

YAP甲基化修饰促进肥胖发生的机制研究

谷雪妹^{1#} 李智强^{2#} 高仁元² 余海红² 张陈² 曹文悦³ 张雯² 牛文豪^{4*} 王平^{1,2*}

(¹安徽医科大学上海临床学院, 合肥 230032; ²同济大学医学院/同济大学附属上海市第十人民医院, 上海 200092;

³上海交通大学附属上海市胸科医院, 上海 200030; ⁴上海市长征医院, 上海 200001)

摘要 肥胖引起的并发症日益增多, 严重影响人们的生理心理健康。该研究发现, YAP甲基化可以调节脂肪酸合成氧化促进肥胖的发生。使用 *Yap* K327M(YAP第327位赖氨酸发生单甲基化修饰)转基因小鼠证明YAP甲基化修饰与肥胖表型的关系; 采用qRT-PCR检测方法分析YAP甲基化对脂肪酸合成和氧化过程中关键基因表达水平的影响; 运用小鼠在体葡萄糖和生长因子耐受实验对 *Yap* K327M转基因肥胖小鼠在体葡萄糖及生长因子水平进行检测以及对临床样品进行免疫组织化学分析。结果显示, YAP甲基化通过促进脂肪酸合成和抑制脂肪酸氧化, 抑制葡萄糖和生长因子耐受, 进而导致小鼠肥胖发生, 并且肥胖病人脂肪组织中YAP甲基化水平显著提高。以上研究提示, YAP甲基化可能是临床肥胖诊断及预防的潜在标志物。

关键词 肥胖; YAP甲基化; 脂肪酸合成; 脂肪酸氧化

Mechanism of YAP Methylation Promoting Obesity

GU Xuemei^{1#}, LI Zhiqiang^{2#}, GAO Renyuan², YU Haihong², ZHANG Chen²,

CAO Wenyue³, ZHANG Wen², NIU Wenhao^{4*}, WANG Ping^{1,2*}

(¹Shanghai Clinical College, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; ²School of Medicine, Tongji University/Shanghai Tenth People's Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200092, China; ³Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China; ⁴Shanghai Changzheng Hospital, Shanghai 200001, China)

Abstract The increasing number of complications caused by obesity has a serious impact on people's physical and mental health. The study found that YAP methylation could regulate fatty acid synthesis and oxidation to promote obesity. *Yap* K327M transgenic mice were used to demonstrate the relationship between YAP methylation and obesity, qRT-PCR was used to analyze the effect of YAP methylation on the expression of key genes in fatty acid synthesis and oxidation. The levels of glucose and growth factor in *Yap* K327M transgenic mice were analyzed by *in vivo* glucose and growth factor tolerance test, and the clinical samples were analyzed by immunohistochemical method. Data showed that YAP methylation promoted fatty acid synthesis and inhibited fatty acid oxidation. It can also suppress glucose and growth factor tolerance, and then led to obesity in mice. Moreover, the level of YAP methylation in adipose tissue was significantly increased in obese patients. These results suggest that YAP methylation may be a potential marker for the diagnosis and prevention of obesity.

Keywords obesity; YAP methylation; fatty acid synthesis; oxidation of fatty acids

收稿日期: 2021-03-18

接受日期: 2021-04-29

上海市卫生健康委员会基金(批准号: 20204Y0033)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 15316871605, E-mail: wenhao_niu1992@hotmail.com; Tel: 18917684867, E-mail: pwangecnu@163.com

Received: March 18, 2021

Accepted: April 29, 2021

This work was supported by the Shanghai Municipal Health Commission Foundation (Grant No.20204Y0033)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding authors. Tel: +86-15316871605, E-mail: wenhao_niu1992@hotmail.com; Tel: +86-18917684867, E-mail: pwangecnu@163.com

肥胖是一种以身体脂肪过多为特征的慢性疾病^[1]。目前世界范围内肥胖人口的比率呈显著增加的趋势。同时肥胖会增加冠心病、脑卒中、高血压以及糖尿病等发病风险,严重影响人类健康和生活质量。因此,对肥胖发病机制的深入研究,将有助于肥胖的治疗和预防。

Hippo-YAP/TAZ信号通路是经典的感应机械力的肿瘤抑制性信号通路^[2]。Hippo-YAP/TAZ信号通路活性不仅被机体葡萄糖、生长因子以及脂肪酸等代谢通路调控^[3-5],还能通过直接或者间接的方式调节机体代谢稳态,影响肥胖与肿瘤等重大疾病^[6-7]。目前,已有文献报道肥胖通过影响去乙酰化转移酶Sirt1^[8]和葡萄糖感应蛋白激酶AMPK^[9]活性影响YAP蛋白质水平,促进胃肠道肿瘤的发展。此外,在肥胖形成过程中YAP/TAZ通过调节JNK信号通路拮抗白色脂肪细胞凋亡促进肥胖进程^[10]。虽然YAP转基因小鼠表现出明显的肥胖表型,但是进一步的分子机理研究发现,YAP并没有促进脂肪干细胞向脂肪组织分化发育,而是可能通过下调TAZ激活脂肪干细胞中脂肪生成的重要转录因子PPAR的活性^[11]。然而Hippo-YAP/TAZ信号通路在肥胖形成中的功能调控机制仍不十分清楚。

