

## 研究简报

## miR-378转基因小鼠脂肪组织的代谢表型分析

汪瑞婷<sup>1</sup> 宋懿朋<sup>2</sup> 李常银<sup>1</sup> 李虎<sup>1</sup> 贾海雪<sup>1</sup> 韩婉虹<sup>1</sup> 赵一霞<sup>1</sup> 唐惠儒<sup>3\*</sup> 张勇<sup>1\*</sup><sup>1</sup>中国医学科学院基础医学研究所, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005;<sup>2</sup>中国科学院武汉物理与数学研究所, 武汉 430071;<sup>3</sup>遗传工程国家重点实验室, 复旦大学附属中山医院, 复旦大学生命科学学院, 人类表型组研究院, 上海 200433)

**摘要** microRNA是一类小分子非编码RNA, 参与调控多种生物学过程。该研究组前期工作中揭示了microRNA-378(miR-378)在脂肪组织中通过靶向硬脂酰CoA去饱和酶1(stearoyl-CoA desaturase 1, *Scd1*)调控脂分解。为了系统明确在脂肪组织中miR-378调控的代谢通路, 该研究采用核磁共振技术分析miR-378转基因小鼠和同窝野生型对照小鼠脂肪组织的代谢组差异。两种脂肪组织三个不同部位(棕色脂肪BAT、附睾旁白色脂肪gWAT、皮下白色脂肪iWAT)的代谢组学分析结果显示: miR-378转基因小鼠BAT中甘油磷酸胆碱、胆碱、丙二酸等代谢物含量更高; 而gWAT脂肪组织中牛磺酸、丙二酸、次黄苷等代谢物含量更高; iWAT脂肪组织中牛磺酸、甘氨酸、谷氨酸、丙二酸等代谢物含量较高, 而脂质、腺嘌呤核苷(adenine nucleoside, AMP)、二磷酸核苷(nucleoside diphosphate, ADP)及三磷酸核苷(nucleoside triphosphate, ATP)等代谢物含量较低。总体上, miR-378转基因小鼠脂肪组织中脂质含量减少, 脂质分解作用及氨基酸代谢增强, 整个机体的能量代谢增强。该研究结果揭示了miR-378对脂肪组织代谢具有重要调控作用。

**关键词** miR-378; 转基因小鼠; 代谢组学分析; 核磁共振(NMR); 脂肪组织

## Metabolomics Phenotypes of Adipose Tissues from miR-378 Transgenic Mice

Wang Ruiting<sup>1</sup>, Song Yipeng<sup>2</sup>, Li Changyin<sup>1</sup>, Li Hu<sup>1</sup>, Jia Haixue<sup>1</sup>, Han Wanhong<sup>1</sup>,  
Zhao Yixia<sup>1</sup>, Tang Huiru<sup>3\*</sup>, Zhang Yong<sup>1\*</sup><sup>1</sup>The state Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China; <sup>2</sup>Wuhan Institute of Physics and Mathematics, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China;<sup>3</sup>State Key Laboratory of Genetic Engineering, Zhongshan Hospital and School of Life Sciences, Human Phenome Institute, Fudan University, Shanghai 200433, China)

**Abstract** microRNAs are small noncoding RNAs with profound physiological functions in regulating cellular metabolism, development and diseases. We have previously demonstrated that microRNA-378 (miR-378) regulates lipolysis in adipose tissues by targeting stearoyl-CoA desaturase 1 (*Scd1*). To further understand miR-378-mediated metabolic pathway(s) in adipose tissues, we analyzed the metabolic phenotypes of the adipose tissues

收稿日期: 2019-02-27 接受日期: 2019-04-24

国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2015CB943103)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 010-65105081, E-mail: yongzhang@ibms.pumc.edu.cn; huiru\_tang@fudan.edu.cn

Received: February 27, 2019 Accepted: April 24, 2019

This work was supported by the National Basic Research Program of China (Grant No.2015CB943103)

\*Corresponding authors. Tel: +86-10-65105081, E-mail: yongzhang@ibms.pumc.edu.cn; huiru\_tang@fudan.edu.cn

网络出版时间: 2019-08-12 15:54:32

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.q.20190812.1554.040.html>

from miR-378 transgenic mice (Tg) and wild type littermates (Wt) using the NMR-based metabolomics approach including brown adipose tissue (BAT), gonadal white adipose tissue (gWAT) and inguinal white adipose tissue (iWAT). The content of glycerophosphate choline, choline and malonic acid were higher in BAT adipose tissue from miR-378 Tg mice than that from Wt littermates. The content of taurine, malonic acid and hypoflavin were higher in gWAT adipose tissue from the Tg than that from Wt mice. The content of metabolites such as taurine, glycine, glutamic acid and malonic acid were higher, while lipid, adenine nucleoside (AMP), nucleoside diphosphate (ADP) and nucleoside triphosphate (ATP) were lower in iWAT adipose tissue of the Tg mice than that of Wt littermates. In general, we found that several lipid species were significantly reduced in miR-378 Tg mice compared to the Wt littermates, whereas lipolysis and amino acids metabolism were enhanced in the Tg mice compared to the Wt littermates. Together, our experimental data reveal that miR-378 plays important roles in regulating metabolisms of lipids and amino acids in adipose tissues.

