

IGF2BP3通过下调DMRT2蛋白水平促进脂肪细胞胰岛素抵抗及机制研究

郑洪健^{1,2,3} 王永涛^{2,3} 王子杰^{3,4} 曾璐^{2,3} 杨毅宁^{2,3} 陶静^{2,3*}

(¹石河子大学医学院, 石河子 832003; ²新疆维吾尔自治区人民医院, 心脏及泛血管医学诊疗中心, 乌鲁木齐 830001; ³新疆心脏血管稳态与再生医学研究重点实验室, 乌鲁木齐 830001; ⁴新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830001)

摘要 该研究目的是探究DMRT2的mRNA m⁶A甲基化修饰是否是调控脂肪细胞胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)的关键调控因子以及相应的作用机制。首先, 通过综合利用RM2Target、GEO等生物信息学数据库及公开的RNA-seq数据集, 分析了在胰岛素抵抗(IR)患者脂肪组织中, 与DMRT2 mRNA的m⁶A修饰水平存在显著关联的关键调控蛋白; 利用脂肪前体细胞系3T3-L1细胞建立IR细胞模型, 过表达、敲低DMRT2或m⁶A抑制剂干预后检测DMRT2蛋白、DMRT2 mRNA转录本上的m⁶A表达水平和胰岛素抵抗相关指标(葡萄糖摄取、脂肪细胞炎症因子的表达水平以及甘油三酯含量)。生物信息学分析结果显示在IR中, IGF2BP3与DMRT2 m⁶A显著相关; 体外实验结果表明IR细胞模型中敲低IGF2BP3促进了DMRT2、GLUT4、p-Akt/Akt的表达, 同时下调了DMRT2 mRNA上的m⁶A水平, 促进了葡萄糖摄取, 抑制了脂肪细胞炎症因子的表达, 并减少了甘油三酯含量, 过表达IGF2BP3后的结果与敲低的结果相反; 而m⁶A抑制剂干预能减弱IGF2BP3过表达对DMRT2 mRNA的m⁶A修饰调控及IR进展的影响, 进一步的实验表明过表达DMRT2能够部分逆转IGF2BP3对IR进展的促进作用。研究表明IGF2BP3介导DMRT2 m⁶A甲基化修饰表达, 加速脂肪细胞胰岛素抵抗和炎症进展。该研究确定了IGF2BP3和DMRT2 m⁶A甲基化修饰之间的关联以及其在胰岛素抵抗中的作用机制, 为胰岛素抵抗新靶点的开发提供了一定的参考依据。

关键词 胰岛素抵抗; DMRT2; IGF2BP3; m⁶A甲基化; 炎症

IGF2BP3 Down-Regulating DMRT2 Protein Level Enhances Adipocyte Insulin Resistance and the Related Mechanism

ZHENG Hongjian^{1,2,3}, WANG Yongtao^{2,3}, WANG Zijie^{3,4}, ZENG Lu^{2,3}, YANG Yining^{2,3}, TAO Jing^{2,3*}

(¹Medical College of Shihezi University, Shihezi 832003, China; ²Cardiac and Panvascular Medicine Clinic, Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Urumqi 830001, China; ³Xinjiang Key Laboratory of Cardiovascular Homeostasis and Regenerative Medicine Research, Urumqi 830001, China; ⁴College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830001, China)

Abstract The aim of this work is to explore if m⁶A methylation modification of DMRT2 is a regulator in IR (insulin resistance) in adipocytes. Firstly, key regulatory proteins that are significantly associated with the m⁶A modification level of DMRT2 mRNA in the adipose tissue of IR patients were identified using multiple databases (RM2Target, GEO, RNA-seq datasets) and Pearson correlation analysis. Subsequently, an *in vitro* IR model was

收稿日期: 2025-05-08

接受日期: 2025-06-17

新疆维吾尔自治区自然科学基金杰出青年基金(批准号: 2022D01E82)和新疆维吾尔自治区自然科学基金青年基金(批准号: 2024D01C280)资助的课题

*通信作者。Tel: 18935903292, E-mail: taojing_xj@163.com

Received: May 8, 2025

Accepted: June 17, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region for Distinguished Young Scholars (Grant No.2022D01E82) and the National Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region for Young Scholars (Grant No.2024D01C280)

*Corresponding author. Tel: +86-18935903292, E-mail: taojing_xj@163.com

established using the 3T3-L1 preadipocyte cell line. Following interventions, including DMRT2 overexpression or knockdown, and treatment with an m⁶A inhibitor, several parameters were assessed: DMRT2 protein levels, the m⁶A modification level on DMRT2 mRNA, and key IR-related indicators such as glucose uptake, expression of inflammatory cytokines, and triglyceride content. The bioinformatic analysis determined that IGF2BP3 was significantly associated with DMRT2 m⁶A in IR. In IR cell models, knockdown of IGF2BP3 promoted the expression of DMRT2, GLUT4, p-Akt/Akt, and down-regulated m⁶A levels on *DMRT2* mRNA, as well as promoted glucose uptake, inhibited the expression of adipocyte inflammatory factors, and reduced triglyceride levels compared with the CONTROL group, overexpression of IGF2BP3 showed the opposite trend; whereas m⁶A inhibitor intervention counteracted the effects of IGF2BP3 overexpression on regulating *DMRT2* mRNA m⁶A modification and IR progression. While m⁶A inhibitor intervention counteracted the effects of IGF2BP3 on regulating DMRT2 mRNA m⁶A modification and the progression of IR. Furthermore, overexpression DMRT2 partially abrogated the promotional effect of IGF2BP3 on IR progression. This study concluded that IGF2BP3-mediated DMRT2 m⁶A methylation modification accelerated the progression of insulin resistance and inflammation in adipocytes. This research determined that IGF2BP3 was significantly associated with DMRT2 m⁶A methylation modification and had a role in IR formation, which provided some clue for seeking new targets for insulin resistance.

Keywords insulin resistance; DMRT2; IGF2BP3; m⁶A methylation; inflammation

肥胖是在世界范围内最主要的健康问题之一,并且肥胖症在全球范围内不断增长,自1990年以来,全球男性肥胖率从约6.9%增加到14.0%,女性肥胖率从约11.7%增加到18.5%^[1]。随着对肥胖症的深入研究,越来越多的证据提示胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)可能是引起肥胖症的主要原因之一。IR指正常循环的胰岛素在其作用位点活性降低或注射后的胰岛素降低血糖的能力受损时的状态。脂肪组织是胰岛素作用的主要部位,脂肪组织炎症会造成全身性IR^[2]。脂肪细胞吸收葡萄糖合成脂肪酸影响胰岛素的表达,这一过程一旦中断会导致胰岛素抵抗和高血糖症^[3]。尽管已经研究出许多肥胖的诱发因素,并且以此建立了多种治疗肥胖的策略,但是这些治疗策略的效果有限,尚缺乏更有效的防治方法^[4-5]。脂肪细胞IR已经被证明和肥胖密切相关,针对脂肪细胞IR的治疗策略也已成为治疗肥胖症的研究热点。

近年来,表观遗传修饰,特别是RNA甲基化,作为一种新兴的基因表达调控方式,在代谢性疾病中的作用日益受到关注^[6]。其中,N⁶-甲基腺嘌呤(N⁶-methyladenine, m⁶A)是最丰富的mRNA修饰之一,通过影响RNA的稳定性、剪接、翻译和定位等过程,在多种生理和病理过程中发挥关键作用^[7]。已有研究表明,m⁶A甲基化失调与肥胖、糖尿病等代谢性疾病的发生发展密切相关^[6-8]。双性与mab-3相关转录因子2(double-sex and mab-3-related transcription

factor 2, DMRT2)是一类在多种生物学过程中发挥重要调控作用的转录因子以及在成体组织稳态维持中扮演关键角色^[9]。已有研究指出DMRT2与法尼醇X受体(farnesoid X receptor, FXR)相互作用能够改善脂肪细胞和小鼠模型中的IR^[10];另有研究证实DMRT2是IR的关键调控因子,其在IR小鼠模型中显著下调^[10],然而,DMRT2在脂质代谢调控中的具体分子机制,是否受到m⁶A等表观遗传修饰的调控,以及这种调控如何影响脂肪细胞IR的进程,目前尚不明确,亟待进一步深入研究。阐明这些机制对于理解肥胖和IR的发病机理,并寻找新的治疗靶点具有重要意义。