脂肪酸是脂肪组织的重要组成部分,Hippo-YAP信号通路是否通过影响脂肪酸合成通路调节肥胖发生并不清楚。本课题组前期已报道了甲基化修饰促进YAP细胞核定位,并且YAP甲基化模拟突变体的转基因小鼠表现出增强的肿瘤发生表型^[12]。进一步对YAP甲基化转基因小鼠的深入研究发现,YAP甲基化通过促进脂肪酸合成和抑制脂肪酸氧化,抑制葡萄糖和生长因子耐受,进而导致小鼠肥胖发生。以上研究提示,YAP甲基化可能是肥胖患者的临床诊断及预防的潜在标志物,具有重要临床指导意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及耗材

琼脂糖、甘氨酸、TrisBase、甘油、4%多聚甲醛、TEMED、Tween-20、40%丙烯酰胺、硝酸纤维素膜、酚氯仿、甲醇等均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;Realtime PCR试剂盒、10× DNA上样缓冲液、DNA marker、PrimeScript RT反转录试剂盒、Trizol等均购于TaKaRa公司;免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒购于Vector Laboratories公司;YAP/TAZ(Rabbit)抗体购于Cell Signaling公司,GAPDH(Rabbit)抗体购于Proteintech公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG抗体购于北京博奥龙免疫技术有限公司;60%千卡(kcal)脂肪热量高脂鼠粮购于戴茨生物科技(无锡)公司。

1.2 小鼠品系与来源

SPF级C57BL/6小鼠购于上海斯莱克实验动物有限公司,饲养于同济大学动物实验中心,严格遵从相关实验管理规定。动物实验获得同济大学动物实验中心伦理委员会审查批准。

1.3 *Yap* K327M甲基化模拟突变体转基因小鼠的构建及鉴定

*Yap*转基因小鼠是通过Crispr-Cas9技术构建的。*Yap* K327位点的sgRNA oligos是在张锋实验室网站(<http://crispr.mit.edu/>)上设计的。我们针对*Yap* K327位点设计了两对特殊的引物,引物F1/R1用于KI小鼠基因型鉴定;F2/R2用于WT小鼠基因型鉴定。详细引物序列等信息见表1。小鼠基因型鉴定20 μL PCR反应体系为:0.2 μL rTaq, 2 μL 10× buffer, 10 μmol/L正反向引物F/R各0.5 μL, 14.8 μL ddH₂O, 1 μL dNTP, 1 μL模板DNA。F1/R1 PCR反应条件:95 °C预变性10 min; 94 °C变性30 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 30个循环。F2/R2 PCR反应条件:95 °C预变性10 min; 94 °C

表1 YAP基因型小鼠相关引物序列信息

Table 1 Primer sequence information of YAP genotype mice

信息 Information	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
K327 locus	AGC AAA TGC TCC AAA ATG TC
Oligo donor	ATT TTT TAC TCT TAG GCA ATA CGG AAT ATC AAT CCC AGC ACA GCA AAT GCT CCA ATG TGT CAG GTA GGC TCT TAT ATG ATG TTT TAG CAT TGG GGA AAA AGA T
F1	TCA GTG CTG CTG GAC TGT GA
R1	TAA GAG CCT ACC TGA CAC A
F2	ACA GCA AAT GCT CCA AAA
R2	GCT CAA GTG GAG GCA GCT

表2 qPCR引物序列
Table 2 Primer sequences for qPCR

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>Chrebpβ</i>	F: TCT GCA GAT CGC GTG GAG
	R: CTT GTC CCG GCA TAG CAA C
<i>Elovl6</i>	F: GTA CCA GTG CAG GAA GAT CAG T
	R: ACA ATG GAC CTG TCA GCA AA
<i>Fasn</i>	F: GGA GGT GGT GAT AGC CGG TAT
	R: TGG GTA ATC CAT AGA GCC CAG
<i>Cd36</i>	F: ATG GGC TGT GAT CGG AAC TG
	R: GTC TTC CCA ATA AGC ATG TCT CC
<i>Cpt1a</i>	F: CTC CGC CTG AGC CAT GAA G
	R: CAC CAG TGA TGA TGC CAT TCT
<i>Lcad</i>	F: TCT TTT CCT CGG AGC ATG ACA
	R: GAC CTC TCT ACT CAC TTC TCC AG
<i>GAPDH</i>	F: AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG
	R: AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC

变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 30个循环。PCR产物送苏州金唯智生物科技有限公司测序。

1.4 小鼠组织总RNA的提取

小鼠脱颈处死, 取出肝脏和脂肪组织, 置于PBS中清洗干净表面的毛发, 然后分装100 mg左右组织至1.5 mL的RNase-free EP管中。用眼科剪将组织充分剪碎或使用匀浆机充分匀浆, 每管加入1 mL Trizol, 放置在振荡器上振荡10 min后静置5 min。每管加入200 μL三氯甲烷上下颠倒10次左右, 静置5 min, 12 000 r/min、4 °C离心15 min。轻拿样品, 以免破坏其分层, 取最上面一层液体于干净的1.5 mL RNase-free的EP管中, 再加入等体积的异丙醇, 上下颠倒10次左右, 即可看到白色絮状的RNA, 静置10 min左右, 12 000 r/min、4 °C离心10 min, 弃上清, 加入1 mL预冷的75%乙醇上下颠倒重悬白色沉淀, 12 000 r/min、4 °C离心2 min弃上清, 晾干酒精后根据沉淀量加入适量的DEPC水轻弹至溶解。

