

论著·基础研究

高脂饮食诱导的小鼠 NAFLD 模型肝组织中 m⁶A 甲基化修饰表达谱分析

刘君君^{1,2}, 逯素梅², 张炳杨², 李永清², 马万山^{1,2}

1. 山东大学临床医学院, 济南 250014; 2. 山东第一医科大学第一附属医院 (山东省千佛山医院) 检验医学科, 山东省医药卫生临床检验诊断学重点实验室, 济南 250014

[摘要] **目的**· 利用微阵列芯片技术检测高脂饮食诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 模型中肝组织 mRNA 的 m⁶A 甲基化修饰和基因表达的变化。**方法**· 以 6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠为实验动物, 高脂饲料喂养 16 周诱导建立 NAFLD 模型 (高脂组, $n=10$); 另设基础组 ($n=10$) 为对照, 给予含 10% 脂肪的基础饲料喂养。苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, H-E) 染色评估小鼠肝组织病理改变, 判断 NAFLD 模型是否构建成功。运用甲基化 RNA 免疫共沉淀技术 (methylated RNA immunoprecipitation, MeRIP) 和微阵列测序技术 (microarray 表达谱分析) 检测 2 组小鼠肝组织中 mRNA 的 m⁶A 甲基化和表达水平变化。**结果**· 基础组小鼠肝脏呈鲜红色, 少见脂肪沉积; 高脂组小鼠肝脏边界黄润, H-E 染色可见肝细胞中脂滴弥漫浸润且相互融合, 提示高脂饲料诱导的 NAFLD 模型构建成功。MeRIP-微阵列芯片检测结果显示, 与基础组相比, 高脂组小鼠肝脏中共有 320 个基因 m⁶A 甲基化修饰水平变化显著 ($P<0.05$ 且变化倍数 >1.5), 其中有 108 个上调基因和 212 个下调基因。将组间 m⁶A 甲基化水平差异显著的基因与 mRNA 差异表达基因取交集, 发现有 163 个基因 m⁶A 甲基化水平和 mRNA 表达水平均差异显著。**结论**· 高脂饮食诱导的小鼠 NAFLD 模型中肝组织 mRNA 的 m⁶A 修饰变化显著, 且该变化与 mRNA 的基因表达有关。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝病; m⁶A 甲基化修饰; mRNA; 表观转录组学

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.10.002 **[中图分类号]** R446 **[文献标志码]** A

Analysis of m⁶A methylation expression profiles in liver tissue of high-fat diet-induced mouse models of NAFLD

LIU Junjun^{1,2}, LU Sumei², ZHANG Bingyang², LI Yongqing², MA Wanshan^{1,2}

1. School of Clinical Medicine, Shandong University, Jinan 250014, China; 2. Department of Clinical Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University/Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Shandong Medicine and Health Key Laboratory of Laboratory Medicine, Jinan 250014, China

[Abstract] **Objective**· To detect the differences in m⁶A methylation modification and gene expression of liver tissue mRNA in high-fat diet-induced mouse models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) using microarray technology. **Methods**· The NAFLD models were established in 6-8 weeks old male C57BL/6J mice fed with high-fat chow for 16 weeks (high-fat group, $n=10$). The basal group ($n=10$) was given 10% fat diet. Hematoxylin-eosin (H-E) staining was used to assess the histopathological changes in liver tissue and to determine the success of the NAFLD models. The changes of mRNA m⁶A methylation and expression levels in the liver tissues of the two groups were detected by using methylated RNA immunoprecipitation (MeRIP) and microarray expression profiling. **Results**· The livers of the mice in the basal group were bright red with few fat deposits, while the livers of the mice in the high-fat group were yellowish with diffuse infiltration and fusion of lipid droplets in the hepatocytes by H-E staining, suggesting that the high-fat diet-induced NAFLD models were successfully constructed. The results of the MeRIP-microarray showed that the m⁶A methylation levels of 320 genes in the livers of mice in the high-fat group were significantly altered compared with those in the basal group ($P<0.05$ and fold change >1.5), of which 108 genes were up-regulated and 212 genes were down-regulated. Genes with significant differences in m⁶A methylation levels between the two groups were intersected with those with differentially expressed mRNAs, and 163 genes were found to have significant differences in both m⁶A methylation level and mRNA expression level.

[基金项目] 山东省自然科学基金 (ZR2021MH187); 山东省千佛山医院国家自然科学基金培育基金 (QYPY2020NSFC1004, QYPY2021NSFC0804)。

[作者简介] 刘君君 (1992—) 女, 主管技师, 硕士生; 电子邮箱: liujing920927@163.com。

[通信作者] 马万山, 电子邮箱: mwsqianyi@163.com。

[Funding Information] Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2021MH187); Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, National Natural Science Foundation of China Cultivation Fund (QYPY2020NSFC1004, QYPY2021NSFC0804).

