Real-time PCR and immunohistochemical, and the analysis

收稿日期: 2018-01-09 接受日期: 2018-03-06

浙江省自然科学基金(批准号: LY13H070006)和国家自然科学基金(批准号: 81170749)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0577-86699399, E-mail: liwei@wzmc.edu.cn

Received: January 9, 2018 Accepted: March 6, 2018

This work was supported by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No. LY13H070006) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 81170749)

\*Corresponding author. Tel: +86-577-86699399, E-mail: liwei@wzmc.edu.cn

网络出版时间: 2018-05-31 16:56:27 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180531.1656.012.html>

of Akt and p-Akt<sup>Ser473</sup> protein level in liver before and after insulin stimulation via Western blot, respectively. As a result, the miR-146a level over expressed ( $P<0.05$ ) while the CD68 expression decreased ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ) in liver and epididymal adipose tissues via tail intravenous injection of miR-146a adenovirus expression vector, as compared to control group. Meanwhile, the contents of TNF- $\alpha$  and IL-6 in serum significantly reduced ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Besides, the p-Akt<sup>Ser473</sup> phosphorylation in liver up-regulated after insulin treated ( $P<0.05$ ). Furthermore, GTT and ITT test results suggested that both glucose tolerance and insulin sensitivity improved ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ) in this study. These results demonstrated that tail intravenous injection of miR-146a adenovirus expression vector could improve the expression level of miR-146a *in vivo*, thus alleviate chronic inflammation and insulin resistance.

**Keywords** adenovirus; miR-146a; high-fat diet; chronic inflammation; insulin resistance

miR-146a是一个在固有免疫中发挥重要作用的非编码小分子RNA。miR-146a在细胞内可以通过负反馈调节Toll样受体4/核转录因子-kappa B(toll like receptor 4/nuclear factor-kappa B, TLR4/NF- $\kappa$ B)信号通路的关键蛋白白介素1受体关联激酶1(interleukin-1 receptor associated kinase 1, IRAK1)和肿瘤坏死因子受体相关因子6(TNF receptor associated factor 6, TRAF6),从而抑制NF- $\kappa$ B信号通路的激活<sup>[1]</sup>,进而抑制TNF- $\alpha$ 、IL-6等炎性细胞因子的产生和释放<sup>[2-3]</sup>,起到免疫抗炎的作用。研究表明,肥胖相关的慢性低度炎症是诱发2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2MD)的重要危险因素<sup>[4]</sup>。

近年来,miR-146a与T2DM的相关性研究日趋增多,资料显示,T2DM患者血浆中的miR-146a表达水平会发生改变<sup>[5-6]</sup>,在新发T2DM患者血清中miR-146a表达升高<sup>[7]</sup>,而血清中miR-146a水平下降是2型糖尿病患者体内慢性炎症发生发展的重要标志<sup>[8]</sup>。因此,为了明晰miR-146a对炎症以及胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)的影响,本实验通过尾静脉注射腺病毒载体的方法,以达到改变小鼠体内miR-146a表达水平的目的,观察其在糖尿病小鼠模型体内对高脂饮食诱导的慢性炎症和胰岛素抵抗的作用,为临床上肥胖型糖尿病的新型治疗措施提供思路和依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要材料

1.1.1 实验动物和腺病毒 实验动物为SPF级5周龄C57BL/6J雄性小鼠(购自上海实验动物中心)。含有GFP报告基因的pHBAd-U6-GFP腺病毒表达质粒以及腺病毒包装均由汉恒生物科技(上海)有限公司提供,病毒滴度为 $10^{11}$  PFU/mL。

1.1.2 主要试剂和仪器 45%高脂饲料购自江苏美

迪森生物医药有限公司。逆转录及PCR试剂(TaKaRa公司)购自宝生物工程(大连)有限公司。Bulge-Loop<sup>TM</sup> mmu-miR-146a-5p qPCR Primer Set及Bulge-Loop<sup>TM</sup> U6 snRNA qPCR Primer Set购自广州锐博生物科技有限公司。TNF- $\alpha$ 和IL-6酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司。CD68抗体购自Abcam公司。葡萄糖注射液、胰岛素由温州医科大学附属第一医院提供。Akt和p-Akt<sup>Ser473</sup>抗体购自Cell Signaling Technology公司。