1.5 qRT-PCR检测基因的mRNA表达水平

qRT-PCR使用 TaKaRa公司 SYBR Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)试剂盒。10 μL PCR反应体系为: 5 μL Premix Ex Taq II、1 μL上游引物(10 μmol/L)、1 μL下游引物(10 μmol/L)、2 μL cDNA、1 μL DEPC水。PCR反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 10 s, 39个循环。使用2^{-ΔΔCt}方法计算基因相对表达水平, 每个基因设置3个副孔, 显著性差异分析采用两独立样本t检验方法, P<0.05, P<0.01表示差异具有统

计学意义, n.s.表示差异没有统计学意义。qRT-PCR引物序列见表2(所有序列均为鼠源)。

1.6 Western blot印迹法检测蛋白表达水平

样品加入SDS上样缓冲液, 金属浴100 °C煮10 min, 12 000 r/min离心5 min后取10 μL样品在对应的SDS-Page胶孔中点样。电泳槽正负极通电后, 先用80-90 V的电压压胶至浓缩胶分离胶分界处, 后改用120 V电压至跑胶结束即可开始转膜。转膜按照海绵-滤纸-胶-NC膜-滤纸-海绵顺序叠加, 避免气泡产生, 用200 mA每个转膜槽恒流冰上转2 h。转膜结束后将NC膜放在5%脱脂牛奶中室温封闭1 h, 然后加入对应的一抗(YAP/TAZ稀释比例1:1 000, GAPDH稀释比例1:3 000) 4 °C孵育过夜。次日用PBST洗膜3次孵育对应的二抗(HRP山羊抗兔IgG抗体稀释比例1:4 000), 洗膜后即可显影。

1.7 葡萄糖和生长因子耐受实验

小鼠空腹过夜16 h, 腹腔注射D-葡萄糖(2 g/kg)进行糖耐量实验。小鼠禁食6 h, 腹腔注射重组人胰岛素(1.5 U/kg, Eli Lilly)进行胰岛素耐量实验。用血糖仪(LifeScan)测量小鼠尾静脉全血的血糖水平。血浆胰岛素水平使用商业酶联免疫吸附测定试剂盒, 根据制造商的说明进行测定。

1.8 免疫组织化学(IHC)实验

组织固定12 h以上后, 脱水仪脱水9 h, 进行包埋、切片、脱蜡、复水、热抗原修复、封闭、孵育抗体以及亲和素、显色、衬染、封片等步骤。

1.9 统计学方法

采用Graph Pad Prism 8统计学软件行统计分析。各组间的比较采用配对t检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 YAP甲基化促进正常饮食小鼠肥胖发生

我们运用Crispr-Cas9技术制备Yap K327M甲基化模拟突变体转基因鼠, 并且小鼠遵循孟德尔遗传定律进行交配。我们在对小鼠进行基因型鉴定时, 当核酸电泳结果只显示245 bp一条带时, 则为Yap K327M(KI)纯合子小鼠; 只有533 bp一条带时则为WT野生型小鼠; 两条带均存在则为杂合子小鼠(图1A)。小鼠月龄至8个月时, 称量小鼠体质量, 观察小鼠不同器官大小变化。实验结果表明, Yap K327M突变体小鼠体型和体质量明显增大($P < 0.05$)(图1B和图1C)。对小鼠不同器官比较发现, Yap K327M突变体小鼠中肝脏、肾脏相较野生型明显偏大, 而脾脏、心脏和肺组

织没有显著变化(图1D~图1F)。

2.2 YAP甲基化不影响TAZ蛋白质水平

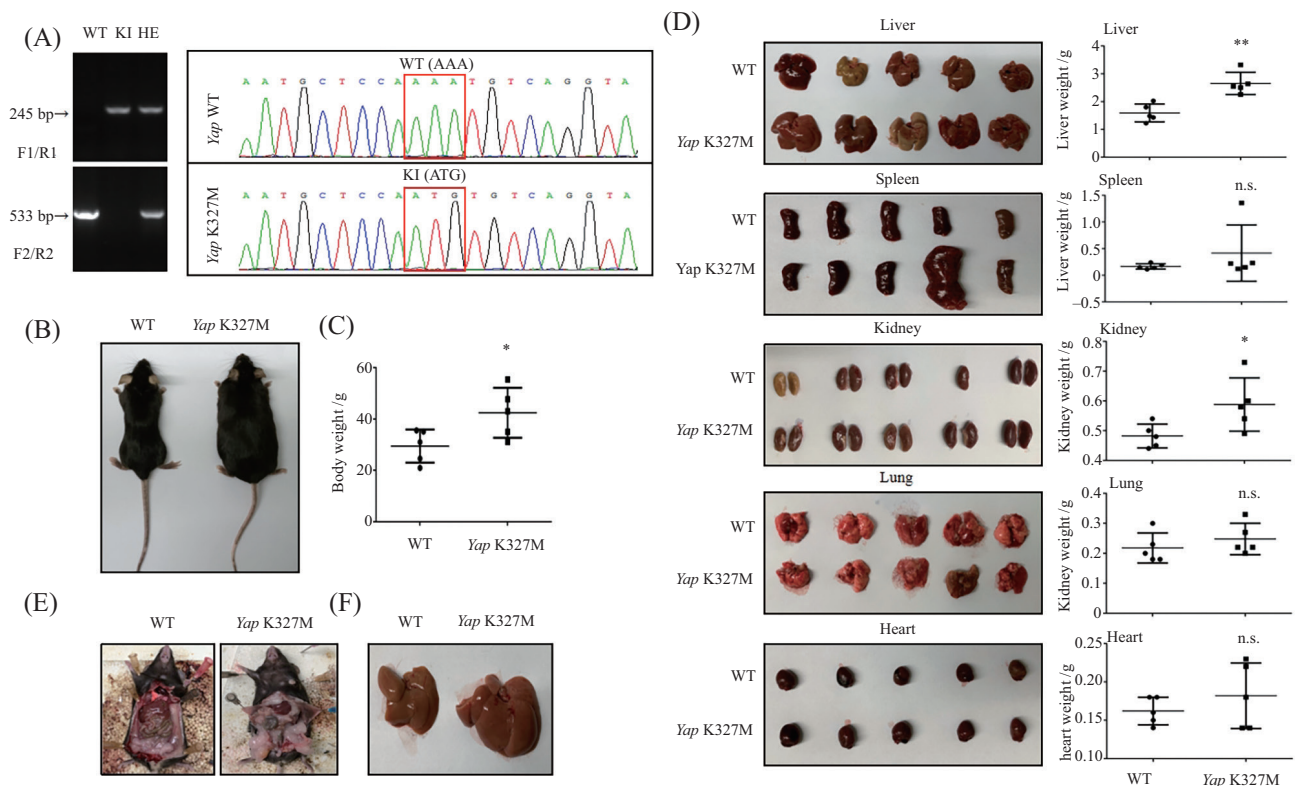
通过Western blot实验检测脂肪组织中YAP/TAZ蛋白质水平, 实验结果发现, Yap K327M突变体和野生型小鼠中YAP和TAZ蛋白质水平没有明显变化(图2)。