**Keywords** miR-378; transgenic mice; metabolomics; nuclear magnetic resonance (NMR); adipose tissue

microRNAs(miRNAs)是一类小分子非编码单链RNA,通过转录后水平调节基因表达,参与调控多种细胞生物学和生理病理过程,包括细胞增殖、分化、凋亡和代谢<sup>[1-2]</sup>。研究表明,miR-378位于过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 共激活因子1 $\beta$ 基因(*Pparg1b*或*Pgc-1 $\beta$* )的第一个内含子内,在骨骼肌和棕色脂肪(brown adipose tissue, BAT)等代谢活跃组织中高丰度表达<sup>[3]</sup>。研究表明,miR-378在肝脏中通过靶向乙酰肉碱转移酶(carnitine O-acetyltransferase, *Crat*)和Mediator13(*MED13*)精密调节线粒体中脂肪酸的代谢<sup>[3]</sup>。肝脏miR-378作为胰岛素信号通路的一个重要制动因子,通过靶向P110 $\alpha$ 调控葡萄糖以及脂质代谢的动态平衡<sup>[4]</sup>。miR-378通过靶向磷酸二酯酶1b(phosphodiesterases 1b, PDE1b)调控棕色脂肪发育和代谢<sup>[5]</sup>。因此可见,miR-378在机体代谢调控方面发挥重要作用。

研究表明,硬脂酰CoA去饱和酶1(stearoyl-CoA desaturase 1, *Scd1*)催化单不饱和和脂肪酸的产生,调节脂肪生成和氧化之间的脂质分配<sup>[6-7]</sup>。本研究组前期工作中发现,*Scd1*的3'非翻译区含有miR-378的识别位点,miR-378通过靶向*Scd1*促进脂肪组织的脂肪分解来预防和治疗小鼠肥胖<sup>[8]</sup>。但是,miR-378在脂肪组织中是否还参与调控其他的代谢通路并不清楚。

脂肪组织在机体能量代谢稳态中发挥重要作用,对脂肪组织进行代谢组学分析可以进一步了解机体代谢调控网络。代谢组学已经成为一种被广泛应用的方法,用于从分子层面全面了解基因功能、生理和病理生理学。代谢组学分析主要采用

核磁共振、色谱-质谱联用(如LC-MS和GC-MS)及LC-DAD-NMR/MS联用等技术检测和识别新的代谢物。代谢组学分析是通过测量各种生物材料中所有可检测到的代谢物的浓度来实现<sup>[9-10]</sup>。生物材料种类包括生物流体、细胞、组织<sup>[11-12]</sup>或提取物<sup>[13]</sup>。

为了系统分析在脂肪组织中miR-378调控的代谢通路,本研究采用核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)技术对miR-378转基因小鼠和同窝野生型对照小鼠的三种脂肪组织[BAT、皮下白色脂肪(gonadal white adipose tissue, iWAT)、附睾旁白色脂肪(gonadal white adipose tissue, gWAT)]进行了代谢组学分析,揭示了miR-378在脂肪组织中对脂质分解和氨基酸代谢具有重要调控作用。

## 化学试剂

重水(D<sub>2</sub>O)和氘代三甲基硅丙酸钠[3-(trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-d<sub>4</sub> acid sodium salt, TSP]从美国剑桥同位素实验室购买。分析级别甲醇、二水合磷酸二氢钠购、高效液相色谱(high speed liquid chromatography, HPLC)级别甲醇和正己烷、三水合磷酸二氢钾购自上海国药集团化学试剂有限公司。

## 小鼠饲养与样品收集

所有动物实验均经中国医学科学院基础医学研究所动物伦理委员会批准。miR-378转基因小鼠(Tg)由南京大学模式动物研究所制备。选取性别和年龄一致的同窝野生型及转基因小鼠,给予充

足的食物和水,喂食到12周。禁食不禁水16 h以后,采用颈部脱位法处死小鼠,小心剥离BAT、iWAT、gWAT三种脂肪组织各称取50 mg,样品收集后立即液氮速冻,然后储存在-80 °C冰箱中待检。

### 小鼠脂肪组织质量统计分析

将小鼠的BAT、iWAT、gWAT脂肪组织统计好后与相应体重进行标准化,之后均将标准化的野生型小鼠的数值定义为1,对转基因小鼠对应数值再次标准化,然后作图分析。 $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ ,差异具有统计学意义。

### 样品前处理

取出冻存好的50 mg的BAT、iWAT和gWAT样品,加入600  $\mu$ L的冰甲醇/水( $V/V=2/1$ )溶液,使用组织破碎仪(QIAGEN TissueLyser II, 德国)破碎组织,组织破碎仪的频率设置为20 Hz,时间为90 s;接下来将组织破碎仪处理后的样品进行冰浴超声(超声1 min、间隔1 min,共重复3次);进而将破碎和超声处理后的样品离心(10 000 r/min、4 °C) 10 min后取上清;按上述过程重复2次,最后收集3次样品的上清液混匀,用旋转蒸发仪去除残留甲醇,然后用冷冻干燥机除水得到水相代谢物的冻干粉末。将得到的冻干粉末溶于600  $\mu$ L磷酸盐缓冲溶液[0.1 mol/L, pH=7.4, ( $K_2HPO_4:NaH_2PO_4=4:1$ 、0.1%  $NaN_3$ 、0.005% TSP、100%  $D_2O$ )],离心(10 000 r/min、4 °C) 10 min,取出550  $\mu$ L上清到NMR样品管中待检。

### 核磁共振分析检测

用NMR谱仪(Bruker, 德国)的5 mm TCI超低温探头上采集BAT、iWAT和gWAT的一维氢谱( $^1H$  NMR)。采样温度设定为298 K。在延迟等待时间(2 s)和混合时间(100 ms)期间使用预饱和和压水技术压制水峰,谱宽为12 000 Hz,累加128次,采样点数为64 k(1 k代表1 024个点)。

使用有代表性的BAT、gWAT和iWAT样品采集一系列 $^2D$  NMR谱图,对 $^1H$  NMR谱峰信号进行归属,其中包括 $J$ 分解谱( $^1H$   $J$ -Resolved spectroscopy,  $J$ -Res)、氢氢全相关谱( $^1H$ - $^1H$  total correlationspectroscopy, TOCSY)、氢碳异核多键相关谱( $^1H$ - $^{13}C$  heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy,  $^1H$ - $^{13}C$  HMBC)、氢氢相关谱( $^1H$ - $^1H$  correlation spectroscopy,

COSY)和氢碳异核单量子相关谱( $^1H$ - $^{13}C$  heteronuclear single quantum correlation spectroscopy,  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC)等,以上所提到的 $^2D$  NMR谱图全部按照参考文献[14]中提到的方法进行采集和处理。