CFX96实时荧光定量PCR仪及ChemiDoc<sup>TM</sup> MP成像系统购自Bio-Rad公司。Varioskan Flash酶标仪购自Thermo Fisher Scientific公司。倒置荧光显微镜购自Nikon公司。血糖检测仪及检测试纸购自强生(上海)医疗器械有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 动物模型构建 5周龄C57BL/6J雄性小鼠( $n=28$ )高脂饮食(high-fat diet, HFD)喂养4周后,分组处理如下:(1)尾静脉注射pri-miR-146a腺病毒(过表达miR-146a,  $n=12$ );(2)尾静脉注射shuffling片段腺病毒(NC,  $n=8$ );(3)尾静脉注射生理盐水(NS,  $n=8$ )。单次注射剂量为30  $\mu$ L,每3周注射1次,共5次。HFD喂养期间每周检测体重,第19周处死小鼠进行相关指标检测(图1)。

1.2.2 Real-time PCR检测肝脏和附睾脂肪组织miR-146a表达 Trizol裂解法提取肝脏和附睾脂肪组织的总RNA,琼脂糖凝胶电泳检测其质量,测定并调整RNA浓度之后进行逆转录。RNA逆转录反应严格按照TaKaRa公司逆转录试剂盒说明书进行操作,各组以等量RNA为起始模板,合成cDNA。用TaKaRa公司荧光定量PCR试剂盒进行Real-time PCR,设置反应条件如下:95  $^{\circ}$ C预变性30 s;95  $^{\circ}$ C变性5 s,60  $^{\circ}$ C退

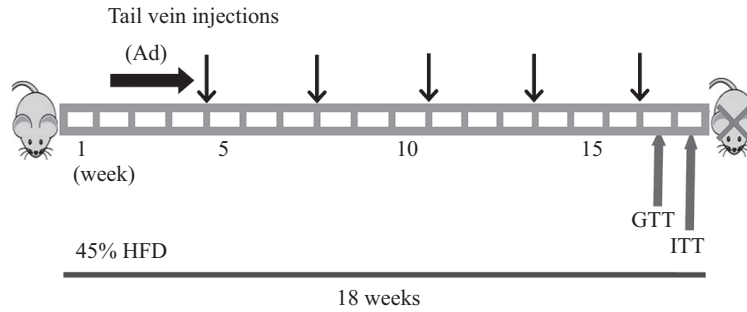


图1 动物模型构建示意图

Fig.1 Schema of establishing mice models

火延伸30 s, 共40个循环, 在CFX96定量PCR仪上扩增并检测。分析扩增曲线和融解曲线以确保反应特异性, 以U6 snRNA为内参, 按照 $\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因相对表达量。

**1.2.3 ELISA检测血清TNF- $\alpha$ 和IL-6含量** 收集小鼠血清, 使用小鼠TNF- $\alpha$ 和IL-6 ELISA检测试剂盒检测各血清样本中TNF- $\alpha$ 和IL-6的含量, 具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。

**1.2.4 免疫组化(immunohistochemical, IHC)检测肝脏和附睾脂肪组织中CD68表达** 肝脏和附睾脂肪组织用10%福尔马林固定后, 石蜡包埋, 制备5  $\mu\text{m}$ 厚度石蜡切片, 脱蜡复水、抗原修复、封闭, 然后依次孵育CD68一抗和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠二抗, DAB显色, 苏木素复染, 脱水后中性树胶封片, 镜检拍照。10 $\times$ 20倍镜下随机观察至少10个视野, 胞质内出现褐色为CD68阳性细胞, Imagepro plus软件分析统计阳性结果光密度值。

**1.2.5 GTT、ITT检测糖耐量及胰岛素敏感性** 用稳捷型血糖仪放入ONE TOUCH血糖试纸, 剪去小段鼠尾使其出血, 挤出一滴(约20  $\mu\text{L}$ )于试纸孔内, 即可检测出小鼠的血糖值。GTT: 小鼠禁食12 h, 检测空腹血糖, 作为0 min血糖值, 按照2 g/kg体重的葡萄糖剂量行腹腔注射后, 分别在30、60、90、120 min等4个时间点记录血糖值。ITT: 小鼠禁食6 h, 检测空腹血糖, 作为0 min血糖值, 按照0.5 U/kg体重的胰岛素剂量行腹腔注射后, 分别在15、30、60、90 min等4个时间点记录血糖值。采用Excel和SPSS 19.0软件统计分析曲线下面积(area under curve, AUC)。