2.3 YAP甲基化促进脂肪酸合成

脂肪酸是脂肪组织的主要组成部分。脂肪酸合成与分解在脂肪组织稳态中发挥重要作用。通过对小鼠腹部脂肪组织和肝脏脂肪组织中脂肪酸合成的标志基因表达水平进行检测分析发现, *Chrebpβ*、*Elovl6*和*Fasn*等与脂肪酸合成相关重要基因表达水平在Yap K327M突变体小鼠的腹部脂肪组织和肝脏脂肪组织中明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)(图3)。

2.4 YAP甲基化抑制脂肪酸氧化

脂肪酸氧化是脂肪分解代谢的重要过程。我们的实验结果显示, YAP甲基化不仅影响脂肪酸合成, 而且抑制脂肪酸氧化途径。小鼠腹部脂肪组织和肝

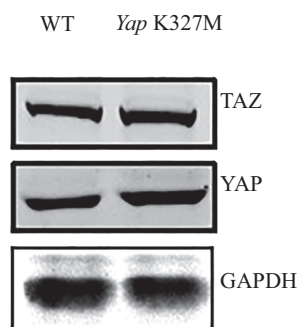


A: 核酸电泳鉴定Yap K327M小鼠基因型并且测序; B、C: 小鼠月龄至8个月时, 称量小鼠体质量; D~F: 小鼠不同器官大小、重量变化。n.s.表示没有统计学意义。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与WT组相比。

A: genotypes of Yap K327M mice were identified by nucleic acid electrophoresis and sequenced; B,C: mouse weight of 8 months; D-F: changes in the size and weight of different organs in mice. n.s. means no statistical significance. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with WT group.

图1 Yap K327甲基化促进正常饮食小鼠肥胖发生

Fig.1 Yap K327 methylation promotes obesity in normal diet mice

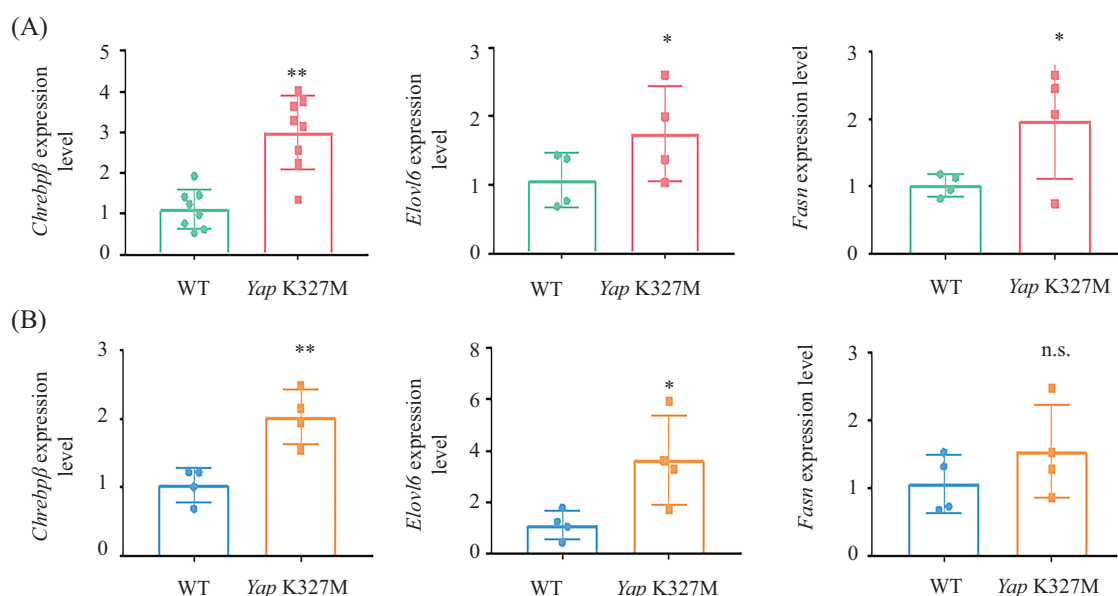


Western blot实验检测脂肪组织中YAP/TAZ蛋白质水平。

The protein levels of YAP/TAZ in adipose tissue were detected by Western blot assay.