### NMR谱图处理和多重单变量统计分析

通过添加1 Hz的线宽因子,将自由感应衰减信号(FID)进行傅里叶变换后得到NMR谱图。然后使用Topspin V 3.0软件(Bruker, 德国)对谱图进行相位和基线校正后以TSP定标( $\delta 0.00$ )。接下来,使用AMIX软件(Bruker, 德国)对谱图进行分段积分(积分的区间为 $\delta 0.50\sim 9.80$ ,积分段宽为1.2 Hz)。删除 $\delta 4.70\sim 5.12$ 区域,以消除残留水峰的影响。使用水相提取物干重对上述所得数据集进行归一化。

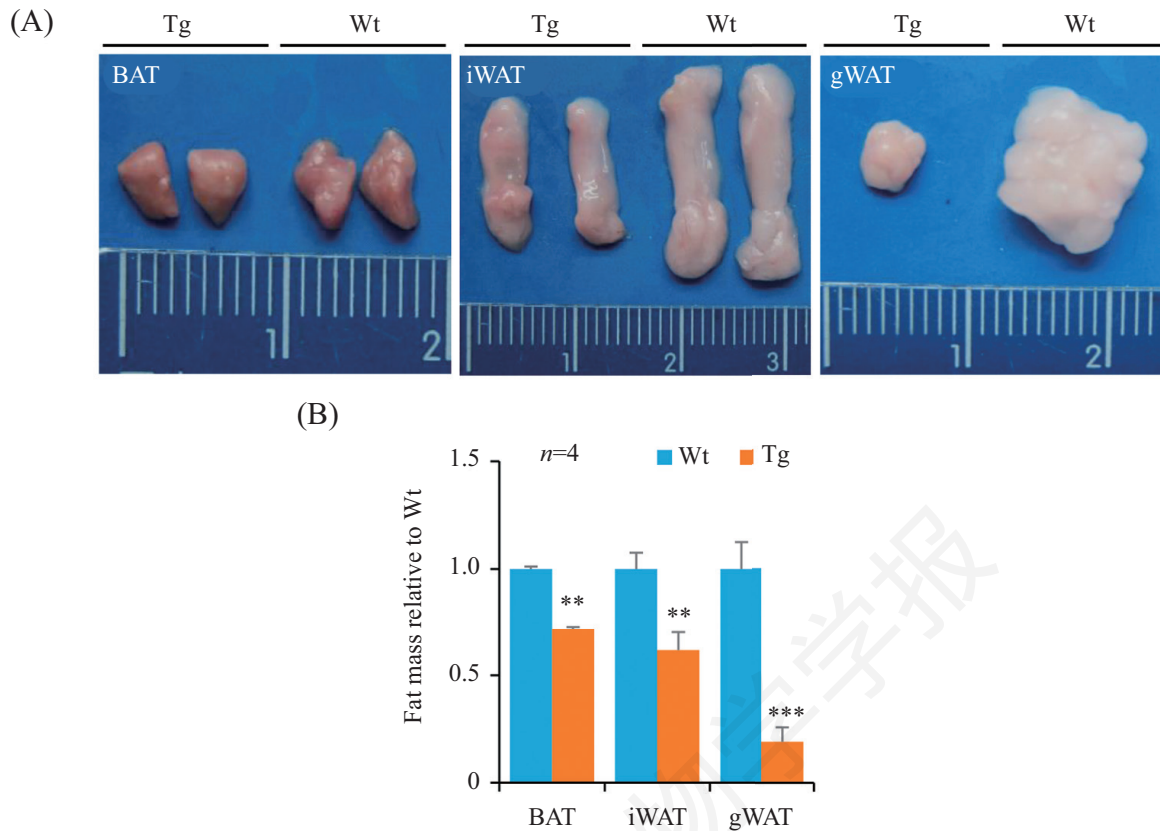
利用SIMICA-P+V 12.0软件(Umetrics, 瑞典)和MATLAB对归一化后数据集进行多变量以及单变量统计学分析。对上述数据集进行中心化(mean-center, ctr)处理后再进行主成分分析(principal component analysis, PCA)。PCA分析可以提供不同组织中不同样品代谢组的轮廓从而协助发现潜在的异常点。去除异常点后,对归一化数据集进行多重单变量数据分析(multiple univariate data analysis, MUDA)<sup>[15]</sup>,对数据集进行UV(mean-centering and scaled to unit variance)标准化处理后使用OPLSDA方法分析建模,来提取有显著性差异的变量(代谢物)。

### TargetScan软件分析

根据KEGG网站查找文中差异代谢小分子相应的分解酶,利用TargetScan软件查找miR-378潜在的靶标基因,进一步分析miR-378如何调控差异代谢小分子。

### miR-378转基因小鼠BAT、iWAT和gWAT脂肪组织重量的统计分析结果

12周龄miR-378转基因小鼠和野生型同窝对照小鼠(每组4只),颈椎脱位法处死,小心剥离三个部位的脂肪组织(BAT、iWAT和gWAT)。组织拍照、称重以后,采用液氮速冻,直到代谢组分析。脂肪组织拍照结果如图1A所示:miR-378转基因小鼠的BAT、iWAT和gWAT脂肪组织显著小于野生型小鼠。对两组小鼠的脂肪组织重量进行统计分析,结果如图1B,与野生型小鼠相比,miR-378转基因小鼠的三



A: BAT、gWAT和 iWAT组织图片; B: BAT、gWAT和 iWAT相对质量统计分析。\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与Wt组比较。

A: image of fat tissues from Tg and Wt littermates. BAT, inguinal WAT (iWAT), gonadal WAT (gWAT); B: relative fat weight of Tg and Wt mice. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with Wt.