**1.2.6 Western blot检测胰岛素作用前后肝脏组织p-Akt<sup>Ser473</sup>和Akt蛋白表达** 打开小鼠腹腔, 从肝右叶切取绿豆大小组织, 置于液氮中快速冷冻。按照

2 U/kg体重的胰岛素剂量行门静脉注射1 min后, 从肝左叶切取绿豆大小组织, 置于液氮中快速冷冻。提取肝脏组织总蛋白, 测定并调整浓度后加热变性, 取50  $\mu\text{g}$ 蛋白进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 采用湿转法将蛋白转至PVDF膜, 5%脱脂牛奶封闭1 h后, 分别孵育p-Akt<sup>Ser473</sup>(1:1 000稀释)、Akt(1:1 000稀释)和 $\beta$ -Actin(1:5 000稀释)一抗, 于4  $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST洗膜后, 二抗(1:1 000稀释)室温孵育1 h, TBST洗膜后, 显色曝光。

### 1.3 统计学分析

实验数据以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 形式表示, 显著性差异分析用SPSS 19.0软件进行, 采用多因素方差分析、*t*检验、Kruskal Wallis检验和Nemenyi检验等统计学方法进行数据分析,  $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

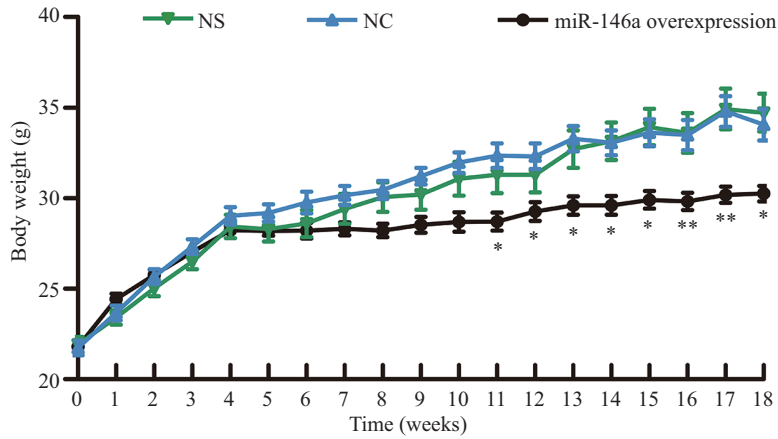
## 2 结果

### 2.1 腺病毒介导的miR-146a过表达对HFD小鼠体重增长速度的影响

为了研究miR-146a对小鼠体重的影响, 我们对小鼠的体重进行跟踪监测。在注射腺病毒载体后, 过表达miR-146a的HFD小鼠体重增长趋势缓慢, 而对照组小鼠体重迅速增加(图2), 在第12周之后, 过表达miR-146a组平均体重与其他各组出现差异( $P < 0.05$ )。采用重复测量资料方差分析统计各组数据显示, 过表达miR-146a组体重值显著低于NC对照组( $P < 0.05$ )。

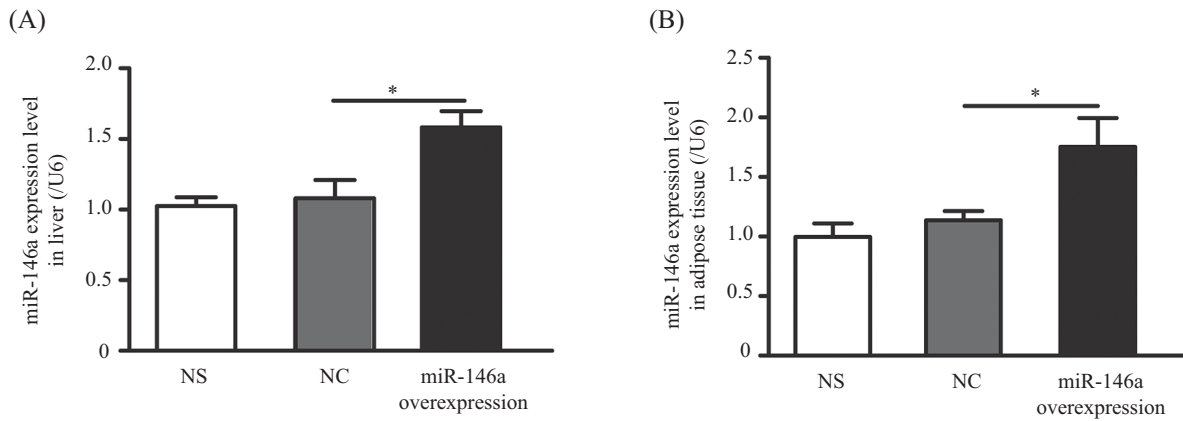
### 2.2 腺病毒介导的miR-146a过表达提高HFD小鼠体内miR-146a表达水平

Real-time PCR结果显示, 过表达miR-146a组HFD小鼠肝脏组织中miR-146a表达较NC对照组显著增高( $P < 0.05$ , 图3A)。在附睾脂肪组织中, 过表达