图2 YAP甲基化不影响TAZ蛋白质水平

Fig.2 YAP methylation dose not affect TAZ protein level



A: qRT-PCR检测小鼠腹部脂肪组织脂肪酸合成相关基因表达情况; B: qPCR检测小鼠肝脏脂肪组织脂肪酸合成相关基因表达情况。n.s.表示没有统计学意义。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与WT组相比。

A: expression levels of genes related to fatty acid synthesis in abdominal adipose tissue of mice were detected by qRT-PCR; B: expression levels of genes related to fatty acid synthesis in mouse liver adipose tissue were detected by qRT-PCR. n.s. means no statistical significance. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with WT group.

图3 YAP甲基化促进脂肪酸合成

Fig.3 YAP methylation promotes fatty acid synthesis

脏脂肪组织中脂肪酸氧化标记基因表达水平检测结果显示, *Cd36*、*Cpt1a*以及*Lcad*等与脂肪酸氧化相关的重要基因表达水平在*Yap K327M*突变体小鼠的腹部脂肪组织和肝脏脂肪组织中明显降低($P < 0.05$)(图4)。

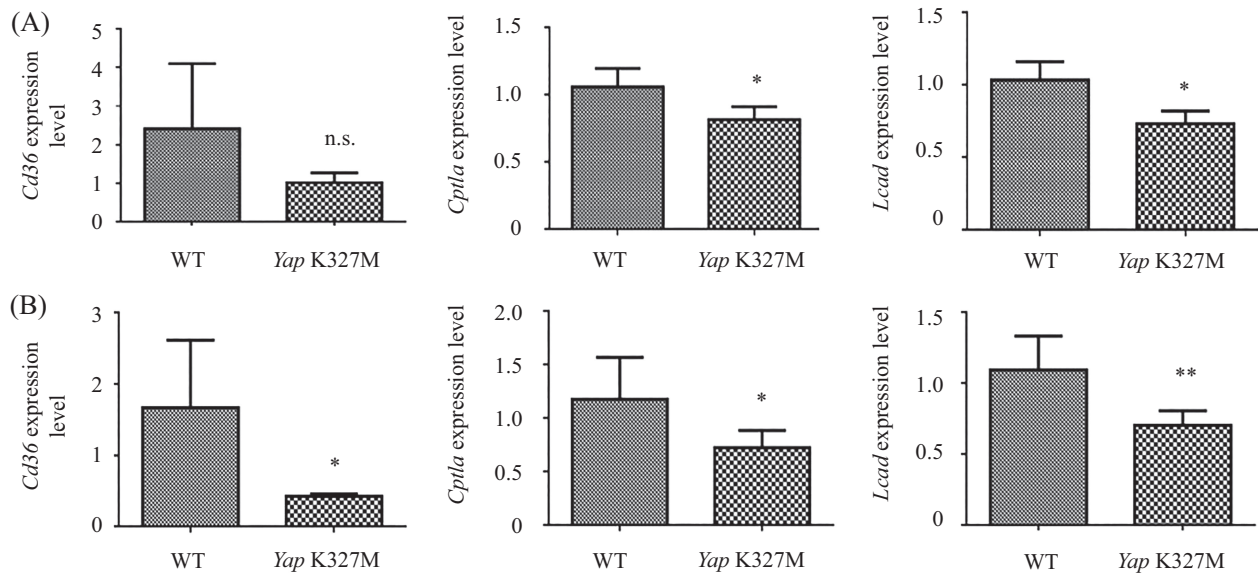
2.5 YAP甲基化抑制葡萄糖及生长因子耐受

除了调节脂肪酸的合成与氧化外, YAP甲基化还会抑制小鼠对葡萄糖和生长因子耐受。小鼠禁食16 h, 腹腔注射葡萄糖做葡萄糖耐受实验, 结果显示, *Yap K327M*突变体小鼠血液中葡萄糖含量在15 min

高峰时明显高于野生型, 在随后2 h内葡萄糖水平平均高于野生型($P < 0.05$)(图5A)。小鼠禁食6 h, 腹腔注射胰岛素进行胰岛素耐受实验, 结果显示, 腹腔注射胰岛素1 h内*Yap K327M*突变体小鼠血浆中胰岛素含量下降趋势明显慢于野生型小鼠, 并且在1 h时*Yap K327M*突变体小鼠血浆中胰岛素含量明显高于野生型小鼠($P < 0.01$)(图5B)。