因此,在本研究中,我们拟通过生物信息学分析筛选调控DMRT2 m⁶A甲基化修饰的关键调控因子,并结合体外细胞实验与体内动物模型,深入探究该分子介导的DMRT2 m⁶A甲基化修饰在脂肪细胞胰岛素抵抗中的作用及其分子机制。我们通过初步的生物信息学研究结合实验验证,确定了胰岛素样生长因子2 mRNA结合蛋白3(insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3, IGF2BP3)作为DMRT2 m⁶A甲基化修饰的关键调控因子^[11]。IGF2BP3作为m⁶A“阅读器”蛋白,能够识别并结合带有m⁶A修饰的mRNA,从而影响这些mRNA的稳定性、翻译效率或亚细胞定位^[12]。尽管已有研究提示IGF2BP3可能参与某些代谢过程,但其介导m⁶A修饰影响脂肪细

胞的功能和胰岛素敏感性,相关的分子机制仍有待阐明。本研究将进一步探讨IGF2BP3介导的DMRT2 m⁶A甲基化修饰在改善脂肪细胞IR中的具体作用机制,旨在为理解DMRT2在脂质代谢中的功能提供新的视角,并为未来针对IR的临床干预提供新的潜在治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 小鼠脂肪前体细胞系3T3-L1细胞(货号: CL-173)购自美国模式培养物保藏中心; RNeasy micro试剂盒(货号: 74004)购自德国 QIAGEN公司; DMEM培养基(货号: 11965092)、TRIzol试剂盒(货号: 12183555)购自ThermoFisher Scientific公司; 甘油三酯含量测定试剂盒(货号: BC0625)购自北京索莱宝科技有限公司; TNF- α (货号: ab181421)、IL-6(货号: ab178013)酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、 β -Actin抗体(货号: ab179467)购自美国Abcam公司; Prime-Script RT试剂盒(货号: RR047B)、SYBR Premix Ex TaqTM(TB Green Advantage qPCR预混液)(货号: 639676)购自TaKaRa公司; Akt和p-Akt^{Ser473}抗体购自Cell Signaling Technology公司; 葡萄糖摄取比色测定试剂盒(货号: MAK083)、m⁶A抑制剂环亮氨酸(Cycloleucine)(货号: C2525)、IGF2BP3抗体(货号: HPA002037)、DMRT2抗体(货号: ABE1364)、GLUT4抗体(货号: G4048)、磷酸化酶抑制剂混合物(货号: PPC1010)、蛋白酶抑制剂混合物(货号: P8465)、RIPA裂解缓冲液(货号: 20-188)、油红O溶液(货号: O0625)、RNA甲基化免疫共沉淀试剂盒(货号: 17-10499-2)购自Sigma-Aldrich公司; 常用试剂均为国产分析纯级别, 购自湖南沅睿生物科技有限公司。

1.1.2 仪器 SpectraMax Mini酶标仪购自上海美谷分子仪器有限公司; CFX96实时荧光定量PCR仪及ChemiDocTM MP成像系统购自Bio-Rad公司; 倒置荧光显微镜购自Nikon公司。

1.2 方法

1.2.1 临床组织材料收集 为进行初步验证, 本研究另招募了IR患者3例及健康对照志愿者3例。研究方案已通过新疆维吾尔自治区人民医院伦理委员会批准(批件号: KY2024052270), 所有参与者均签署知情同意书。

1.2.2 构建细胞模型 鼠脂肪前体细胞系3T3-L1, 在补充10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的DMEM培养基(37℃、5% CO₂)中培养。为了将3T3-L1脂肪前体细胞分化成成熟的脂肪细胞, 细胞在含有0.5 mmol/L IBMX、10 μ g/mL胰岛素和0.25 mmol/L DEX的DMEM培养基中进行初始分化。2天后, 分化培养基改为维持培养基(含有10 μ g/mL胰岛素、10% FBS的DMEM培养基)继续培养6~8天。在此期间, 至少95%的细胞积累了脂滴, 成熟的脂肪细胞可用于进一步的实验研究。IR细胞的诱导: 为建立胰岛素抵抗模型, 根据分组, 使用Lipofectamine 2000将敲低IGF2BP3、过表达IGF2BP3和过表达DMRT2慢病毒分别转染至成熟的脂肪细胞中。转染24 h后, 使用1 μ mol/L的地塞米松, 处理细胞72 h。在地塞米松处理的同时, 使用40 nmol/L Cycloleucine处理成熟的脂肪细胞24 h抑制m⁶A。

1.2.3 生物信息学分析 本研究中用于生物信息学分析的转录组数据来源于Gene Expression Omnibus(GEO)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)的RNA测序数据集GSE174475, 该数据集包含27例胰岛素抵抗(IR)患者和16名健康对照(CONTROL)个体的脂肪组织样本。为探究调控DMRT2 m⁶A的相关酶, 首先利用RM2Target数据库(<http://rm2target.canceromics.org/>)预测与DMRT2 m⁶A修饰相关的酶类及识别蛋白。随后, 使用t检验对GSE174475数据集进行差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)分析, 筛选标准为校正P<0.05。最后, 通过计算DMRT2表达水平与筛选出的DEGs(特别是RM2Target预测的m⁶A相关酶)表达水平之间的皮尔逊相关系数, 综合确定可能调控DMRT2 m⁶A水平的关键候选酶。

1.2.4 qRT-PCR检测 利用TRIzol试剂从组织中提取总RNA。取1 μ g总RNA, 使用PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser进行逆转录合成cDNA, 随后, 以cDNA为模板, 使用SYBR Premix Ex TaqTM在实时荧光定量PCR仪上进行qRT-PCR检测, 采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}方法计算基因和mRNA、rRNA表达的相对水平。

1.2.5 Western blot实验 收集样品用PBS洗涤2次, 再放入适量临用前已添加蛋白酶抑制剂混合物和磷酸化酶抑制剂混合物的RIPA裂解缓冲液, 冰上裂解30 min后用8%~10% SDS-PAGE凝胶分离不同细胞

提取物中等量的蛋白。将凝胶中的蛋白质转移到PVDF膜上。5%脱脂牛奶于室温下封闭1 h后,一抗(稀释比例为1:1 000)4 °C孵育过夜。接下来用与一抗种属对应的二抗(稀释比例为1:5 000)于室温下孵育1 h,使用增强化学发光试剂观察阳性信号。使用化学发光成像仪对数据进行量化。应用ImageJ软件分析条带的灰度值。

1.2.6 油红O染色 为了验证脂滴的生成,用10%福尔马林溶液在PBS中于室温下固定细胞1 h,然后用60%异丙醇洗涤2次。油红O溶液对固定的细胞染色30 min,蒸馏水冲洗。干燥后,拍摄固定细胞的代表性图像。

1.2.7 检测葡萄糖摄取能力、甘油三酯含量 按照葡萄糖摄取比色测定试剂盒说明书测定葡萄糖摄取:简而言之,PBS(pH7.4)洗涤脂肪细胞后将其放入含有胰岛素(1 $\mu\text{mol/L}$)的克雷布斯-林格碳酸氢盐HEPES缓冲液(KRBH)中于37 °C孵育30 min;加入2-脱氧-D-葡萄糖(2-deoxy-D-glucose, 2-DG)(最终浓度为10 mmol/L)并在37 °C下孵育20 min;加入中和缓冲液并离心(8 000 $\times g$ 、10 min、4 °C);检测缓冲液稀释剩余的裂解液;葡萄糖摄取能力通过酶促反应进行检测,412 nm波长处检测DTNB[5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)]。葡萄糖吸收值与蛋白质水平进行归一化,蛋白质水平用BCA蛋白检测法测定。每项实验均有3个技术重复。将对照设为100%,结果以倍数变化(处理/对照)表示。甘油三酯含量检测试剂盒测定甘油三酯含量:用试剂I裂解分化的3T3-L1脂肪细胞并超声1 min。离心(8 000 $\times g$ 、10 min、4 °C),收集上清液,按照生产商的说明书进行甘油三酯测定。