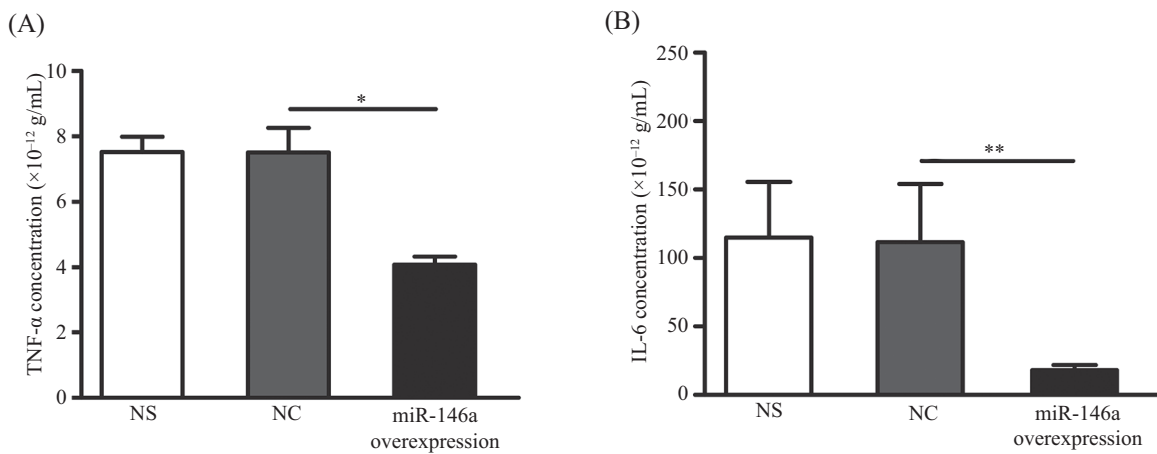
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与NC组比较。  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NC Group.

图2 HFD小鼠体重监测结果  
Fig.2 Body weight of HFD mice



A: 肝脏中miR-146a表达量; B: 附睾脂肪中miR-146a表达量。\* $P < 0.05$ 。  
A: expression of miR-146a in liver; B: expression of miR-146a in epididymal adipose tissue. \* $P < 0.05$ .

图3 肝脏和附睾脂肪组织miR-146a的相对表达量  
Fig.3 Relative expression of miR-146a in liver and epididymal adipose tissue



A: 血清中TNF-α含量; B: 血清中IL-6含量。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。  
A: concentrations of TNF-α in serum; B: concentrations of IL-6 in serum. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