2.6 YAP甲基化小鼠在高脂饮食的情况下肥胖表型显著

在正常饮食状态下, *Yap K327M*小鼠较WT组具

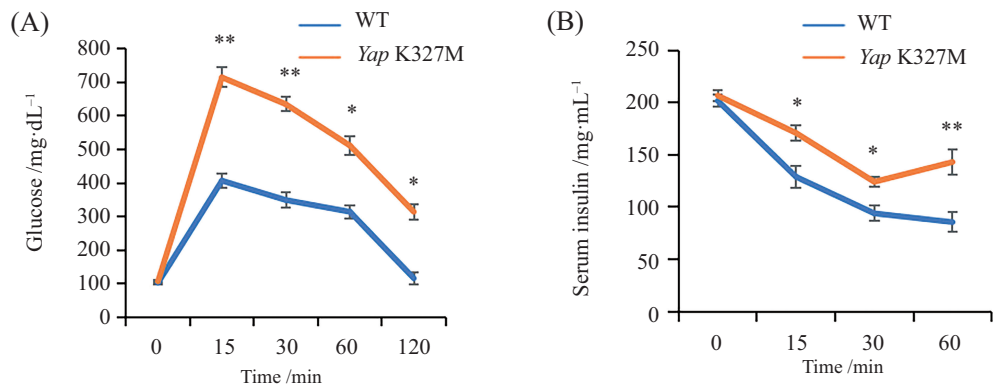


A: qRT-PCR检测小鼠腹部脂肪组织脂肪酸氧化标记基因*Cd36*、*Cpt1a*及*Lcad*表达水平; B: qRT-PCR检测小鼠肝脏脂肪组织脂肪酸氧化标记基因*Cd36*、*Cpt1a*及*Lcad*表达水平。n.s.表示没有统计学意义。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与WT组相比。

A: expression levels of fatty acid oxidation marker genes such as *Cd36*, *Cpt1a* and *Lcad* in abdominal adipose tissue of mice were detected by qRT-PCR; B: the expression levels of fatty acid oxidation marker genes such as *Cd36*, *Cpt1a* and *Lcad* in liver adipose tissue of mice were detected by qRT-PCR. n.s. means no statistical significance. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with WT group.

图4 YAP甲基化抑制脂肪酸氧化

Fig.4 YAP methylation inhibits fatty acid oxidation



A: 小鼠禁食16 h, 腹腔注射葡萄糖做葡萄糖耐受实验; B: 小鼠禁食6 h, 腹腔注射胰岛素进行胰岛素耐受实验。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与WT组相比。

A: the mice were fasted for 16 h and injected intraperitoneally with glucose for glucose tolerance test; B: mice fasted for 6 h and were intraperitoneally injected with insulin for insulin tolerance test. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with WT group.

图5 YAP甲基化抑制葡萄糖及生长因子耐受

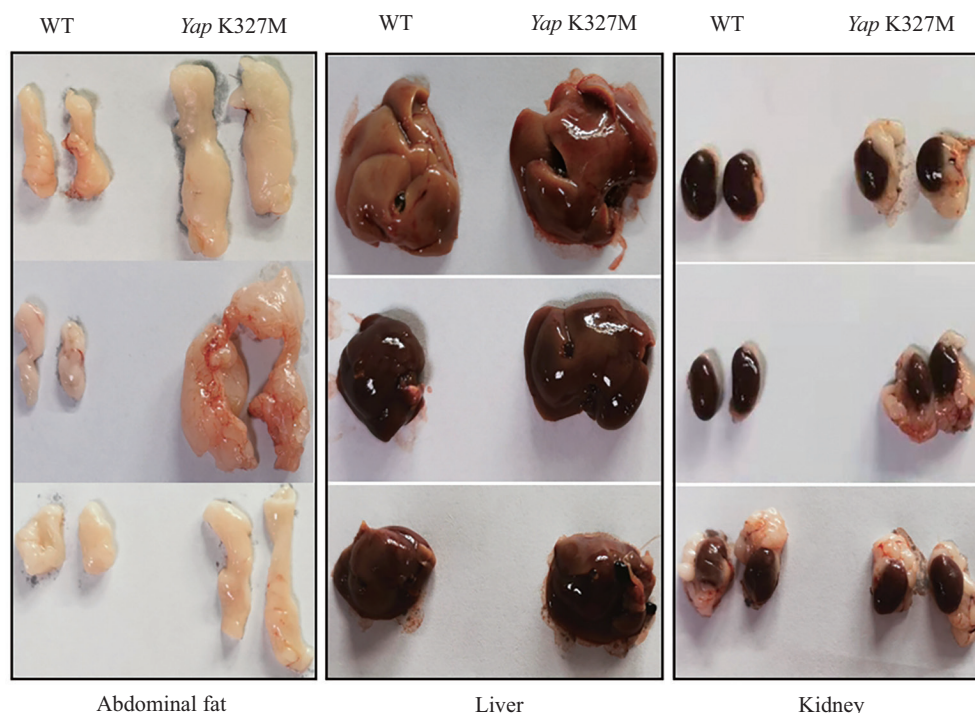
Fig.5 YAP methylation inhibits glucose and growth factor tolerance

有明显的肥胖表型, 高脂饮食状态下这种差异更加显著。我们将WT组和YAP甲基化基因型小鼠($n\geq 3$), 在相同的饲养条件下给予60%脂肪热量的高脂饲料喂养5周, 随后观察组织器官的表型变化, 结果显示, *Yap* K327M小鼠腹部、肾脏脂肪组织相对于WT组明显增多, 且肝脏组织明显增大(图6)。

2.7 肥胖病人脂肪组织中YAP甲基化水平增加

我们分析了一些临床病人脂肪组织样本, 分别

为非肥胖患者脂肪组织($18.5<\text{BMI}<24$)和肥胖患者脂肪组织($\text{BMI}>28$), 用我们自制的YAP K342M抗体进行免疫组织化学染色。我们发现, 肥胖组脂肪细胞相较对照组偏大, 且细胞核可被着色(如红色箭头所示), YAP蛋白在细胞核中定位增加。这和我们课题组前期研究发现的YAP发生甲基化修饰后被保留在细胞核中的结论一致。以上结果显示, 肥胖病人脂肪组织中YAP甲基化水平增加(图7)。