[Corresponding Author] MA Wanshan, E-mail: mwsqianyi@163.com.



Conclusion The change in m⁶A modification of liver tissue mRNA in the high-fat diet-induced mouse models of NAFLD is significant and the change is associated with the gene expression of mRNA.

[Key words] non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD); m⁶A methylation modification; mRNA; epitranscriptomics

随着社会经济的进步和人们物质生活的改善,非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病率激增,已成为我国最常见的慢性肝病。有数据显示我国成年人NAFLD发病率为12%~15%^[1],预计到2030年我国NAFLD患病人数将达到3.14亿^[2]。NAFLD主要表现为肝细胞脂质代谢异常,肝细胞受损后引起炎症、胰岛素抵抗、纤维化等反应^[3]。既往研究^[4-7]表明,肥胖、2型糖尿病、高脂血症等代谢综合征与NAFLD的发生和发展关系密切,两者之间互为因果,并行发展^[8-9]。NAFLD可引起失代偿期肝硬化、肝细胞癌,还参与2型糖尿病和动脉粥样硬化的发病^[10-12]。NAFLD使患者生活质量降低,寿命缩短,还加重了国家的卫生经济负担^[13]。

基因在表达过程中会受到不同水平的调控。已有研究^[14-15]表明聚焦RNA修饰的表观转录组学在NAFLD的发生和发展中起关键调控作用,而N⁶-甲基腺嘌呤(N⁶-methyladenosine, m⁶A)是真核生物mRNA中最普遍且动态可逆的修饰方式。m⁶A修饰可沉积在RNA的转录本上,调节RNA转运、剪接、降解及翻译等过程。

本研究借助高脂饲料喂养构建小鼠NAFLD模型,利用甲基化RNA免疫共沉淀技术(methylated RNA immunoprecipitation, MeRIP)和微阵列测序技术,检测差异m⁶A甲基化修饰和差异基因表达,对数据进行联合分析,为NAFLD发病的基因调控机制研究提供理论依据。

1 对象与方法

1.1 实验动物

SPF级C57B/6J雄性小鼠,6~8周龄,体质量18~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物生产许可证号为SCXK(京)2016-0006,使用许可证号为SYXK(鲁)2018-0009。饲养环境采用12 h明和12 h暗交替,温度为20~26 °C、日温差1 °C,相对湿度达40%~70%,新鲜空气换气次数15次/h,气

流速度<0.18 m/s,压差25 Pa,氨浓度≤15 mg/m³,噪音<55 dB,照度150~300 Lux。

1.2 仪器与试剂

高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific),摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),FluorChem-E凝胶成像分析平台(美国 Cell Biosciences),生物安全柜(中国济南鑫贝西生物技术有限公司),Nano drop 2000分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific),微量移液器(德国 Eppendorf),TRIzol Reagent(美国 Invitrogen),总RNA提取试剂(中国上海奕杉生物科技有限公司),异丙醇(上海国药试剂有限公司),三氯甲烷(上海国药试剂有限公司),去离子水(北京天根生化科技有限公司),Western一抗稀释液(上海碧云天生物技术有限公司),m⁶A抗体(德国 Synaptic Systems),辣根过氧化物酶HRP标记山羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 小鼠NAFLD模型建立及分组 将20只小鼠随机分为基础组和高脂组,每组10只,分别给予10%脂肪的基础饲料(美国 Research Diets)和60%脂肪的高脂饲料(美国 Research Diets)喂养。喂养期间每3 d更换1次水和饲料,每周称量小鼠体质量,监测精神状态等。持续喂养小鼠16周。

1.3.2 肝组织病理观察 小鼠造模成功后,将小鼠深度麻醉,取其肝脏组织。先观察肝脏的大小、颜色、质地等,再将生理盐水清洗干净的肝脏用10%的甲醛溶液固定,常规处理后制备石蜡包埋切片。将石蜡切片脱蜡水化后进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, H-E)染色,光学显微镜下观察肝脏脂肪变性情况。