图4 血清中炎症细胞因子的含量  
Fig.4 Concentrations of inflammatory cytokines in serum

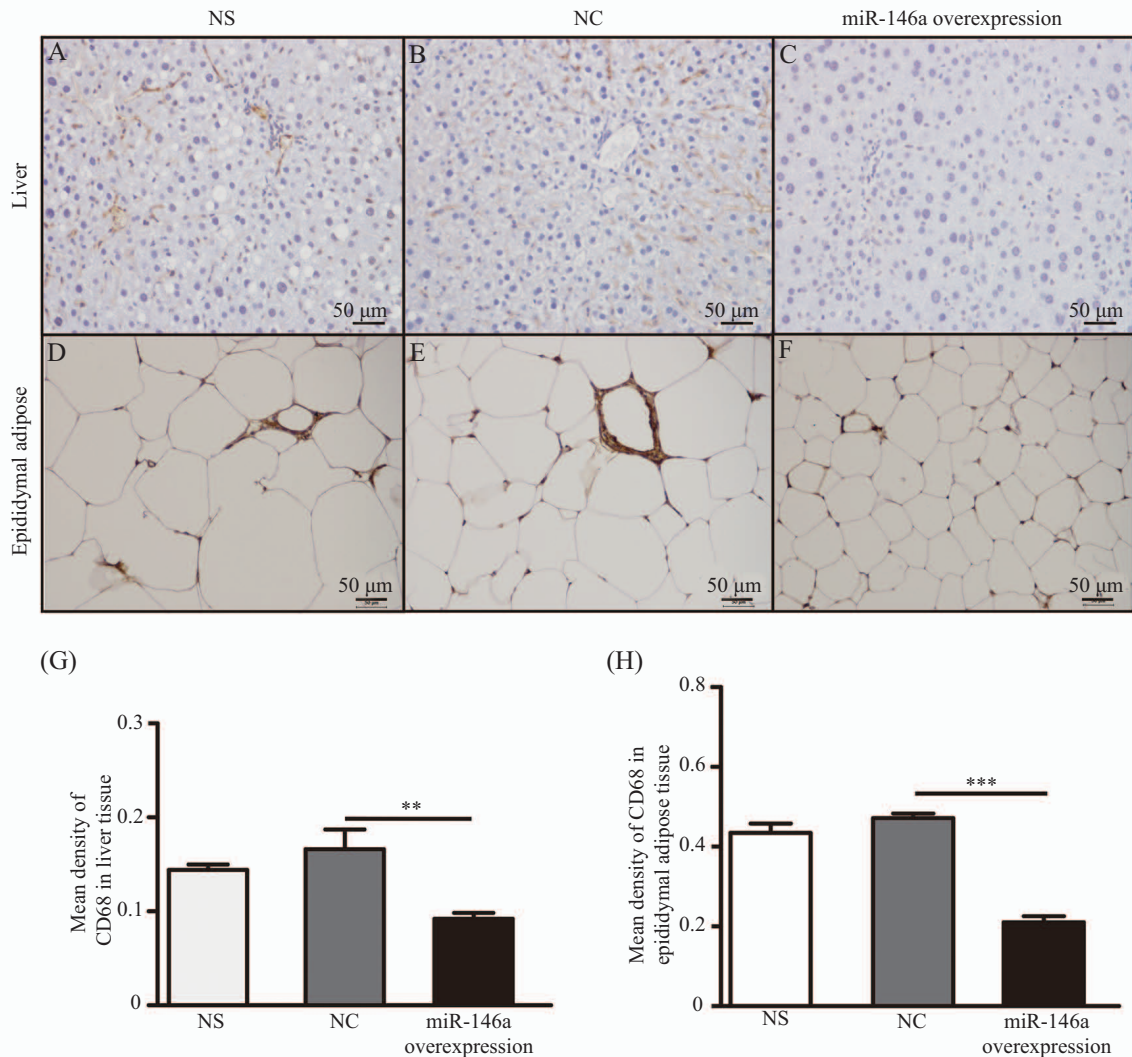
miR-146a组小鼠miR-146a表达较NC对照组同样显著增高( $P<0.05$ , 图3B)。

### 2.3 miR-146a对HFD小鼠血清中TNF- $\alpha$ 和IL-6含量的影响

采用ELISA检测HFD小鼠血清中炎症细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL-6的含量。结果显示,与NC对照组比较,过表达miR-146a组两个细胞因子含量均显著降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ , 图4)。

### 2.4 miR-146a对HFD小鼠肝脏和附睾脂肪组织中CD68表达的影响

IHC结果显示,与NC对照组相比,过表达miR-146a的HFD小鼠肝脏组织中CD68表达水平显著降低( $P<0.001$ ),提示Kupffer细胞减少(图5A、图5B、图5C、图5G)。而在附睾脂肪组织中,同样可见过表达miR-146a组CD68表达量显著低于NC对照组( $P<0.001$ ),表明巨噬细胞浸润下降(图5D、图5E、