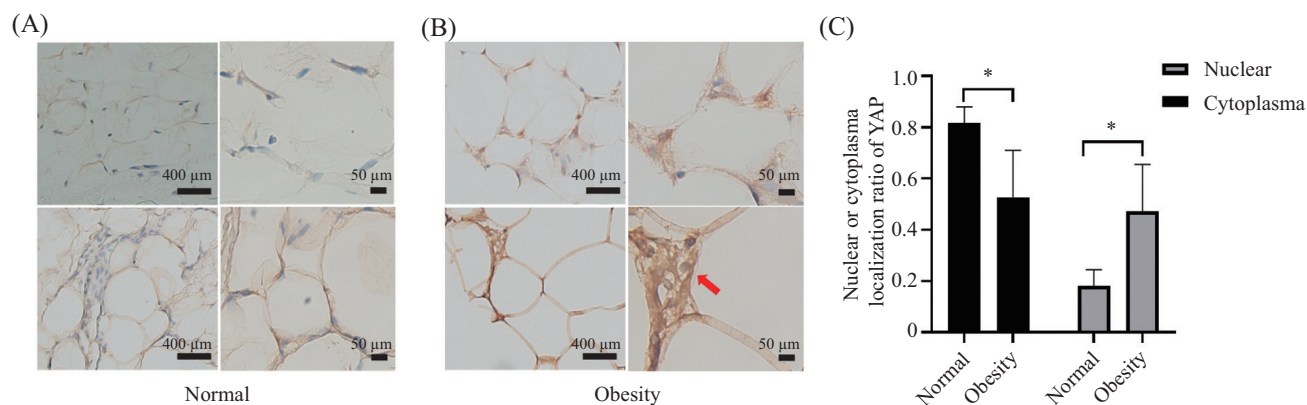


高脂饮食饲养5周, YAP甲基化小鼠与野生型小鼠腹部脂肪组织、肝脏、肾脏对比。

After feeding on a high-fat diet for 5 weeks, YAP methylated mice were compared with WT group in abdominal adipose tissue, liver, and kidney.

图6 YAP甲基化小鼠在高脂饮食的情况下肥胖表型显著

Fig.6 YAP methylated mice on a high-fat diet have a significant obesity phenotype



A: 非肥胖患者脂肪组织免疫组化染色; B: 肥胖患者脂肪组织免疫组化染色, 红色箭头表示着色的细胞核; C: 正常及肥胖患者YAP蛋白在细胞核细胞质定位比例。* $P < 0.05$, 与正常组相比。

A: immunohistochemical staining of adipose tissue from patients without obesity; B: immunohistochemical staining of adipose tissue from obese patients, the red arrow indicates the stained nucleus; C: the localization ratio of YAP protein in the nucleus and cytoplasm of normal and obese patients. * $P < 0.05$ compared with the normal group.

图7 肥胖病人脂肪组织中YAP甲基化水平增加

Fig.7 YAP methylation is increased in adipose tissue in obese patients

3 讨论

肥胖已成为世界流行性慢性病, 患者人数正以每年成倍的速度递增, 已经对人类健康造成巨大威胁。已知肥胖是心脏病的一种促发因素, 伴随肥胖发生的血液动力学变化是多种心功能失调的原因^[13], 同时肥胖还会增加高血压、糖尿病及骨关节炎的危

险, 亦会引起肝胆病变^[14], 对肺功能造成不良影响^[15]。此外, 肥胖除了影响青少年健康外, 还会阻滞智力发育。随着研究的深入, 肥胖导致的代谢系统失衡与肿瘤发生发展密切相关^[16-17]。因此, 如何增强肥胖的临床诊断及治疗具有重要意义。

YAP是经典的感应机械微环境关键信号通路

Hippo下游重要效应因子, 其功能失调与代谢稳态、免疫平衡以及肿瘤的发生发展密切相关^[18-19]。葡萄糖饥饿及生长因子刺激均可以通过直接或者间接的方式调控YAP活性^[20]。有研究证明, 细胞核定位是YAP活性的重要表征, YAP细胞核定位的异常增强促进肿瘤发生发展; 并且甲基化修饰调控YAP细胞核异常定位, 导致YAP活性持续增强, 促进肿瘤发生^[12]。结合临床样本分析, 提示YAP甲基化修饰水平可以作为临床诊断标志物。

*Yap*转基因小鼠具有多种表型, 包括肝脏组织的异常增大、自发性肝癌发生增强以及小鼠肥胖等^[21-22]。研究显示, *Yap* K327M突变体小鼠表现出了明显的肝脏再生能力增强, 自发性结直肠癌能力增强, 表明YAP甲基化修饰的确能够促进YAP活性^[12]。本研究发现, *Yap* K327M突变体小鼠在饲养8个月之后, 表现出明显的体质量增加, 脂肪和肝脏组织增多增大等特点。KAMURA等^[11]研究指出, 在*Yap*转基因小鼠的肥胖表型中, YAP并不能促进脂肪细胞分化发育, 而是通过抑制协同调控因子TAZ蛋白质水平, 激活脂肪干细胞中脂肪生成的重要转录因子PPAR的活性^[23]。本研究发现, *Yap* K327M突变体小鼠脂肪组织中TAZ蛋白质水平与野生型并无显著差异, 提示YAP存在某种直接的调控方式促进肥胖。