图1 miR-378转基因小鼠(Tg)和野生型同窝对照小鼠(Wt)脂肪组织BAT、gWAT和iWAT的图片及重量统计分析

Fig.1 Image and weight analysis of BAT, gWAT and iWAT adipose tissues from miR-378 transgenic mice (Tg) and its wild type littermates (Wt)

个部位脂肪组织重量显著减少。

物含量更高。

### 棕色脂肪组织(BAT)的代谢组分析

对miR-378转基因小鼠和野生型同窝对照小鼠棕色脂肪组织的NMR谱图所检测代谢物进行归属指认; 该数据的PCA主成分分析显示较好的聚类(图2A), 差异代谢物(图2B)总结于表1中。结果表明, 与同窝野生型对照小鼠相比, miR-378转基因小鼠棕色脂肪组织中甘油磷酸胆碱、胆碱、丙二酸等代谢物含量更高, 而丙氨酸含量较低。

### 附睾旁脂肪组织(gWAT)的代谢组分析

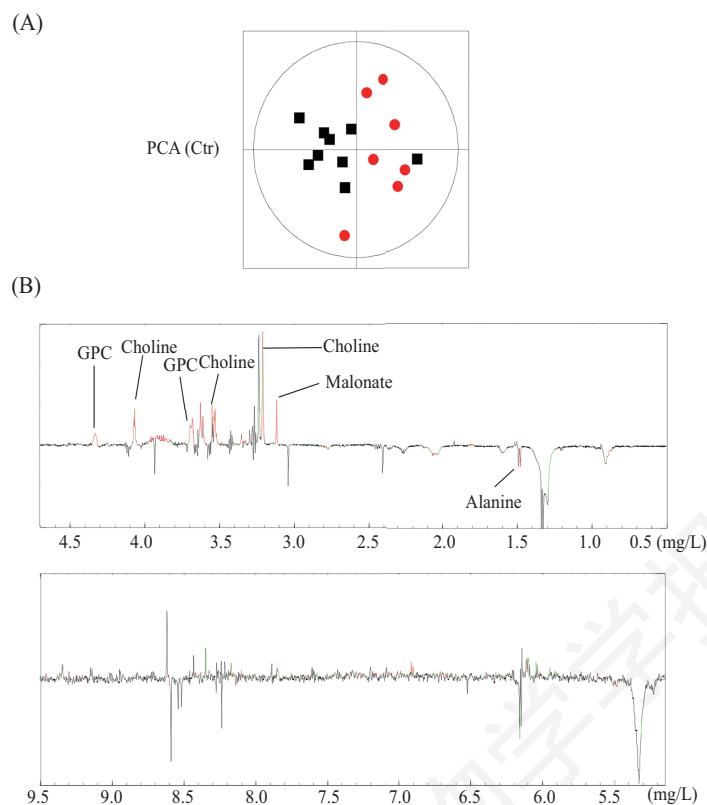
对miR-378转基因小鼠和同窝野生型对照小鼠gWAT组织的NMR谱图所检测代谢物进行归属指认; 该数据的PCA主成分分析显示较好的聚类(图3A), 差异代谢物(图3B)总结在表1中。与野生型对照小鼠相比, 转基因小鼠中牛磺酸、丙二酸、次黄苷等代谢

### 皮下脂肪组织(iWAT)的代谢组分析

对miR-378转基因小鼠和同窝野生型对照小鼠iWAT组织的NMR谱图所检测代谢物进行归属指认; 该数据的PCA主成分分析显示较好的聚类(图4A), 差异代谢物(图4B)总结在表1中。与同窝野生型对照小鼠相比, miR-378转基因小鼠中牛磺酸、甘氨酸、谷氨酸、丙二酸、甘油磷酸胆碱、胆碱、乙醇胺、次黄苷、尿苷等代谢物含量高, 而脂质、腺嘌呤核苷(AMP)、二磷酸核苷(ADP)及三磷酸核苷(ATP)等代谢物含量低。

### 差异代谢小分子与miR-378转基因小鼠表型的相关性

为了探讨差异代谢小分子与miR-378转基因小鼠脂肪表型的相关性, 本研究系统分析了差异代谢



A: BAT组织的PCA得分图, 红色圆圈代表miR-378转基因小鼠, 黑色方框代表野生型同窝对照小鼠; B: BAT组织的<sup>1</sup>H NMR差异谱, 峰图向上表示代谢物在miR-378转基因小鼠BAT组织中比野生型同窝对照小鼠含量高, 峰图向下表示代谢物在miR-378转基因小鼠BAT组织中比野生型同窝对照小鼠含量低, 红色峰值 $P < 0.05$ , 绿色峰值 $P > 0.05$ , 变化的代谢物总结在表1中。

A: PCA score plot of BAT tissue. Red circles: miR-378 transgenic mice. Black box: wild type littermates. B: differential NMR spectra of aqueous extracts from BAT, up indicates the metabolite in the BAT from miR-378 Tg mice is higher than that of Wt littermates, while down denotes lower in Tg mice than that of Wt ones. Red peaks indicates that  $P$  value is less than 0.05, green peaks indicates that  $P$  value is greater than 0.05. The differential metabolites between Tg and Wt mice are summarized in table 1.