1.2.8 免疫荧光染色 取经10%中性缓冲福尔马林固定、石蜡包埋的组织样本,制备4 μm 切片。抗原修复采用柠檬酸钠缓冲液(10 mmol/L、pH6.0)于95 °C加热30 min。透化处理使用0.1% Triton X-100(室温、10 min),随后以5% BSA封闭非特异性结合位点(室温、1 h)。加入兔源抗GLUT4一抗(1:200稀释)4 °C孵育过夜,PBS洗涤3次后,与Alexa Fluor 488标记山羊抗兔二抗(1:500)室温避光孵育1 h。DAPI复染细胞核后,使用尼康Eclipse Ti2荧光显微镜(40 $\times$ 物镜,激发/发射波长488 nm/520 nm)采集图像。

1.2.9 RNA甲基化免疫共沉淀qPCR(MeRIP-qPCR) MeRIP-qPCR检测DMRT2 mRNA上的m⁶A水平,按照试剂盒说明书进行上清液和RIP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)对上清液及RIP样品的RNA分离提取。后续进行反转录PCR扩增,采用实时定量PCR分析。

1.3 统计学分析

本实验数据由GraphPad Prism 6软件处理,最终数据由3次独立实验结果的平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。单因素方差分析(One-Way ANOVA)比较不同处理组的连续性变量差异。统计显著性采用ANOVA检验, $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

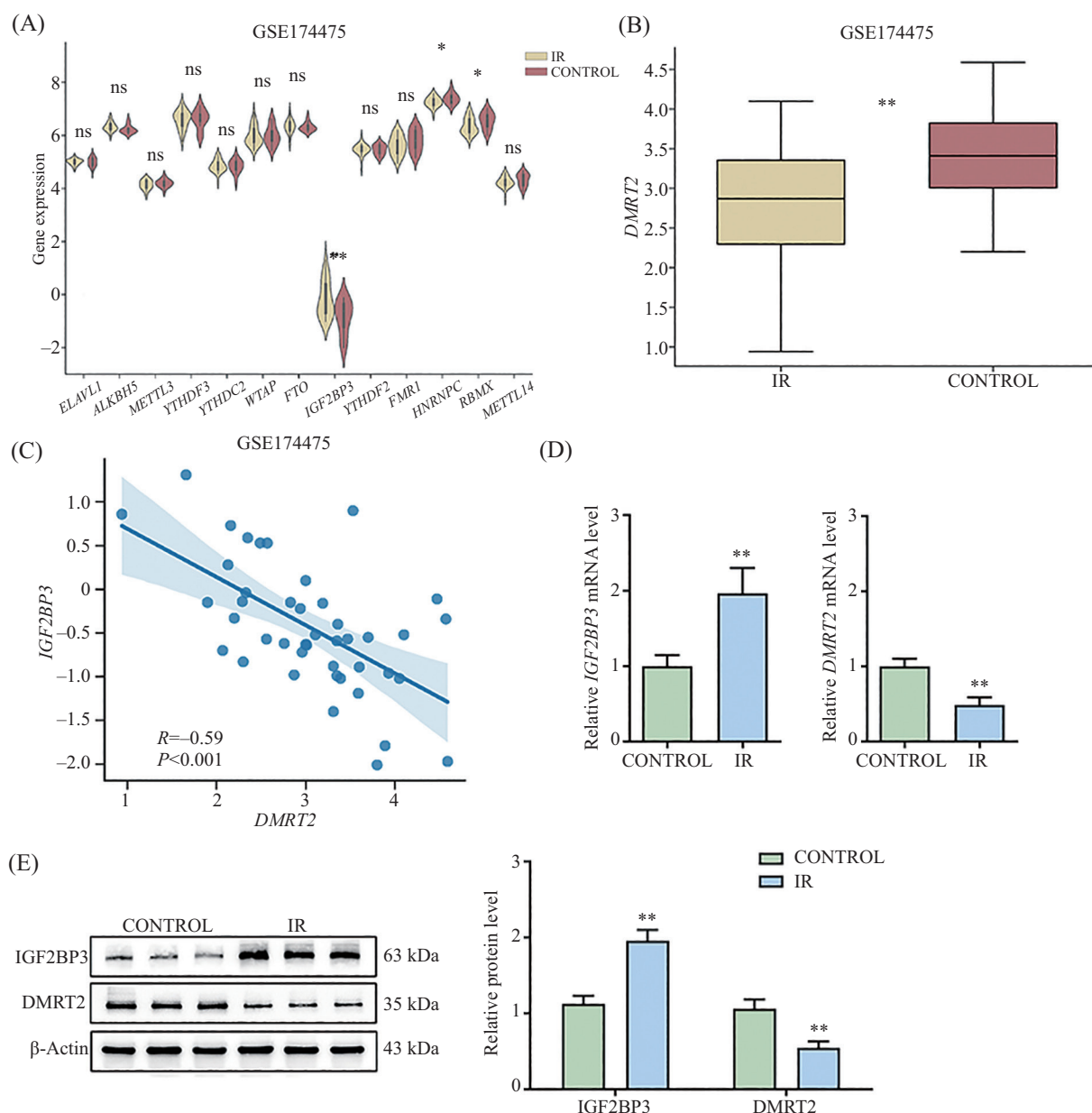
2 结果

2.1 IGF2BP3在IR进展中作为DMRT2 m⁶A的核心关联因子

本研究首先基于RM2Target数据库共挖掘出13个可能调控DMRT2 m⁶A的相关酶,利用GEO数据库挖掘GSE174475的RNA-seq数据集,包括27名IR患者(IR, $n=27$)和16名健康个体的组织样本(CONTROL, $n=16$),发现IGF2BP3在IR患者中显著升高,相反,HNRNPC、RBMX在IR患者中下降(图1A);同时我们还观察到DMRT2在IR患者中下调(图1B)。为了确认这些因子与DMRT2的相关性,采用皮尔逊分析进行进一步分析发现DMRT2仅与IGF2BP3^[1]负相关($P<0.05$, $R=-0.59$)(图1C)。为进行初步验证,对我院收治的6例IR患者临床组织样本进行qRT-PCR(图1D)和Western blot(图1E)检测,实验结果与皮尔逊分析结果一致:在IR患者中IGF2BP3表达上调,而DMRT2表达下调,两者呈相反的趋势,这些结果提示IGF2BP3在IR进展中可能作为DMRT2 m⁶A的核心关联因子。

2.2 IGF2BP3的表达与DMRT2表达存在相关性

为了进一步探究IGF2BP3在IR中的表达变化以及IGF2BP3与DMRT2的关联性,本研究建立了IR体外细胞模型并检测相关指标。首先通过油红O染色观察发现脂肪前体细胞相比脂肪细胞中有明显的红色脂滴形成(图2A);qRT-PCR结果显示*Fabp4*和*PPAR γ* 的mRNA水平下调(图2B);同时葡萄糖摄取能力降低、甘油三酯含量增加(图2C),IR关键蛋白葡萄糖转运蛋白4(glucose transporter 4, GLUT4)的表达水平和其在细胞中的分布模式均发生改变,整体表达量下降(图2E和图2F);并且IR关键通路中p-Akt/Akt的值显著降低,炎症相关因子*TNF- α* 和*IL-6*的mRNA水平显著增加($P<0.05$)(图2D),这些结果共同表明在本研究中成功建立IR细胞模型。为了



A、B: RNA-seq数据集及显著性分析图; C: *DMRT2*与*IGF2BP3*相关性分析图; D: qRT-PCR检测*IGF2BP3*和*DMRT2*在IR患者中的表达变化; E: Western blot验证*IGF2BP3*和*DMRT2*在IR患者中的表达变化。ns: 无显著性差异, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与CONTROL组相比。

A,B: RNA-seq dataset and significance analysis graphs; C: correlation analysis graph between *DMRT2* and *IGF2BP3*; D: qRT-PCR to detect the expression changes of *IGF2BP3* and *DMRT2* in IR patients; E: Western blot to verify the expression changes of *IGF2BP3* and *DMRT2* in IR patients. ns: no significance, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with CONTROL group.