1.3.3 RNA的提取与质量检测 用分析天平称重小鼠肝脏组织100 mg,加入1 mL TRIzol试剂研磨组织后进行总RNA的提取,并根据试剂说明书用DNase处理以去除潜在的DNA污染物。样品经主成分分析

(principal component analysis, PCA) 合格后, 使用 Nano drop 2000 分光光度计检测总 RNA 的浓度与质量, RNA 均为单峰且 $D(260\text{ nm})/D(280\text{ nm})$ 的比值在 1.8~2.0 视为质量合格。将 RNA 片段化处理均分为 2 个部分, 一部分使用能特异识别 m⁶A 修饰的抗体进行免疫共沉淀 (immunoprecipitation, IP) 作为 IP 样品, 另一部分不进行 IP 留作 Input 样品。设计有 m⁶A 修饰的阳性对照引物和非 m⁶A 修饰的阴性对照引物, 对上述样品进行反转录和 qPCR。若阳性对照的 % (MeRIP/Input) 值是阴性对照 2 倍以上, 即认为 IP 富集实验成功, RNA 甲基化免疫共沉淀 (methylated RNA immunoprecipitation, MeRIP) 质检合格。将质量合格的样品送至上海康成生物科技有限公司进行 mRNA 表观转录组学芯片表达谱分析。同时将提取好的 RNA 稀释成 3 个浓度进行斑点杂交 (Dot-blot)。使用 m⁶A 抗体 (1 : 1 000, 1 ng/ μL) 孵育过夜, 再加入 HRP 二抗 (1 : 1 000) 孵育