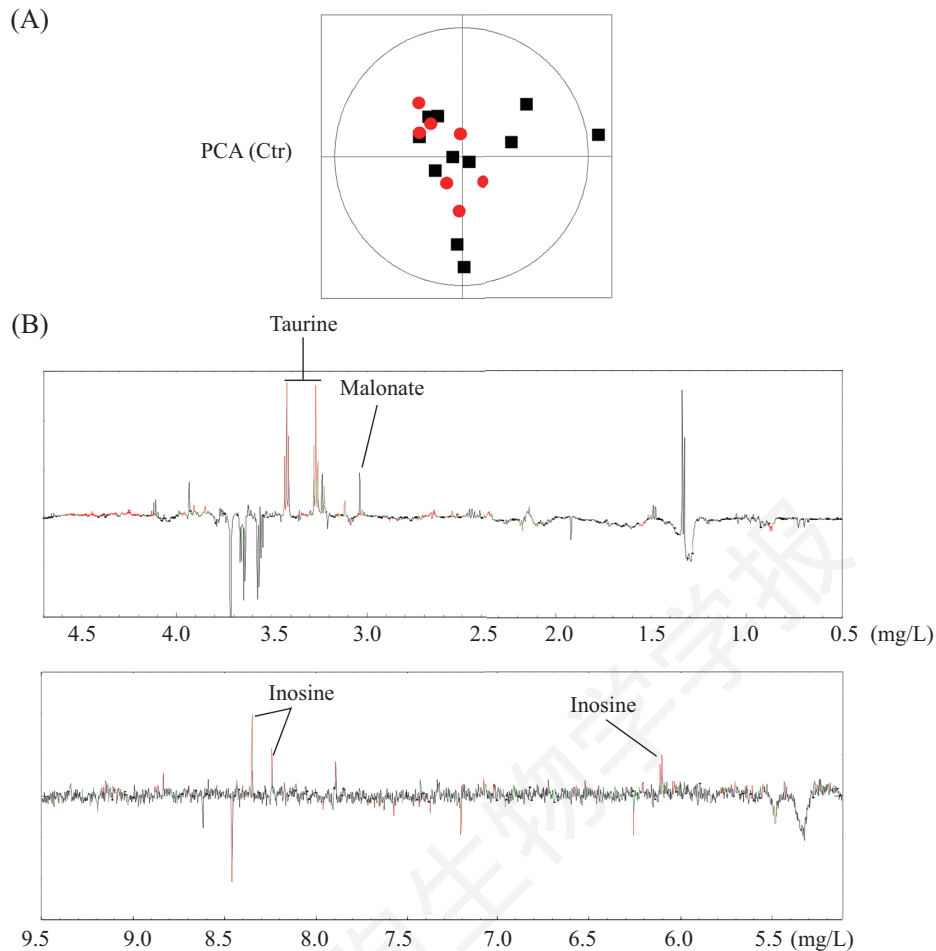
图2 棕色脂肪组织BAT统计学分析及NMR谱峰归属

Fig.2 Brown adipose tissue statistical analysis and NMR spectral peak attribution

表1 与野生型同窝对照小鼠相比, miR-378转基因小鼠BAT、gWAT和iWAT三种脂肪组织差异代谢物

Table 1 Differential metabolites of BAT, gWAT and iWAT from miR-378 Tg mice compared with Wt mice

代谢物 Metabolite	代谢通路 KEGG pathway	转基因小鼠vs野生型小鼠 Tg vs Wt	脂肪组织 Adipose tissue
Glycine	Amino acid metabolism	Up	iWAT
Glutamate	Amino acid metabolism	Up	iWAT
Taurine	Amino acid metabolism	Up	gWAT, iWAT
Alanine	Amino acid metabolism	Down	BAT
Choline	Choline metabolism	Up	BAT, iWAT
GPC	Choline metabolism	Up	BAT, iWAT
Ethanolamine	Choline metabolism	Up	iWAT
Guanosine	Nucleic acid metabolism	Up	iWAT
Uridine	Nucleic acid metabolism	Up	iWAT
Inosine	Nucleic acid metabolism	Up	gWAT, iWAT
AMP	Nucleic acid metabolism	Down	iWAT
ADP	Nucleic acid metabolism	Down	iWAT
ATP	Nucleic acid metabolism	Down	iWAT
Malonate	Glucose metabolism	Up	BAT, gWAT, iWAT
Lipid	Lipid metabolism	Down	iWAT



A: gWAT组织的PCA得分图, 红色圆圈代表miR-378转基因小鼠, 黑色方框代表野生型同窝对照小鼠; B: gWAT组织的<sup>1</sup>H NMR差异谱, 峰图向上表示代谢物在miR-378转基因小鼠gWAT组织中比野生型同窝对照小鼠含量高, 峰图向下表示代谢物在miR-378转基因小鼠gWAT组织中比野生型同窝对照小鼠含量低, 红色峰值 $P < 0.05$ , 绿色峰值 $P > 0.05$ , 变化的代谢物总结在表1中。

A: PCA score plot of gWAT tissue. Red circles: miR-378 transgenic mice. Black box: wild type littermates. B: differential NMR spectra of aqueous extracts from gWAT, up indicates the metabolite in the gWAT from miR-378 Tg mice is higher than that of Wt littermates, while down denotes lower in Tg mice than that of Wt ones. Red peaks indicates that  $P$  value is less than 0.05, green peaks indicates that  $P$  value is greater than 0.05. The differential metabolites between Tg and Wt mice are summarized in table 1.