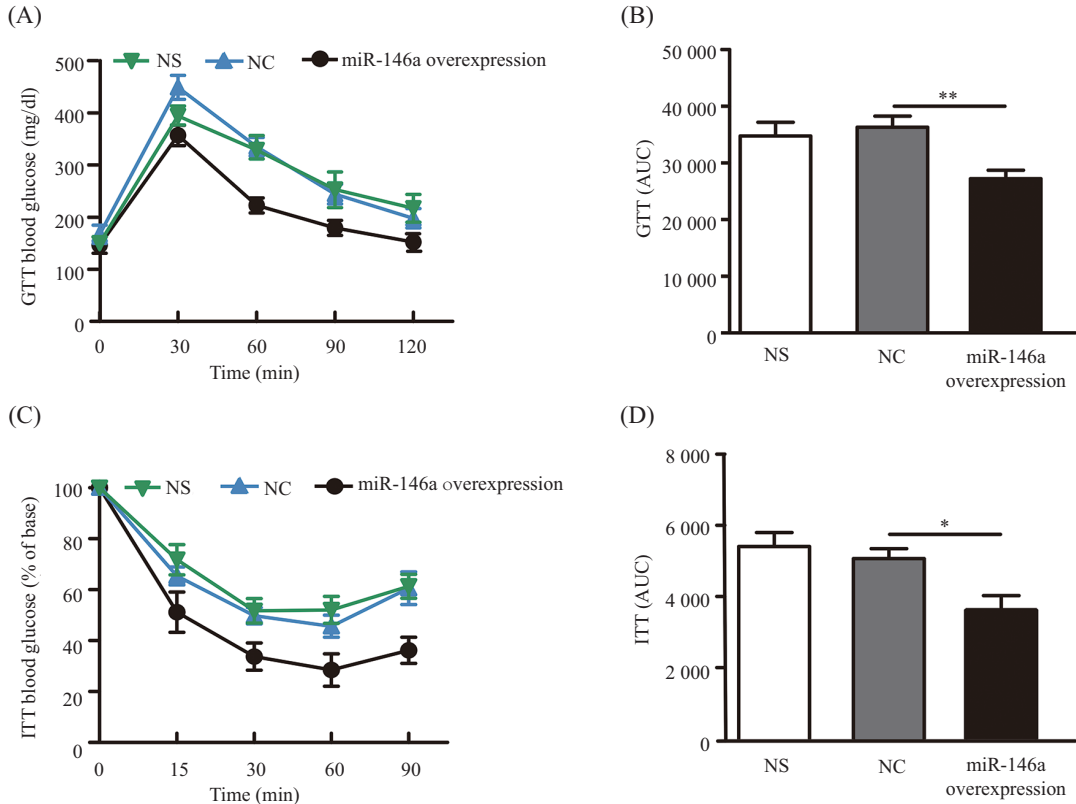


A: NS组小鼠肝脏组织CD68表达情况(CD68阳性Kupffer细胞呈褐色); B: NC组小鼠肝脏组织CD68表达情况(CD68阳性Kupffer细胞呈褐色); C: miR-146a过表达组小鼠肝脏组织CD68表达情况(CD68阳性Kupffer细胞呈褐色); D: NS组小鼠附睾脂肪组织CD68表达情况(CD68阳性巨噬细胞呈褐色); E: NC组小鼠附睾脂肪组织CD68表达情况(CD68阳性巨噬细胞呈褐色); F: miR-146a过表达组小鼠附睾脂肪组织CD68表达情况(CD68阳性巨噬细胞呈褐色); G: 肝脏组织CD68光密度均值统计结果; H: 附睾脂肪组织CD68光密度均值统计结果。 \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

A: expression of CD68 in liver tissue of NS group (CD68 positive Kupffer cells appeared brown); B: expression of CD68 in liver tissue of NC group (CD68 positive Kupffer cells appeared brown); C: expression of CD68 in liver tissue of miR-146a overexpression group (CD68 positive Kupffer cells appeared brown); D: expression of CD68 in epididymal adipose tissue of NS group (CD68 positive macrophages appeared brown); E: expression of CD68 in epididymal adipose tissue of NC group (CD68 positive macrophages appeared brown); F: expression of CD68 in epididymal adipose tissue of miR-146a overexpression group (CD68 positive macrophages appeared brown); G: mean density of CD68 in liver; H: mean density of CD68 in epididymal adipose tissue. \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

图5 肝脏和附睾脂肪组织中CD68免疫组化结果

Fig.5 Expression of CD68 in liver and epididymal adipose tissue detected by IHC

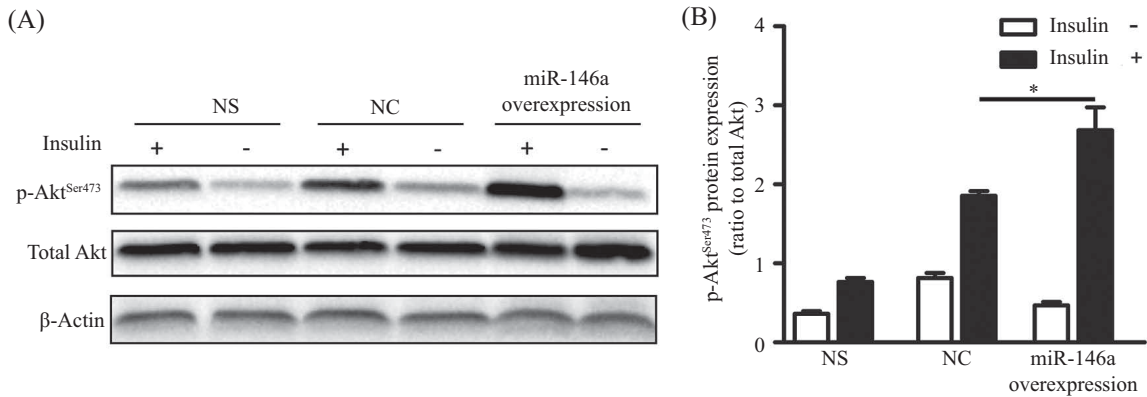


A: GTT结果; B: GTT曲线下面积统计结果; C: ITT结果; D: ITT曲线下面积统计结果。\*P<0.05, \*\*P<0.01。

A: the results of GTT; B: the statistical analysis results of AUC from GTT; C: the results of ITT; D: the statistical analysis results of AUC from ITT. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