脂肪酸是脂肪组织的重要组成部分。进一步通过分子机制的探索发现, YAP甲基化通过促进脂肪酸合成和抑制脂肪酸氧化过程, 促进腹部和肝脏脂肪组织增多, 可能是导致小鼠肥胖的重要原因。进一步研究显示, YAP甲基化导致的小鼠肥胖对葡萄糖及生长因子耐受降低, 与临床肥胖病人的生化指征一致, 并且肥胖病人脂肪组织中YAP甲基化水平显著提高。以上研究提示, YAP甲基化可能是临床肥胖诊断的潜在标志物, 具有潜在的临床指导意义。

未来需要在临床样本中进一步阐明YAP甲基化修饰与肥胖的关系, 并且YAP甲基化调控脂肪酸合成与氧化代谢平衡的分子机理, 有待进一步研究。

参考文献 (References)

[1] COBBAUT M, KARAGIL S, BRUNO L, et al. Dysfunctional mechanotransduction through the YAP/TAZ/Hippo pathway as a feature of chronic disease [J]. *Cells*, 2020, 9(1): 151.
[2] MOROISHI T, HAYASHI T, PAN W W, et al. The Hippo pathway kinases LATS1/2 suppress cancer immunity [J]. *Cell*,

2016, 167(6): 1525-39.
[3] WANG T, FRANGO C, ZHANG J. Fatty acid oxidation (FAO) metabolic switch: metastasis in lymph nodes driven by yes-associated protein (YAP) activation [J]. *Biotarget*, 2019, 3: 13.
[4] ARDESTANI A, LUPSE B, MAEDLER K. Hippo signaling: key emerging pathway in cellular and whole-body metabolism [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2018, 29(7): 492-509.
[5] EL OUARRAT D, ISAAC R, LEE Y S, et al. TAZ is a negative regulator of PPARGamma activity in adipocytes and TAZ deletion improves insulin sensitivity and glucose tolerance [J]. *Cell Metab*, 2020, 31(1): 162-73.
[6] EIBL G, ROZENGURT E. KRAS, YAP, and obesity in pancreatic cancer: a signaling network with multiple loops [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 54: 50-62.
[7] GAO Y, CHEN X, HE Q, et al. Adipocytes promote breast tumorigenesis through TAZ-dependent secretion of resistin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(52): 33295-304.
[8] LI H J, FU J K, CHE X M, et al. Obesity accelerates murine gastric cancer growth by modulating the Sirt1/YAP pathway [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4): 4151-7.
[9] LIU J H, WU Q F, FU J K, et al. Obesity potentiates esophageal squamous cell carcinoma growth and invasion by AMPK-YAP pathway [J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 6765474.
[10] WANG L, WANG S, SHI Y, et al. YAP and TAZ protect against white adipocyte cell death during obesity [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 5455.
[11] KAMURA K, SHIN J, KIYONARI H, et al. Obesity in *Yap* transgenic mice is associated with TAZ downregulation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(3): 951-7.
[12] FANG L, TENG H, WANG Y, et al. SET1A-mediated monomethylation at K342 regulates YAP activation by blocking its nuclear export and promotes tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2018, 34(1): 103-18.
[13] LARSEN T S, JANSEN K M. Impact of obesity-related inflammation on cardiac metabolism and function [J]. *J Lipid Atheroscler*, 2021, 10(1): 8-23.
[14] HUANG D Q, EL-SERAG H B, LOOMBA R. Global epidemiology of NAFLD-related HCC: trends, predictions, risk factors and prevention [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(4): 223-38.
[15] PAPATHANASIOU A E, SPYROPOULOS F, MICHAEL Z, et al. Adipokines and metabolic regulators in human and experimental pulmonary arterial hypertension [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1435.
[16] RAJANDRAM R, PERUMAL K, YAP N Y. Prognostic biomarkers in renal cell carcinoma: is there a relationship with obesity [J]? *Transl Androl Urol*, 2019, 8(Suppl 2): S138-46.
[17] ZHANG C, YUE C, HERRMANN A, et al. STAT3 activation-induced fatty acid oxidation in CD8⁺ T effector cells is critical for obesity-promoted breast tumor growth [J]. *Cell Metab*, 2020, 31(1): 148-61.
[18] ZHOU L, WANG Q, ZHANG H, et al. YAP inhibition by nuciferine via AMPK-mediated downregulation of HMGCR sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(10): 620.
[19] ZHAO X, QIN W, JIANG Y, et al. ACADL plays a tumor-suppressor role by targeting Hippo/YAP signaling in hepatocellular

- carcinoma [J]. NPJ Precis Oncol, 2020, 4: 7.
- [20] CHAO W, KANG J J, HONGY J, et al. YAP/TAZ regulates the insulin signaling via IRS1 2 in endometrial cancer [J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(5): 996-1010.
- [21] MOYA I M, HALDER G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(4): 211-26.
- [22] DRISKILL J H, PAN D. The Hippo pathway in liver homeostasis and pathophysiology [J]. Annu Rev Pathol, 2021, 16: 299-322.
- [23] JEONG H, HWANG E S, et al. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation [J]. Science, 2005, 309(5737): 1074-8.