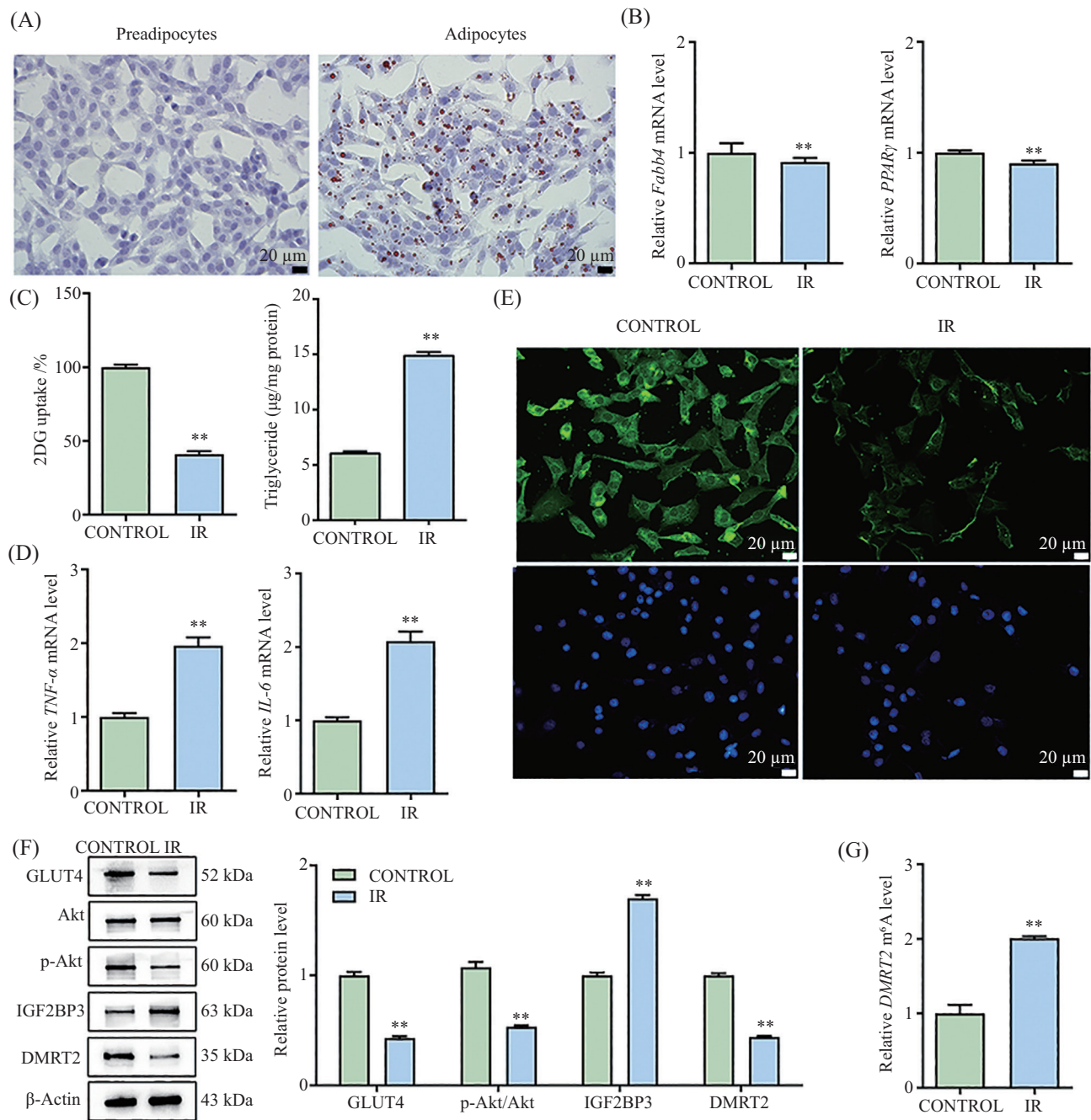
图1 在IR进展中关于DMRT2 m⁶A的核心关联因子筛选及验证

Fig.1 Screening and validation of core m⁶A-associated factors of DMRT2 in the progression of IR

探究IGF2BP3与DMRT2的关联性, 分别采用Western blot和MeRIP-qPCR检测IGF2BP3、DMRT2蛋白和DMRT2 m⁶A水平变化情况, IGF2BP3蛋白在IR模型中的表达水平显著升高, 而DMRT2表达显著下调, 并且在IR组中, DMRT2 m⁶A水平显著上调($P < 0.05$) (图2F和图2G)。这些结果提示IGF2BP3的表达与DMRT2表达存在相反的趋势。

2.3 IGF2BP3负向调控DMRT2的表达并促进IR的进展

为了确认IGF2BP3影响IR进展的具体机制, 进一步敲低/过表达IGF2BP3(图3A)。qRT-PCR和Western blot检测结果显示, 与IR组相比, IR+pc-IGF2BP3组的DMRT2 mRNA(图3A)和蛋白含量(图3C)均显著降低; 葡萄糖摄取能力降低、甘油三酯含量增加



A: 油红O染色观察脂肪前体细胞和脂肪细胞中脂滴的形成分布; B: qRT-PCR检测*Fabp4*和*PPAR γ* 的mRNA水平; C: 试剂盒检测葡萄糖摄取能力、甘油三酯含量变化; D: qRT-PCR检测*TNF- α* 和*IL-6* mRNA表达水平; E: 免疫荧光染色观察GLUT4分布; F: Western blot检测GLUT4、Akt、p-Akt、IGF2BP3和DMRT2的蛋白含量, 计算p-Akt/Akt的值; G: MeRIP-qPCR检测*DMRT2* mRNA上的m⁶A水平。** $P < 0.01$, 与CONTROL组相比。

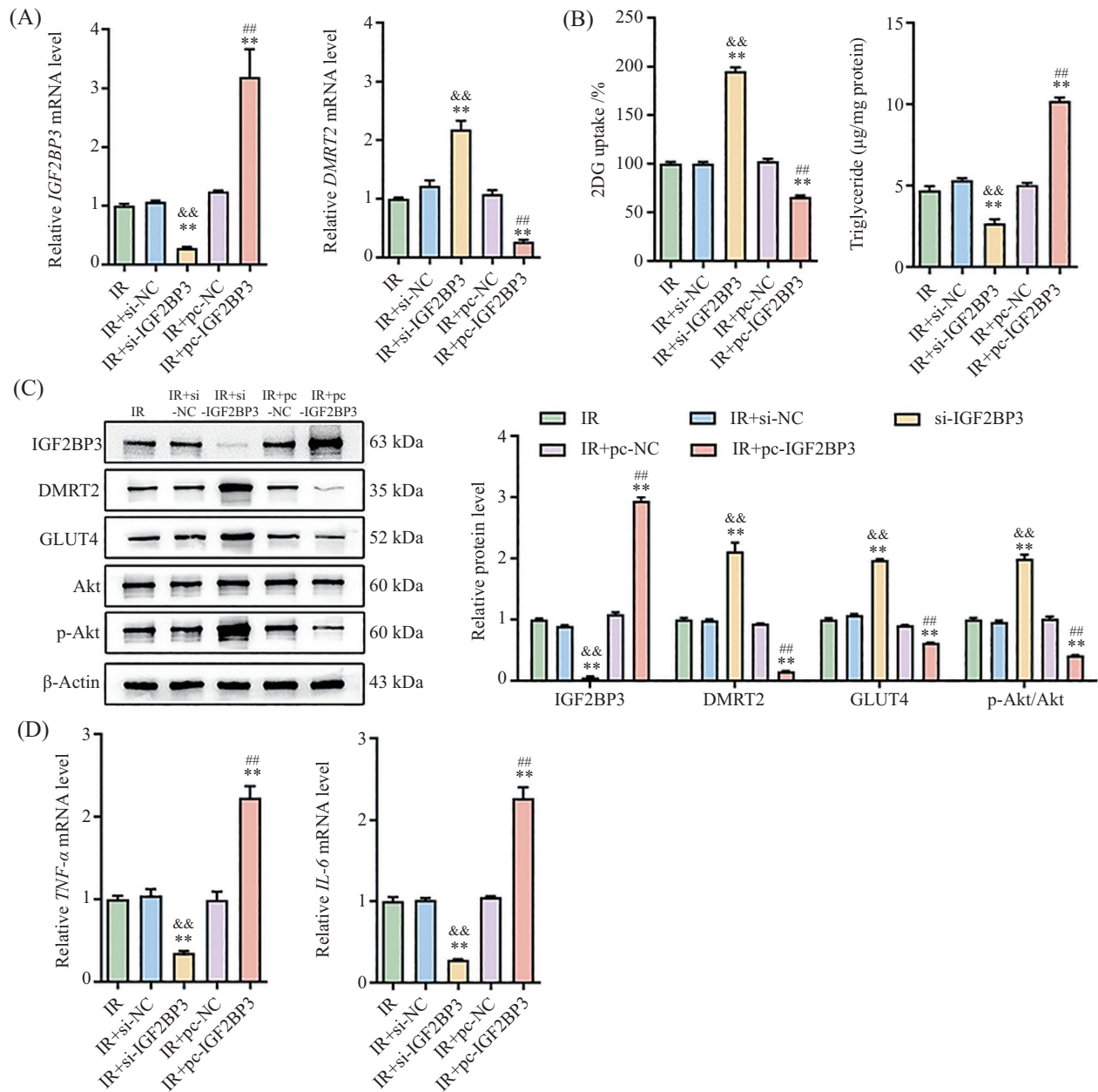
A: oil red O staining to observe the distribution of lipid droplet formation in adipose precursor cells and adipocytes; B: qRT-PCR to detect the mRNA levels of *Fabp4* and *PPAR γ* ; C: kit to detect glucose uptake capacity and changes in triglyceride content; D: qRT-PCR to detect the expression level of *TNF- α* and *IL-6* mRNA; E: immunofluorescence staining to observe the distribution of GLUT4; F: Western blot to detect the protein levels of GLUT4, Akt, p-Akt, IGF2BP3 and DMRT2 protein content, and the ratio of p-Akt/Akt was calculated; G: MeRIP-qPCR to detect the level of m⁶A on *DMRT2* mRNA. ** $P < 0.01$ compared with CONTROL group.