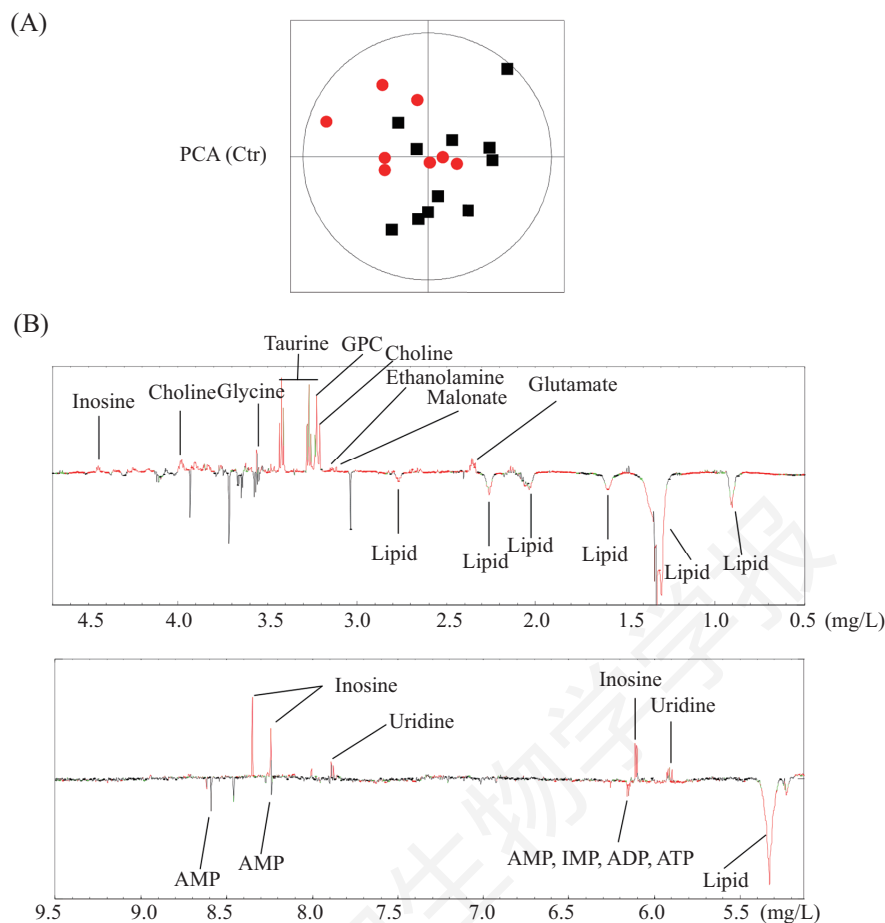
图3 附睾旁脂肪组织gWAT统计学分析及NMR谱峰归属

Fig.3 Gonadal white adipose tissue statistical analysis and NMR spectral peak attribution

小分子涉及的生物学过程, 如表2所示: 牛磺酸、甘氨酸、胆碱等代谢物对于促进脂质氧化、减少脂肪、缓解脂肪肝具有重要调控功能。miR-378转基因小鼠中牛磺酸、甘氨酸、胆碱等代谢物含量增高, 可能是miR-378转基因小鼠脂肪减少表型的主要原因(图5A)。为了初步探讨miR-378调控牛磺酸、甘氨酸、胆碱代谢的分子机制, 本研究采用TargetScan软件进一步分析了miR-378是否靶向这三种代谢物相关的代谢酶。结果表明, 胆碱代谢通路的胆碱磷酸胞苷酰基转移酶(PCYT1)是miR-378的靶基因(图5B)。因此, miR-378靶向PCYT1可能是转基因小鼠脂肪组织中胆碱水平升高的原因。

近几年, 有研究报道, miR-378调控脂代谢和白色脂肪组织棕色化, 但是目前没有研究报道过miR-378在脂肪组织中调控哪些代谢通路具体影响了哪些代谢小分子。本研究在课题组前期工作的基础上, 采用核磁共振技术系统分析了miR-378转基因小鼠脂肪组织代谢谱变化, 揭示了可能受到miR-378调控的代谢通路, 为进一步研究miR-378调控脂肪组织脂代谢的分子机制提供信息。

WAT是机体储存能量的场所, BAT调节机体的能量消耗, 因此脂肪组织对整个机体能量代谢稳态起到重要调控作用<sup>[16]</sup>。BAT是机体主要的产热器官, 通过解偶联蛋白-1(uncoupling protein-1, UCP1)介导



A: iWAT组织的PCA得分图, 红色圆圈代表miR-378转基因小鼠, 黑色方框代表野生型同窝对照小鼠; B: iWAT组织的<sup>1</sup>H NMR差异谱, 峰图向上表示代谢物在miR-378转基因小鼠iWAT组织中比野生型同窝对照小鼠含量高, 峰图向下表示代谢物在miR-378转基因小鼠iWAT组织中比野生型同窝对照小鼠含量低, 红色峰值 $P < 0.05$ , 绿色峰值 $P > 0.05$ , 变化的代谢物总结在表1中。

A: PCA score plot of iWAT tissue. Red circles: miR-378 transgenic mice. Black box: wild type littermates; B: differential NMR spectra of aqueous extracts from iWAT, up indicates the metabolite in the iWAT from miR-378 Tg mice is higher than that of Wt littermates, while down denotes lower in Tg mice than that of Wt ones. Red peaks indicates that P value is less than 0.05, green peaks indicates that P value is greater than 0.05. The differential metabolites between Tg and Wt mice are summarized in table 1.

图4 皮下脂肪组织iWAT统计学分析及NMR谱峰归属

Fig.4 Inguinal white adipose tissue statistical analysis and NMR spectral peak attribution

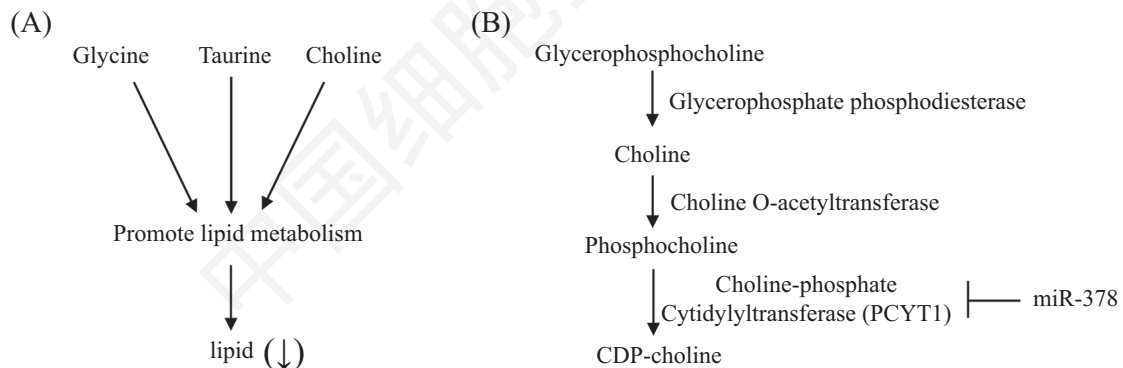
的非偶联呼吸过程消耗能量, 导致脂肪酸氧化和产热增加<sup>[17]</sup>。皮下和腹腔白色脂肪(iWAT、gWAT)是机体主要的储存能量的组织<sup>[18]</sup>。本研究发现, 皮下白色脂肪组织变化的代谢物较多。研究报道, miR-378可以使皮下白色脂肪棕色化。已知白色脂肪棕色化以后, 代谢功能发生显著的变化: 白色脂肪组织主要是贮能的, 棕色化以后主要诱发脂解、燃烧脂肪、增加产热。因此, 过表达miR-378对皮下白色脂肪代谢功能的影响相对较大。这可能是miR-378转基因小鼠中皮下白色脂肪iWAT中检测到的差异代谢物较多的原因之一。