图6 葡萄糖耐量和胰岛素耐量检测结果

Fig.6 The results of GTT and ITT



A: 肝脏p-Akt<sup>Ser473</sup>、Akt蛋白表达情况; B: p-Akt<sup>Ser473</sup>/Akt蛋白表达量分析柱状图。\*P<0.05。

A: expression of p-Akt<sup>Ser473</sup> and Akt in liver; B: the statistical analysis results of p-Akt<sup>Ser473</sup>/Akt. \*P<0.05.

图7 胰岛素作用前后Akt磷酸化水平变化

Fig.7 The protein levels of p-Akt<sup>Ser473</sup> before and after insulin stimulation

图5F、图5H)。

### 2.5 miR-146a对HFD小鼠糖耐量和胰岛素敏感性的影响

GTT结果显示, 过表达miR-146a组HFD小鼠在30、60、90、120 min等4个时间点的血糖值均低于NC对照组(图6A)。AUC分析表明, 两组差异具有统

计学意义( $P<0.001$ , 图6B)。ITT结果显示, 过表达miR-146a组HFD小鼠在15、30、60、90 min时, 血糖值均低于NC对照组(图6C)。AUC分析表明, 两组差异具有统计学意义( $P<0.05$ , 图6D)。

在门静脉注射胰岛素刺激1 min时, 过表达miR-146a组HFD小鼠肝脏中p-Akt<sup>Ser473</sup>磷酸化水平与NC

对照组相比显著升高( $P < 0.05$ , 图7)。

### 3 讨论

肥胖相关的慢性炎症是引起胰岛素抵抗和T2DM的重要原因<sup>[9-10]</sup>。本研究中通过尾静脉注射的方式, 分别将携带pri-miR-146a和shuffling片段的腺病毒表达载体注入HDF小鼠体内。pri-miR-146a在细胞内经过剪切加工成为miR-146a, 在小鼠体内模拟miR-146a的高表达状态。因此miR-146a表达检测结果显示, 过表达miR-146a组miR-146a的表达量与对照组相比显著升高。

通过ELISA检测各组小鼠血清中炎症细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL-6的含量, 结果显示, 腺病毒介导的miR-146a过表达组的小鼠, 该细胞因子的表达显著下降。我们推测, miR-146a可能通过负反馈调节IRAK1和TRAF6抑制NF- $\kappa$ B信号通路的激活, 进而抑制炎症因子的产生和释放, 提示miR-146a可以起到缓解体内炎症的作用。巨噬细胞是肥胖诱导炎症和胰岛素抵抗的重要媒介<sup>[11]</sup>, 肝脏Kupffer细胞是定位于肝血窦的单核-巨噬细胞, 两者与非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病机制密切相关<sup>[12-13]</sup>。过表达miR-146a组肝脏CD68表达量明显低于对照组, 猜测miR-146a可能通过抑制细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL-6的产生, 进而减少肝脏中Kupffer细胞的数量, 缓解肝脏组织的炎症状态。同时, HFD诱导的IR与脂肪组织巨噬细胞的激活紧密相关, 在脂肪组织中, TNF- $\alpha$ 等细胞因子刺激单核细胞释放单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1), 从而诱导脂肪组织中的巨噬细胞聚集, 引起慢性炎症和IR<sup>[14]</sup>。因此, 在附睾脂肪组织中可见过表达miR-146a组的巨噬细胞明显减少。上述结果表明, 通过尾静脉注射miR-146a腺病毒表达载体, 增加小鼠体内miR-146a的表达量, 进而降低肝脏组织Kupffer细胞和脂肪组织巨噬细胞的数量, 缓解HFD诱导的炎症浸润状态。

TNF- $\alpha$ <sup>[10,15]</sup>和IL-6<sup>[16]</sup>等炎症细胞因子参与了与IR相关的多个重要信号通路, 其通过活化c-Jun氨基末端激酶<sup>[17]</sup>(c-Jun N-terminal kinase, JNK)和I $\kappa$ B激酶 $\beta$ (inhibitor kappa B kinase  $\beta$ , IKK $\beta$ )<sup>[18]</sup>等蛋白激酶, 促进胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS)丝氨酸/苏氨酸磷酸化, 阻碍其酪氨酸的磷酸化, 抑制IRS激活, 影响磷脂酰肌醇-3-羟激酶

(phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase, PI3K)的p85亚单位与IRS的结合和PI3K的磷酸化, 抑制IRS/PI3K/Akt胰岛素信号通路的转导, 导致IR的发生<sup>[2,19,20]</sup>。本实验中, 尾静脉注射miR-146a腺病毒表达载体可显著降低高脂饮食小鼠血清炎症细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL-6的含量。研究表明, 缺乏TNF- $\alpha$ 的肥胖小鼠, 其胰岛素敏感性要明显高于正常野生型肥胖小鼠<sup>[15]</sup>。因此, GTT、ITT结果表明, 过表达miR-146a组小鼠体内葡萄糖耐量和胰岛素敏感性明显提高, 全身IR状态得到有效缓解。在胰岛素刺激后, 过表达miR-146a组小鼠的肝脏组织内Akt磷酸化水平升高较对照组更为明显, 提示miR-146a表达增加能够促进肝脏胰岛素信号通路的激活。此外, 抗炎药物也能够改善机体胰岛素抵抗状态<sup>[21-22]</sup>。因此, 体内高表miR-146a可通过降低炎症的发生进而缓解胰岛素抵抗。

肥胖是发生T2DM的重要危险因素之一, 长期肥胖的人群, 2型糖尿病的患病率明显增加。尾静脉注射miR-146a腺病毒表达载体可以抑制高脂饮食诱导的小鼠体重的迅速增长, 那么pri-miR-146a腺病毒载体进入体内之后, 是否可以通过调控脂肪细胞分化, 影响肥胖产生, 而起到缓解IR的作用, 其机制需要进一步的研究和探讨。

综上所述, 采用尾静脉注射miR-146a腺病毒表达载体的方法, 可以通过提高HFD小鼠体内miR-146a表达量, 减轻体内慢性炎症, 缓解胰岛素抵抗, 抑制肥胖的产生。这对于临床防治2型糖尿病具有重要价值, 提示miR-146a可作为治疗肥胖型2型糖尿病的新型药物。

### 参考文献 (References)

- 1 Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(33): 12481-6.
- 2 Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. Science 1996; 271(5249): 665-8.
- 3 Pauley KM, Satoh M, Chan AL, Bubb MR, Reeves WH, Chan EK. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. Arthritis Res Ther 2008; 10(4): R101.
- 4 Festa A, D'Agostino RJr, Tracy RP, Haffner SM. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. Diabetes 2002; 51(4): 1131-7.

- 5 Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, *et al.* Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetol* 2011; 48(1): 61-9.
- 6 Balasubramanyam M, Aravind S, Gokulakrishnan K, Prabu P, Sathishkumar C, Ranjani H, *et al.* Impaired miR-146a expression links subclinical inflammation and insulin resistance in type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem* 2011; 351(1/2): 197-205.
- 7 Rong Y, Bao W, Shan Z, Liu J, Yu X, Xia S, *et al.* Increased microRNA-146a levels in plasma of patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 2013; 8(9): e73272.
- 8 Baldeón RL, Weigelt K, de Wit H, Ozcan B, van Oudenaren A, Sempértegui F, *et al.* Decreased serum level of miR-146a as sign of chronic inflammation in type 2 diabetic patients. *PLoS One* 2014; 9(12): e115209.
- 9 Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003; 112(12): 1821-30.
- 10 Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259(5091): 87-91.
- 11 Castoldi A, Naffah de Souza C, Câmara NO, Moraes-Vieira PM. The macrophage switch in obesity development. *Front Immunol* 2016; 6(6): 637.
- 12 Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12(46): 7413-20.
- 13 Lanthier N, Molendi-Coste O, Horsmans Y, van Rooijen N, Cani PD, Leclercq IA. Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298(1): G107-16.
- 14 Rull A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J. Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism. *Mediators Inflamm* 2010; doi: 10.1155/2010/326580.
- 15 Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- $\alpha$  function. *Nature* 1997; 389(6651): 610-4.
- 16 Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci* 2000; 67(3): 291-300.
- 17 Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420(6913): 333-6.
- 18 Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, *et al.* Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- $\beta$  and NF- $\kappa$ B. *Nat Med* 2005; 11(2): 183-90.
- 19 Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296(4): E581-91.
- 20 Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116(7): 1793-801.
- 21 Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, *et al.* Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of I $\kappa$ B. *Science* 2001; 293(5535): 1673-7.
- 22 Hundal RS, Petersen KF, Mayerson AB, Randhawa PS, Inzucchi S, Shoelson SE, *et al.* Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2002; 109(10): 1321-6.