图2 IGF2BP3在IR进展中作为DMRT2 m⁶A的核心关联因子

Fig.2 IGF2BP3 acts as a core correlate of DMRT2 m⁶A in IR progression

(图3B); 炎症相关因子*TNF- α* 和*IL-6*的mRNA水平显著增加(图3D); IR关键蛋白GLUT4含量下降(图3C); IR关键通路p-Akt/Akt值显著降低($P < 0.05$); 而IR+si-

IGF2BP3组呈现出相反的趋势。这些结果进一步表明IGF2BP3可能通过负向调控DMRT2的表达并加速IR的进展。



A: qRT-PCR检测 $IGF2BP3$ 和 $DMRT2$ mRNA表达; B: 试剂盒检测葡萄糖摄取能力、甘油三酯含量变化; C: Western blot检测 $IGF2BP3$ 、 $DMRT2$ 、 $GLUT4$ 、 Akt 和 $p-Akt$ 的蛋白含量, 计算 $p-Akt/Akt$ 的值; D: qRT-PCR检测 $TNF-\alpha$ 和 $IL-6$ mRNA表达水平。 ** $P < 0.01$, 与IR组相比; && $P < 0.01$, 与IR+si-NC组相比; ## $P < 0.01$, 与IR+pc-NC组相比。

A: qRT-PCR to detect $IGF2BP3$ and $DMRT2$ mRNA expression; B: kit to detect changes in glucose uptake capacity and triglyceride content; C: Western blot to detect the protein content of $IGF2BP3$, $DMRT2$, $GLUT4$, Akt and $p-Akt$, and calculate the ratio of $p-Akt/Akt$; D: qRT-PCR to detection of $TNF-\alpha$ and $IL-6$ mRNA expression levels. ** $P < 0.01$ compared with IR group; && $P < 0.01$ compared with IR+si-NC group; ## $P < 0.01$ compared with IR+pc-NC group.

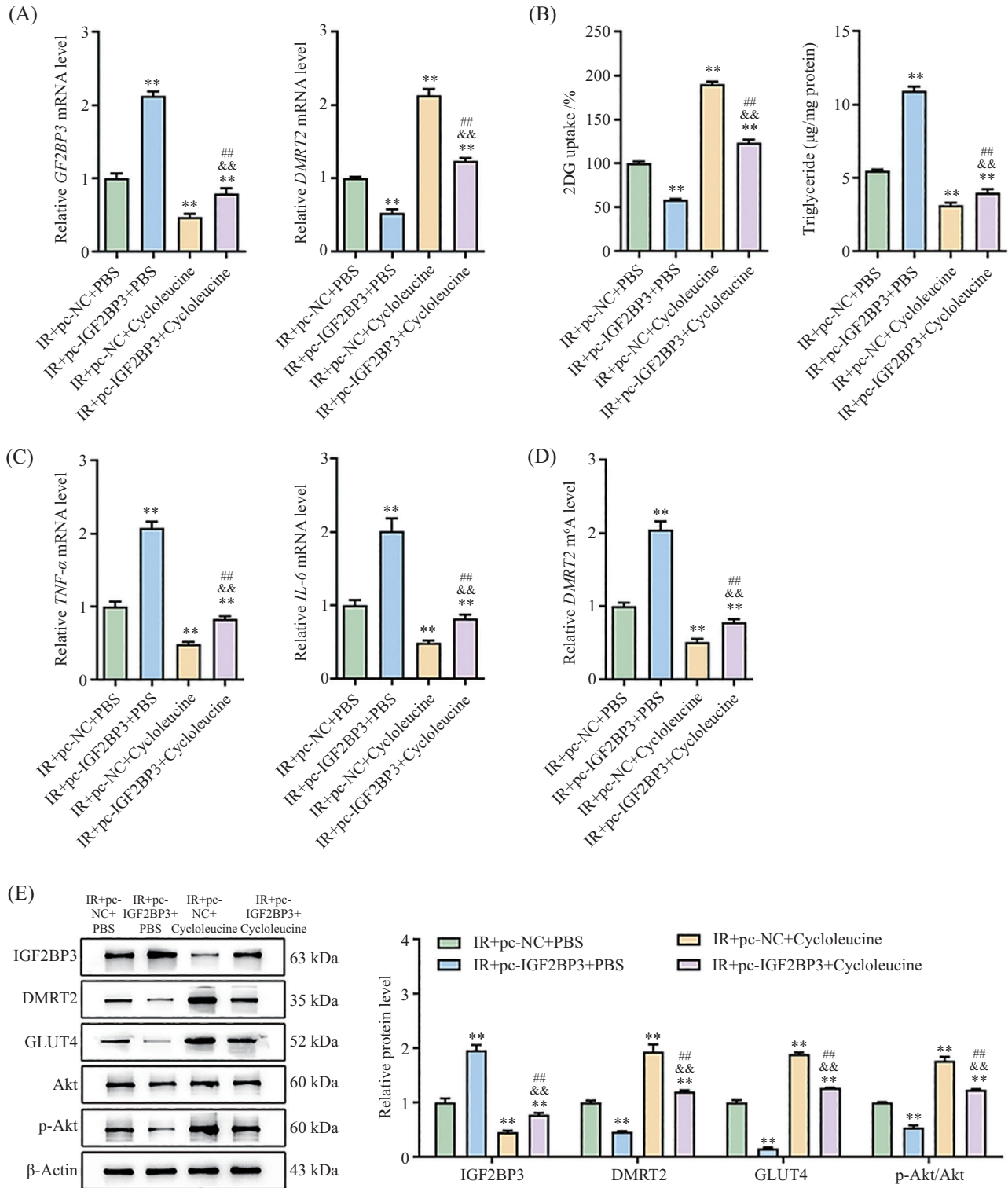
图3 IGF2BP3负向调控DMRT2的表达并促进IR的进展

Fig.3 IGF2BP3 negatively regulates DMRT2 expression and promotes IR progression

2.4 GF2BP3抑制DMRT2 mRNA的m⁶A甲基化调控IR进展

本研究通过m⁶A抑制剂干预细胞模型, 进一步探究IGF2BP3对IR进展的调控机制。结果表明, 与IR+pc-NC+PBS组相比, IR+pc-NC+Cycloleucine组