在BAT、iWAT和gWAT脂肪组织中检测到的

差异小分子代谢物涉及到多种代谢通路, 包括氨基酸代谢、胆碱代谢、磷脂代谢、核酸代谢、糖代谢及脂质代谢等。首先, 我们发现, 多种代谢物在miR-378转基因小鼠和同窝野生型对照小鼠间存在显著差异, 例如脂质、AMP、ADP及ATP等在miR-378转基因小鼠中含量显著降低, 说明在该组织中脂解作用增强, 整个机体能量供应不足。其次, 发现牛磺酸、甘氨酸、谷氨酸等代谢物含量增多。其中牛磺酸是一种小分子含硫氨基酸, 研究表明, 牛磺酸可以显著改善肥胖, 改变脂肪代谢酶活性, 促进甘油三酯分解, 降低血清中甘油三酯的水平, 减少肝脏脂肪积累<sup>[19]</sup>。牛磺酸含量增加可以促进miR-378转基因小鼠脂质

表2 BAT、gWAT和iWAT三种脂肪组织差异代谢物功能总结  
Table 2 Functions summary of differential metabolites of BAT, gWAT and iWAT

代谢物 Metabolites	功能 Function
Glycine	It can reduce the body fat content and inhibit the formation of fatty liver in hyperlipidemia
Glutamate	A neurotransmitter in living organisms that is involved in the metabolism of proteins and glucose in cells, TCA cycle, oxidative process
Taurine	It can promote lipid catabolism, inhibit lipid synthesis, reduce inflammation and oxidative stress, improve adiponectin level, and promote triglyceride decomposition
Alanine	It is involved in glucose/alanine circulation in skeletal muscle and liver
Choline	It can regulate fat metabolism and has certain antioxidant capacity, promote fat metabolism, promote fat in the form of phospholipids from the liver through the blood transport, improve the use of fatty acids in the liver
GPC	It is involved in the metabolism of choline to ensure the synthesis of acetylcholine and lecithin in the neural membrane, improve blood circulation
Ethanolamine	The precursor of synthesis of phosphatidyl ethanolamine, involved in phospholipid metabolism
Guanosine	An important neuromodulator and neuroprotectant in the brain, involved in many pathological conditions, including ischemia and neuritis, participate in RNA splicing in mRNA
Uridine	It is an important component of RNA and participates in nucleotide metabolism
Inosine	It is involved in nucleic acid metabolism, cell energy metabolism and protein synthesis, activate liver function and promote the recovery of damaged liver cells
AMP, ADP, ATP	Decreased AMP/ATP may reduce AMPK activity, thus promoting ACC, HSL and SREBP-1 (promoting fatty acid synthesis), participate in the energy supply of the body
Malonate	A typical inhibitor of respiratory electron transport chain and can induce mitochondrial stress, enhance the formation of reactive oxygen species, reduce mitochondrial $\Delta$ bits of m and ATP levels
Lipid	It provides energy for the organism through lipolysis



A: 参与脂肪代谢的差异代谢小分子; (↓): 脂质减少。B: 胆碱代谢通路上miR-378的潜在靶标。┆表示miR-378的靶标。

A: differential metabolites involved in lipid metabolism; (↓): lipid was decreased. B: potential target for miR-378 on the choline metabolic pathway. ┆ indicates the target of miR-378.

图5 参与脂质代谢的差异代谢小分子及miR-378在胆碱代谢通路中的潜在靶标

Fig.5 Differential metabolites involved in lipid metabolism and Choline metabolic pathway

代谢, 与我们看到的表型一致。甘氨酸是20种基本氨基酸中的一种, 参与多种代谢途径, 是人类生理过程所必需的, 其是胶原蛋白的主要定量成分<sup>[20]</sup>。研究表明, 甘氨酸能够明显降低体脂含量, 可能和甘氨酸直接或间接促进leptin分泌有关<sup>[21]</sup>, 而leptin又可以抵制肥胖, 所以甘氨酸含量增加也可以促进脂肪代谢, 与

表型一致。谷氨酸是丰富的氨基酸之一, 除了在蛋白质结构中的作用外, 它还在营养、氨基酸代谢和信号传导中起着关键作用, 参与细胞内蛋白质和糖代谢、TCA循环, 促进氧化过程<sup>[22]</sup>。胆碱主要来自食物, 可被哺乳动物吸收并转化为磷酸胆碱<sup>[23]</sup>, 是生物膜的组成成分, 研究表明, 其可作为一种“抗脂肪



肝”物质, 显著调控脂肪代谢, 具有一定抗氧化能力<sup>[24]</sup>, 所以胆碱含量增加也可以促进脂肪代谢, 与表型一致。通过初步分析发现, 胆碱代谢通路的胆碱磷酸胞苷酰基转移酶(choline-phosphate cytidylyltransferase, *PCYT1*)是miR-378的靶基因。因此, miR-378可能通过靶向*PCYT1*导致转基因小鼠脂肪组织中胆碱水平升高, 进而调控机体脂肪代谢。另外, 甘油磷酸胆碱和乙醇胺, 胆碱代谢物含量增多, 可能更有利于促进脂肪组织的脂解。同时还涉及鸟苷、次黄苷和尿苷等核酸代谢通路产物含量增加, 涉及miR-378转基因小鼠核苷酸的合成反应。其中最明显的是脂质含量的减少, 该代谢产物的减少直接与我们观察到的小鼠表型一致。在机体饥饿的情况下会通过蛋白质分解提供能量, 氨基酸代谢物含量增多有可能是机体能量供应不足的情况下降解少部分蛋白质为机体供能导致的。脂肪组织中的脂肪分解被多种机制激活, 包括肝糖原短缺<sup>[25]</sup>。我们检测到的脂肪组织中糖代谢通路相关代谢物没有明显变化, 但脂肪组织的脂解作用明显增强, 提示我们可以进一步检测肝脏中糖原利用情况。