的 $IGF2BP3$ mRNA水平(图4A)、甘油三酯含量(图4B)、炎症相关因子 $TNF-\alpha$ 和 $IL-6$ 的mRNA水平(图4C)、 $DMRT2$ m⁶A水平(图4D)以及 $IGF2BP3$ 蛋白表达水平(图4E)均显著降低($P < 0.05$); $DMRT2$ mRNA水平(图4A)、葡萄糖摄取能力(图4B)、 $GLUT4$ 蛋白



A: MeRIP-qPCR检测*DMRT2* mRNA上的m⁶A水平; B: qRT-PCR检测*IGF2BP3*和*DMRT2* mRNA表达; C: 试剂盒检测葡萄糖摄取能力、甘油三酯含量变化; D: qRT-PCR检测*TNF-α*和*IL-6* mRNA表达水平; E: Western blot检测IGF2BP3、DMRT2、GLUT4、Akt和p-Akt的蛋白含量, 计算p-Akt/Akt的值。
 ***P*<0.01, 与IR+pc-NC+PBS组相比; &&*P*<0.01, 与IR+pc-IGF2BP3+PBS组相比; ##*P*<0.01, 与IR+pc-NC+Cycloleucine组相比。

A: MeRIP-qPCR to detect the level of m⁶A on *DMRT2* mRNA; B: qRT-PCR to detect the expression of *IGF2BP3* and *DMRT2* mRNA; C: kit to detect glucose uptake capacity, triglyceride content changes; D: qRT-PCR to detect the level of *TNF-α* and *IL-6* mRNA expression; E: Western blot detect the protein levels of IGF2BP3, DMRT2, GLUT4, Akt and p-Akt, and calculate the ratio of p-Akt/Akt. ***P*<0.01 compared with IR+pc-NC+PBS group; &&*P*<0.01 compared with IR+pc-IGF2BP3+PBS group; ##*P*<0.01 compared with IR+pc-NC+Cycloleucine group.

图4 IGF2BP3抑制*DMRT2* mRNA的m⁶A甲基化调控IR进展
 Fig.4 IGF2BP3 inhibits m⁶A methylation of *DMRT2* mRNA to regulate IR progression

表达水平及p-Akt/Akt值(图4E)均显著增加($P<0.05$); 而 m^6A 抑制剂干预能够部分消除过表达IGF2BP3的调控效果。这些结果表明, IGF2BP3通过靶向并调控DMRT2 m^6A 甲基化修饰进而影响IR进展。

2.5 IGF2BP3通过抑制DMRT2的表达促进IR的进展

本研究进一步通过恢复实验验证IGF2BP3介导DMRT2 m^6A 甲基化修饰促进IR进展。结果表明, 与IR+pc-IGF2BP3+pc-NC组相比, IR+pc-IGF2BP3+pc-DMRT2组的DMRT2 mRNA水平(图5A)、葡萄糖摄取能力(图5B)、DMRT2、GLUT4蛋白表达水平及p-Akt/Akt值(图5C)均显著增加($P<0.05$); 甘油三酯含量(图5B)、炎症相关因子TNF- α 和IL-6的mRNA水平(图5D)均显著降低($P<0.05$); 而过表达DMRT2能够部分消除IGF2BP3过表达对IR进展的促进作用。由此验证, IGF2BP3通过抑制DMRT2的表达促进IR的进展。

3 讨论

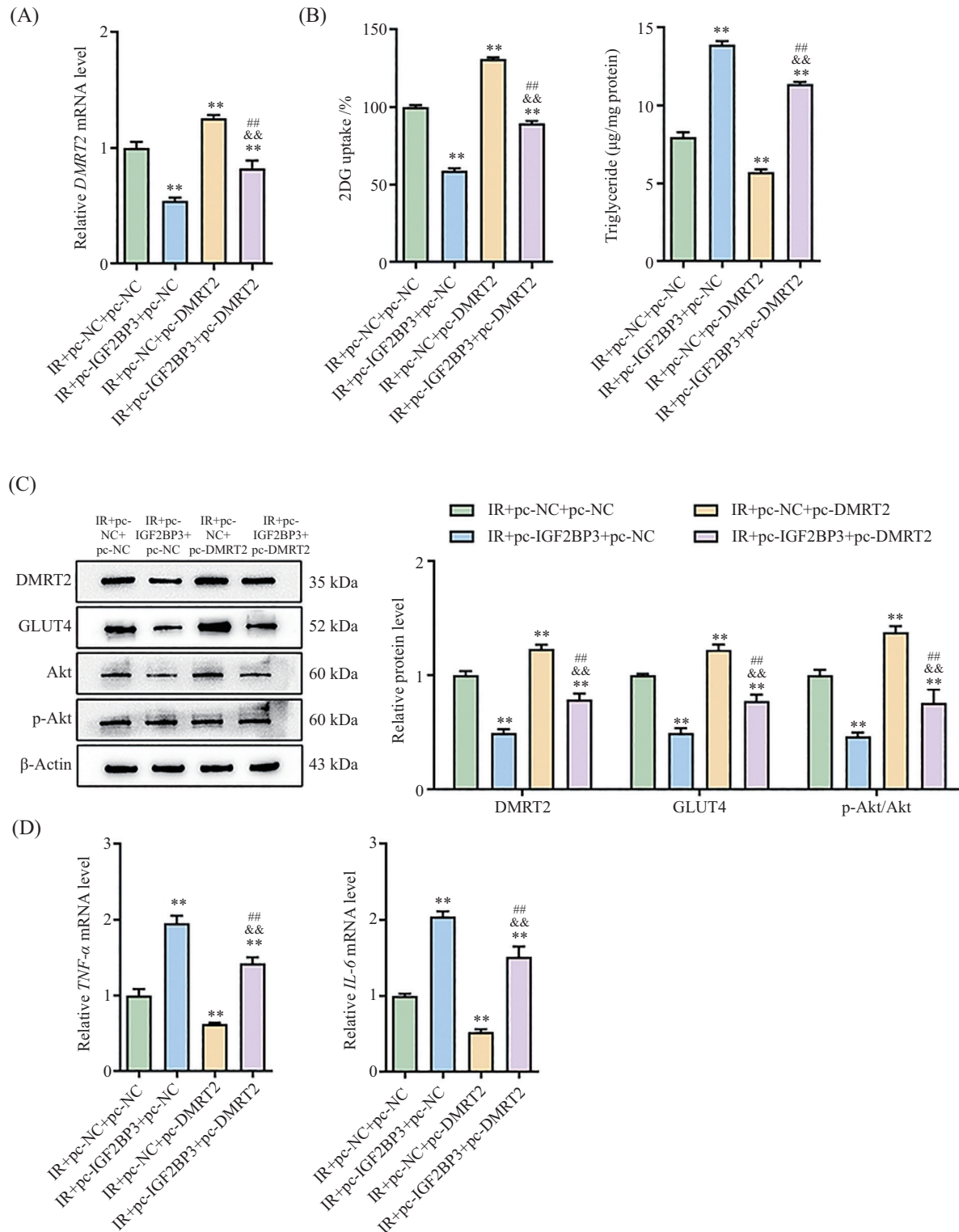
IR作为一种以靶组织对胰岛素的敏感性降低为特征的病理状态, 是代谢综合征、2型糖尿病及心血管疾病等多种慢性病发生发展的核心环节, 并常伴慢性低度炎症^[13]。尤其在肥胖流行的背景下, 由脂肪组织功能失调引发的IR及其相关代谢紊乱已成为全球性的健康挑战^[14]。脂肪组织不仅是能量储存库, 还是一个活跃的内分泌器官, 其分泌的脂肪因子在维持胰岛素敏感性和代谢稳态中扮演关键角色^[15-16]。然而, 当脂肪因子分泌失衡或功能异常时, 便会触发炎症级联反应, 加快IR进程。因此, 深入阐明调控脂肪细胞IR、糖脂代谢及炎症反应的关键分子机制, 对于开发新型IR防治策略具有重要的理论和实践意义。

DMRT2基因作为DMRT基因家族成员^[17], 近年来其在代谢调控中的作用逐渐受到关注。已有研究报道, DMRT2在炎症引发的心脏代谢疾病患者脂肪组织中表达下调, 并与循环脂多糖水平负相关, 提示其可能参与炎症介导的代谢紊乱^[18]。进一步研究表明, DMRT2能够改善肥胖症的代谢失衡^[19], 并在衰老脂肪细胞中通过抑制白色脂肪组织褐变、增强葡萄糖摄取、抑制巨噬细胞浸润及炎症反应, 从而扮演抑制IR进展的关键角色^[10]。这些发现共同指向DMRT2是脂肪组织稳态和胰岛素敏感性的重要因

素。然而, DMRT2抑制IR进展的具体作用机制未明, 仍需进一步探究。

m^6A 作为真核生物mRNA上最普遍的内部修饰, 通过影响RNA的剪接、稳定性、出核、翻译效率以及微小RNA(microRNA, miRNA)的相互作用等多个层面, 精细调控基因表达和细胞功能^[20]。 m^6A 修饰的动态可逆过程由甲基转移酶、去甲基化酶和识别蛋白共同协调^[21]。研究表明, 甲基转移酶样3-催化的 m^6A 甲基化能够促进血管平滑肌细胞在动脉粥样硬化中的异常增殖^[22]; 另有研究表明, RNA修饰在IR进展中可能发挥着重要的调控作用^[11]。例如研究发现METTL3介导的 m^6A 修饰可通过调控特定靶基因的mRNA稳定性, 进而影响骨骼肌细胞的胰岛素敏感性^[23]; 而在肝脏IR模型中, m^6A 修饰亦被证实参与调控NLRP3炎症小体的激活^[24]。更有研究指出, 脂肪组织中 m^6A 水平的改变与肥胖及IR的发生发展密切相关, 例如, FTO介导的去甲基化过程失调可影响脂肪生成和能量消耗^[25]。这些研究提示, m^6A 修饰通路是连接环境因素、遗传背景与IR表型的重要桥梁。基于此, 本研究推测 m^6A 修饰可能参与调控DMRT2在脂肪细胞IR中的表达和功能, 从而为理解IR的发病机制和寻找新的干预靶点提供新视角。基于上述背景, 本研究首先运用生物信息学策略, 整合RM2Target数据库预测、GEO公共数据集RNA-seq数据分析及皮尔逊相关性分析, 旨在从表观转录组层面筛选可能调控DMRT2的 m^6A 相关因子。分析结果首次揭示了在IR患者脂肪组织中, m^6A “阅读器”IGF2BP3的表达与DMRT2的表达呈现显著负相关性, 提示IGF2BP3可能是调控DMRT2表达的关键候选分子。为了初步验证这一生物信息学发现, 我们进一步通过qRT-PCR和Western blot, 观察到IR患者脂肪组织中IGF2BP3表达上调, 而DMRT2表达下调, 这与公共数据集的分析结果相一致, 为后续深入探究两者间的调控关系奠定了基础。

为了进一步确证IGF2BP3与DMRT2的功能联系并探究其潜在机制, 本研究构建了3T3-L1脂肪细胞IR模型。在该模型中, 我们观察到IGF2BP3表达显著上调, 与临床样本趋势一致。通过慢病毒介导的基因干预实验发现, 敲低IGF2BP3不仅能够显著上调DMRT2的表达水平, 还伴随着胰岛素信号通路关键分子GLUT4表达和Akt磷酸化水平的提升, 以及葡萄糖摄取能力的增强。与此同时, 我们观察到



A: qRT-PCR检测*DMRT2* mRNA表达情况; B: 试剂盒检测葡萄糖摄取能力、甘油三酯含量变化; C: Western blot检测DMRT2、GLUT4、Akt和p-Akt的蛋白含量, 计算p-Akt/Akt的值; D: qRT-PCR检测*TNF-α*和*IL-6* mRNA表达水平。 ** $P < 0.01$, 与IR+pc-NC+pc-NC组相比; && $P < 0.01$, 与IR+pc-IGF2BP3+pc-NC组相比; ## $P < 0.01$, 与IR+pc-NC+pc-DMRT2组相比。

A: qRT-PCR to detect *DMRT2* mRNA expression; B: kit to detect changes in glucose uptake capacity and triglyceride content; C: Western blot to detect the protein content of DMRT2, GLUT4, Akt and p-Akt, and calculate the ratio of p-Akt/Akt; D: qRT-PCR to detect *TNF-α* and *IL-6* mRNA expression levels. ** $P < 0.01$ compared with IR+pc-NC+pc-NC group; && $P < 0.01$ compared with IR+pc-IGF2BP3+pc-NC group; ## $P < 0.01$ compared with IR+pc-NC+pc-DMRT2 group.

图5 IGF2BP3通过抑制DMRT2的表达促进IR的进展

Fig.5 IGF2BP3 promotes IR progression by inhibiting DMRT2 expression

敲低IGF2BP3后, *DMRT2* mRNA的m⁶A甲基化水平显著下降。IGF2BP家族蛋白作为m⁶A的“阅读器”, 通常通过结合m⁶A修饰的mRNA, 影响其稳定性或翻译效率^[26-27]。本研究推测, 高表达的IGF2BP3识别并结合m⁶A修饰的*DMRT2* mRNA可能通过促进其降解或抑制其翻译, 从而导致DMRT2蛋白水平的降低。相应地, 敲低IGF2BP3则抑制了*DMRT2* mRNA的m⁶A依赖性降解, 增强了其稳定性, 进而导致了DMRT2蛋白表达上调。与此机制相符, 我们还发现敲低IGF2BP3能够有效抑制IR脂肪细胞中炎症因子TNF- α 、IL-6的表达, 并减少甘油三酯的积累。此外, 使用广谱m⁶A抑制剂环亮氨酸进行干预, 能够部分模拟敲低IGF2BP3的效应, 进一步提示IGF2BP3对DMRT2的调控以及对IR进展的影响可能依赖于m⁶A修饰途径。这些结果共同指向IGF2BP3可能通过一种m⁶A依赖的方式负向调控DMRT2的表达, 进而影响脂肪细胞的胰岛素敏感性和炎症状态。

IGF2BP3作为m⁶A阅读蛋白家族的重要成员, 其在肿瘤发生发展中的作用已被广泛研究, 主要通过结合带有m⁶A标记的靶mRNA, 增强其稳定性并促进其翻译, 从而促进癌细胞增殖和迁移^[28]。然而, IGF2BP蛋白家族在不同细胞类型和生理病理条件下的功能可能存在差异, 其对靶mRNA稳定性的影响也并非完全一致, 部分研究表明其也可能介导mRNA的降解^[29]。在代谢领域, IGF2BP家族蛋白的功能也逐渐被揭示。例如, 高脂饮食会诱导IGF2BP1在腹部脂肪中的表达并促进脂肪细胞分化^[27]。最近有研究报道, 在间充质干细胞向脂肪细胞分化过程中, IGF2BP3通过稳定*MYLK* mRNA抑制脂肪生成, 从而缓解高脂饮食诱导的肥胖和胰岛素抵抗^[30], 这似乎与本研究IGF2BP3促进IR的结论有所不同, 提示IGF2BP3在不同细胞类型或IR发展的不同阶段可能扮演着复杂甚至相反的角色, 其具体功能可能依赖于其调控的下游靶基因网络以及细胞内环境的特异性。本研究聚焦于成熟脂肪细胞IR模型, 发现IGF2BP3通过m⁶A依赖的方式负向调控具有胰岛素增敏作用的DMRT2表达。为了验证假设, 本研究进一步通过恢复实验发现过表达DMRT2能够部分逆转IGF2BP3对IR进展的促进作用。