总之, 本文通过应用基于NMR技术的代谢组学方法较系统地研究了miR-378转基因小鼠三种脂肪组织的代谢谱变化。通过多重单变量分析, 发现甘氨酸、谷氨酸、牛磺酸等氨基酸, AMP、ADP、尿苷、次黄苷、鸟苷等多种核苷酸类代谢物, 甘油磷酸胆碱、乙醇胺、胆碱等胆碱类代谢物以及脂质的含量都有显著性改变。这些结果表明, miR-378转基因小鼠整个机体的脂肪组织代谢明显增强, 与我们观察到的miR-378转基因小鼠抵抗高脂肪饮食诱导的肥胖表型一致<sup>[8]</sup>。本研究的代谢组学分析结果为进一步探讨miR-378调控机体能量代谢稳态提供了新的方法和基础数据。

### 参考文献 (References)

- 1 Javadian M, Gharibi T, Shekari N, Abdollahpour-Alitappeh M, Mohammadi A, Hossieni A, *et al.* The role of microRNAs regulating the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer development, progression, and metastasis. *J Cell Physiol* 2019; 234(5): 5399-12.
- 2 Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15(8): 509-24.
- 3 Carrer M, Liu N, Grueter CE, Williams AH, Frisard MI, Hulver MW, *et al.* Control of mitochondrial metabolism and systemic energy homeostasis by microRNAs 378 and 378\*. *Proc Natl*

- Acad Sci USA 2012; 109(38): 15330-5.
- 4 Liu W, Cao H, Ye C, Chang C, Lu M, Jing Y. Hepatic miR-378 targets p110 $\alpha$  and controls glucose and lipid homeostasis by modulating hepatic insulin signalling. *Nat Commun* 2014; 5: 5684.
- 5 Pan D, Mao C, Quattrochi B, Friedline RH, Zhu LJ, Jung DY, *et al.* MicroRNA-378 controls classical brown fat expansion to counteract obesity. *Nat Commun* 2014; 5: 4725.
- 6 Ntambi JM. The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog Lipid Res* 1995; 34(2): 139-50.
- 7 Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res* 1999; 40(9): 1549-58.
- 8 Zhang Y, Li C, Li H, Song Y, Zhao Y, Zhai L, *et al.* miR-378 activates the pyruvate-PEP futile cycle and enhances lipolysis to ameliorate obesity in mice. *EBio Med* 2016; 11(5): 93-104.
- 9 Jiang L, Huang J, Wang Y, Tang H. Metabonomic analysis reveals the CCl<sub>4</sub>-induced systems alterations for multiple rat organs. *J Proteome Res* 2012; 11(7): 3848-59.
- 10 Zhang L, Ye Y, An Y, Tian Y, Wang Y, Tang H. Systems responses of rats to aflatoxin B1 exposure revealed with metabonomic changes in multiple biological matrices. *J Proteome Res* 2011; 10(2): 614-23.
- 11 Wang Y, Holmes E, Comelli EM, Fotopoulos G, Dorta G, *et al.* Topographical variation in metabolic signatures of human gastrointestinal biopsies revealed by high-resolution magic-angle spinning 1H NMR spectroscopy. *J Proteome Res* 2007; 6(10): 3944-51.
- 12 Beckonert O, Keun HC, Ebbels TM, Bundy J, Holmes E, *et al.* Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc* 2007; 2(11): 2692-703.
- 13 Dai H, Xiao C, Liu H, Hao F, Tang H. Combined NMR and LC-DAD-MS analysis reveals comprehensive metabonomic variations for three phenotypic cultivars of *Salvia Miltiorrhiza* Bunge. *J Proteome Res* 2010; 9(3): 1565-78.
- 14 Lee P, Zhao JT, Swarbrick MM, Gracie G, Bova R, Greenfield JR, *et al.* High prevalence of brown adipose tissue in adult humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(8): 2450-5.
- 15 Duan Y, An Y, Li N, Liu B, Wang Y, Tang H. Multiple univariate data analysis reveals the inulin effects on the high-fat-diet induced metabolic alterations in rat myocardium and testicles in the preobesity state. *J Proteome Res* 2013; 12(7): 3480-95.
- 16 Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster MT. Adipose tissue: an endocrine organ playing a role in metabolic regulation. *Horm Mol Biol Clin Invest* 2016; 26(1): 25-42.
- 17 Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84(1): 277-359.
- 18 Wood IS, Trayhurn P. Adipokines and the signaling role of adipose tissue in inflammation and obesity. *Future Lipidol* 2006; 1(1): 81-89.
- 19 马于巽, 李泓利, 郭俊霞, 陈文. 牛磺酸影响甘油三酯代谢的研究进展. *食品安全质量检测学报*(Ma Yuxun, Li Hongli, Guo Junxia, Chen Wen. Advances in the effect of taurine on triglyceride metabolism. *Journal of Food Safety and Quality*) 2019; 10(3): 620-5.
- 20 Adeva AM, Souto AG, Ameneiros RE, Fernández FC, Donapetry GC, Domínguez M A. Insulin resistance and glycine metabolism

- in humans. *Amino Acids* 2018; 50(1): 11-27.
- 21 刘靖. 甘氨酸对小鼠脂质代谢的影响及对肝脂肪变性的抑制作用(博士论文). 暨南大学, 2005.
- 22 Brosnan JT, Brosnan ME. Glutamate: a truly functional amino acid. *Amino Acids* 2013; 45(3): 413-8.
- 23 Pelech SL, Vance DE. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1984; 779(2): 217-51.
- 24 李博, 李伟, 王恬. 胆碱对脂肪代谢调控及其机制的研究进展. *中国粮油学报*(Li Bo, Li Wei, Wang Tian. Research progress in lipid metabolism and mechanism by choline regulation. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*) 2016; 31(1): 142-6.
- 25 Izumida Y. *et al.* Glycogen shortage during fasting triggers liver-brain-adipose neurocircuitry to facilitate fat utilization. *Nat Commun* 2013; 4: 2316.

中国细胞生物学学报