综上所述, 本研究联合生物信息学和实验验证的方法表明IGF2BP3介导DMRT2的m⁶A甲基化修饰过程, 加速患者胰岛素抵抗和炎症进展, 为未来靶向

此过程开发治疗IR的新型药物提供了理论依据和潜在靶点。当然, 本研究也存在一定的局限性。例如, 本研究中临床验证样本量较小, 其结果尚需更大样本量的研究加以确证。同时, IGF2BP3如何精确识别DMRT2 mRNA上的m⁶A位点以及具体的降解机制, 例如是否涉及特定的RNA降解通路或翻译调控因子, 仍需进一步通过RIP-seq、CLIP-seq、核糖体印迹等技术深入探究。此外, 本研究主要基于细胞模型, 未来需要在IR动物模型乃至更大规模的人群队列研究中验证这一调控轴的生理病理意义和临床相关性。尽管如此, 本研究为理解脂肪细胞IR的表观转录调控网络提供了新的视角, 并提示靶向IGF2BP3介导的m⁶A修饰通路可能成为干预IR的潜在新策略。

作者贡献

郑洪健提出了本研究的总体构思并设计了实验方案; 主要的实验操作及数据采集由王永涛与王子杰合作完成; 曾璐负责对实验数据进行整理与分析; 郑洪健和杨毅宁合作撰写了论文初稿; 陶静对文稿进行了细致的修改与润色。

参考文献 (References)

- [1] NCD-RISC. Worldwide trends in underweight and obesity from 1990 to 2022: a pooled analysis of 3663 population-representative studies with 222 million children, adolescents, and adults [J]. *Lancet*, 2024, 403(10431): 1027-50.
- [2] LIN Y J, BAI M J, WANG S, et al. Lactate is a key mediator that links obesity to insulin resistance via modulating cytokine production from adipose tissue [J]. *Diabetes*, 2022, 71(4): 637-52.
- [3] HU Y, HAI J H, TI Y, et al. Adipose ZFP36 protects against diet-induced obesity and insulin resistance [J]. *Metabolism*, 2025, 164: 156131.
- [4] PERDOMO C M, COHEN R V, SUMITHRAN P, et al. Contemporary medical, device, and surgical therapies for obesity in adults [J]. *Lancet*, 2023, 401(10382): 1116-30.
- [5] KONG Y, YANG H K, NIE R, et al. Obesity: pathophysiology and therapeutic interventions [J]. *Mol Biomed*, 2025, 6(1): 25.
- [6] WANG Y Y, ZOU J Y, ZHOU H. N⁶-methyladenine RNA methylation epigenetic modification and diabetic microvascular complications [J]. *Front Endocrinol*, 2024, 15: 1462146.
- [7] ZHOU H M, XU H J, SUN R H, et al. DNA N⁶-methyladenine methylase N6AMT1 controls neuropathic pain through epigenetically modifying Kcnj16 in dorsal horn neurons [J]. *Pain*, 2024, 165(1): 75-91.
- [8] SHI L, MA X M, XIE H J, et al. Engineering m⁶A demethylation-activated DNzyme for visually and sensitively sensing fat mass and obesity-associated protein [J]. *Biosens Bioelectron*, 2023, 222: 115007.

- [9] ONO K, HATA K, NAKAMURA E, et al. Dmrt2 promotes transition of endochondral bone formation by linking Sox9 and Runx2 [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 326.
- [10] TAO J, YU X L, YUAN Y J, et al. DMRT2 interacts with FXR and improves insulin resistance in adipocytes and a mouse model [J]. *Front Endocrinol*, 2021, 12: 723623.
- [11] LI Y L, LI L, LIU Y H, et al. Identification of metabolism-related proteins as biomarkers of insulin resistance and potential mechanisms of m⁶A modification [J]. *Nutrients*, 2023, 15(8): 1839.
- [12] WAN W J, AO X, CHEN Q, et al. METTL3/IGF2BP3 axis inhibits tumor immune surveillance by upregulating N⁶-methyladenosine modification of PD-L1 mRNA in breast cancer [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 60.
- [13] AHN B. Advances in insulin resistance-molecular mechanisms, therapeutic targets, and future directions [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(6): 2574.
- [14] IVOVIC A, YUNG J H M, OPRESCU A I, et al. β -cell insulin resistance plays a causal role in fat-induced β -cell dysfunction *in vitro* and *in vivo* [J]. *Endocrinology*, 2024, 165(5): bqae044.
- [15] WANG L C, WANG B S, GASEK N S, et al. Targeting p21(Cip1) highly expressing cells in adipose tissue alleviates insulin resistance in obesity [J]. *Cell Metab*, 2022, 34(1): 75-89, e78.
- [16] CHEN X Q, LIU Z Q, LIU W J, et al. NF- κ B-inducing kinase provokes insulin resistance in skeletal muscle of obese mice [J]. *Inflammation*, 2023, 46(4): 1445-57.
- [17] GHOSH S, HOTA M, CHAI X R, et al. Exploring the underlying biology of intrinsic cardiorespiratory fitness through integrative analysis of genomic variants and muscle gene expression profiling [J]. *J Appl Physiol*, 2019, 126(5): 1292-314.
- [18] LIU Y C, FERGUSON J F, XUE C Y, et al. Tissue-specific RNA-Seq in human evoked inflammation identifies blood and adipose LincRNA signatures of cardiometabolic diseases [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(4): 902-12.
- [19] LEE G, KIM Y Y, JANG H G, et al. SREBP1c-PARP1 axis tunes anti-senescence activity of adipocytes and ameliorates metabolic imbalance in obesity [J]. *Cell Metab*, 2022, 34(5): 702-18, e705.
- [20] LAN Y H, XIA Z, SHAO Q Z, et al. Synonymous mutations promote tumorigenesis by disrupting m⁶A-dependent mRNA metabolism [J]. *Cell*, 2025, 188(7): 1828-41, e1815.
- [21] JANG D J, HWA C, KIM S, et al. RNA N⁶-methyladenosine-binding protein YTHDFs redundantly attenuate cancer immunity by downregulating IFN- γ signaling in gastric cancer [J]. *Adv Sci*, 2025, 12(3): e2410806.
- [22] DONG Z G, JIN Y R, SHEN Y C, et al. Methyltransferase-like 3-catalysed N⁶-methyladenosine methylation facilitates the contribution of vascular smooth muscle cells to atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2025, 121(4): 568-84.
- [23] JIAO Y, WILLIAMS A, WEI N. Quercetin ameliorated insulin resistance via regulating METTL3-mediated N⁶-methyladenosine modification of PRKD2 mRNA in skeletal muscle and C2C12 myocyte cell line [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2022, 32(11): 2655-68.
- [24] QIU T M, WU C B, YAO X F, et al. AS3MT facilitates NLRP3 inflammasome activation by m⁶A modification during arsenic-induced hepatic insulin resistance [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2023, 39(5): 2165-81.
- [25] WEI J B, YU X B, YANG L, et al. FTO mediates LINE1 m⁶A demethylation and chromatin regulation in mESCs and mouse development [J]. *Science*, 2022, 376(6596): 968-73.
- [26] LIU X, CHEN J Y, CHEN W L, et al. Targeting IGF2BP3 in cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11): 9423.
- [27] WANG X X, WU R F, LIU Y H, et al. m⁶A mRNA methylation controls autophagy and adipogenesis by targeting Atg5 and Atg7 [J]. *Autophagy*, 2020, 16(7): 1221-35.
- [28] LU Y X, ZHU J H, ZHANG Y X, et al. Lactylation-driven IGF2BP3-mediated serine metabolism reprogramming and RNA m⁶A-modification promotes lenvatinib resistance in HCC [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(46): e2401399.
- [29] ZHAO Y C, ZHOU Y T, QIAN Y, et al. m⁶A-dependent up-regulation of DDX21 by super-enhancer-driven IGF2BP2 and IGF2BP3 facilitates progression of acute myeloid leukaemia [J]. *Clin Transl Med*, 2024, 14(4): e1628.
- [30] HUANG X J, HE W H, FAN S, et al. IGF2BP3-mediated enhanced stability of MYLK represses MSC adipogenesis and alleviates obesity and insulin resistance in HFD mice [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2024, 81(1): 17.