1 h, 加入发光液后放置于凝胶成像分析仪中, 观察基础组和高脂组小鼠肝组织中 RNA 的 m⁶A 表达情况。

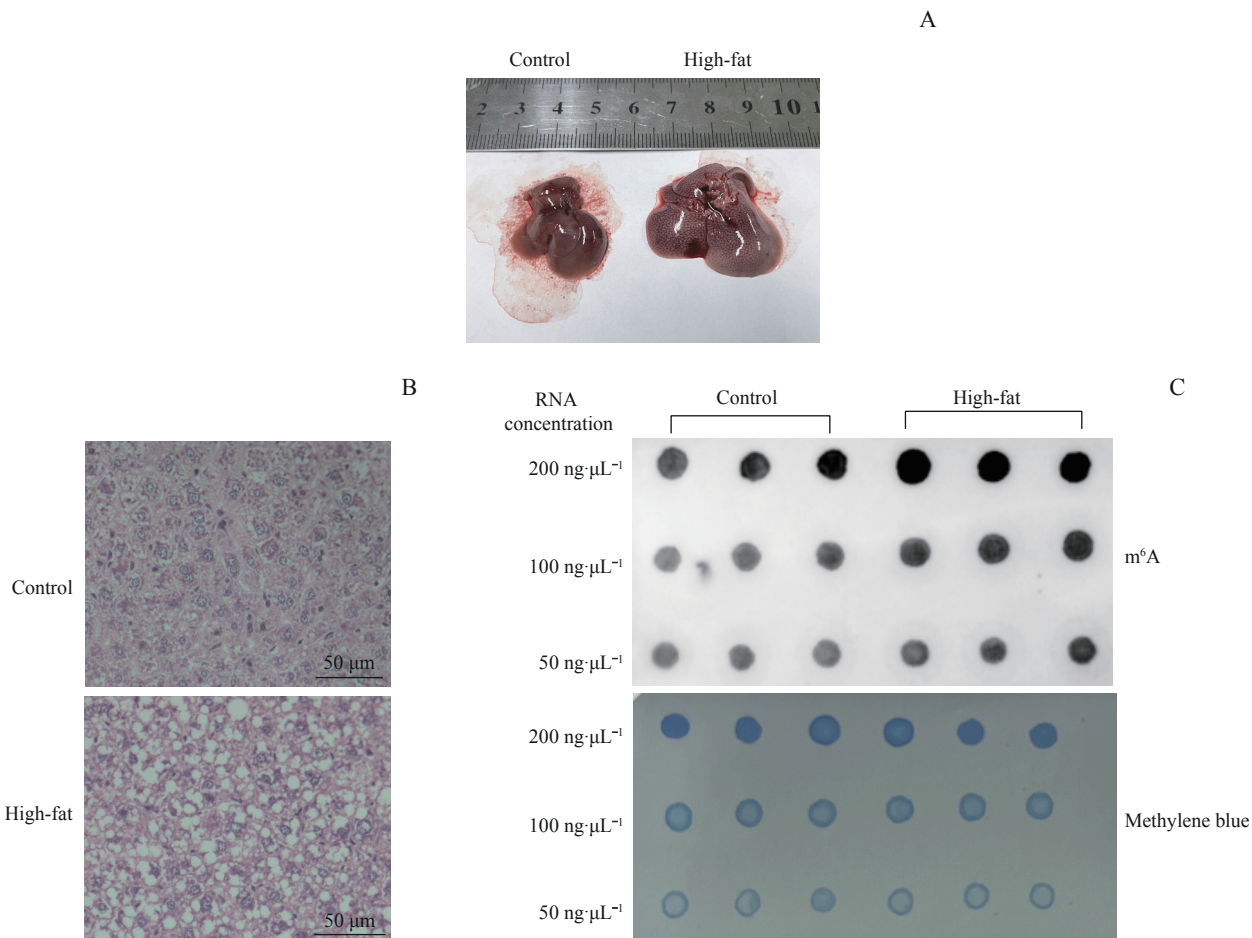
1.4 统计学方法

通过表达差异倍数 (Fold change>1.5) 和统计学显著性 ($P<0.05$), 筛选 2 组之间差异 m⁶A 甲基化基因和差异表达基因。

2 结果

2.1 小鼠 NAFLD 肝组织中 m⁶A 修饰水平变化

高脂饲料喂养 16 周后, 基础组和高脂组的小鼠体质量出现明显差异, 高脂组小鼠平均体质量为 (45 ± 5) g, 而基础组小鼠为 (25 ± 5) g。高脂组的小鼠肝脏边界黄润, 表面有颗粒感, 且有明显的弥漫性肿大 (图 1A)。H-E 染色见高脂组小鼠肝组织细胞质中



Note: A. General observation of the livers. B.H-E staining showed the cytoplasm of liver tissue in the high-fat group was filled with lipid droplets. C.Dot-blot showed the increase of m⁶A methylation levels in the high-fat group.

图1 高脂饮食诱导的小鼠NAFLD肝组织中m⁶A修饰水平变化

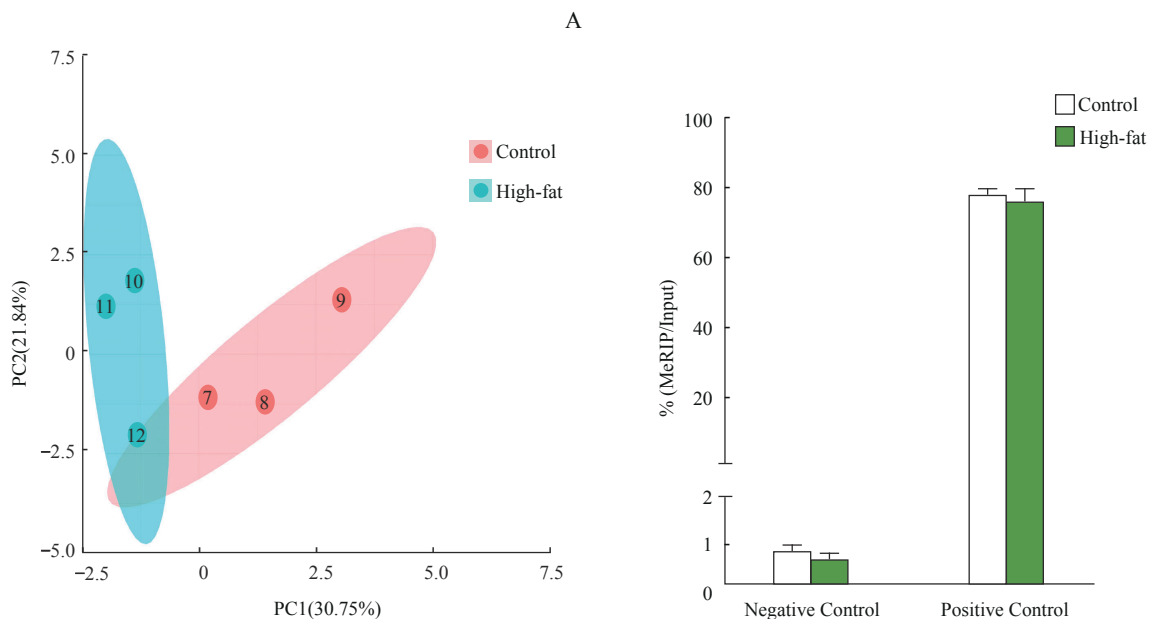
Fig 1 Changes of m⁶A modification levels in high-fat diet mouse livers

充满脂滴, 且脂滴相互融合导致细胞核偏位 (图 1B)。以上结果均提示高脂饮食诱导的小鼠 NAFLD 模型构建成功。Dot-blot 实验结果显示, 与基础组小鼠相比, 高脂组小鼠肝组织内总 m⁶A 修饰水平升高 (图 1C)。

2.2 基因微阵列芯片实验流程的质量控制

基础组 3 只小鼠 (编号为 7、8、9), 高脂组 3

只小鼠 (编号为 10、11、12), 经 PCA 分析后可知 2 组样本之间的相似性低, 符合基因芯片分析的要求 (图 2A)。使用 Nano drop 对高脂组和基础组小鼠肝组织 RNA 进行定量及质量检测, 检测结果合格的前提下, 进行 MeRIP-qPCR 质量检测。结果显示, 阴性对照 % (MeRIP/Input) <1, 阳性对照 % (MeRIP/Input) >70, MeRIP 质量检测合格 (图 2B)。



Note: A. PCA-plot. B. MeRIP-qPCR quality inspection bar chart showed negative and positive control.

图2 样品质控和 MeRIP-qPCR 质量检测

Fig 2 Sample quality control and MeRIP-qPCR quality testing

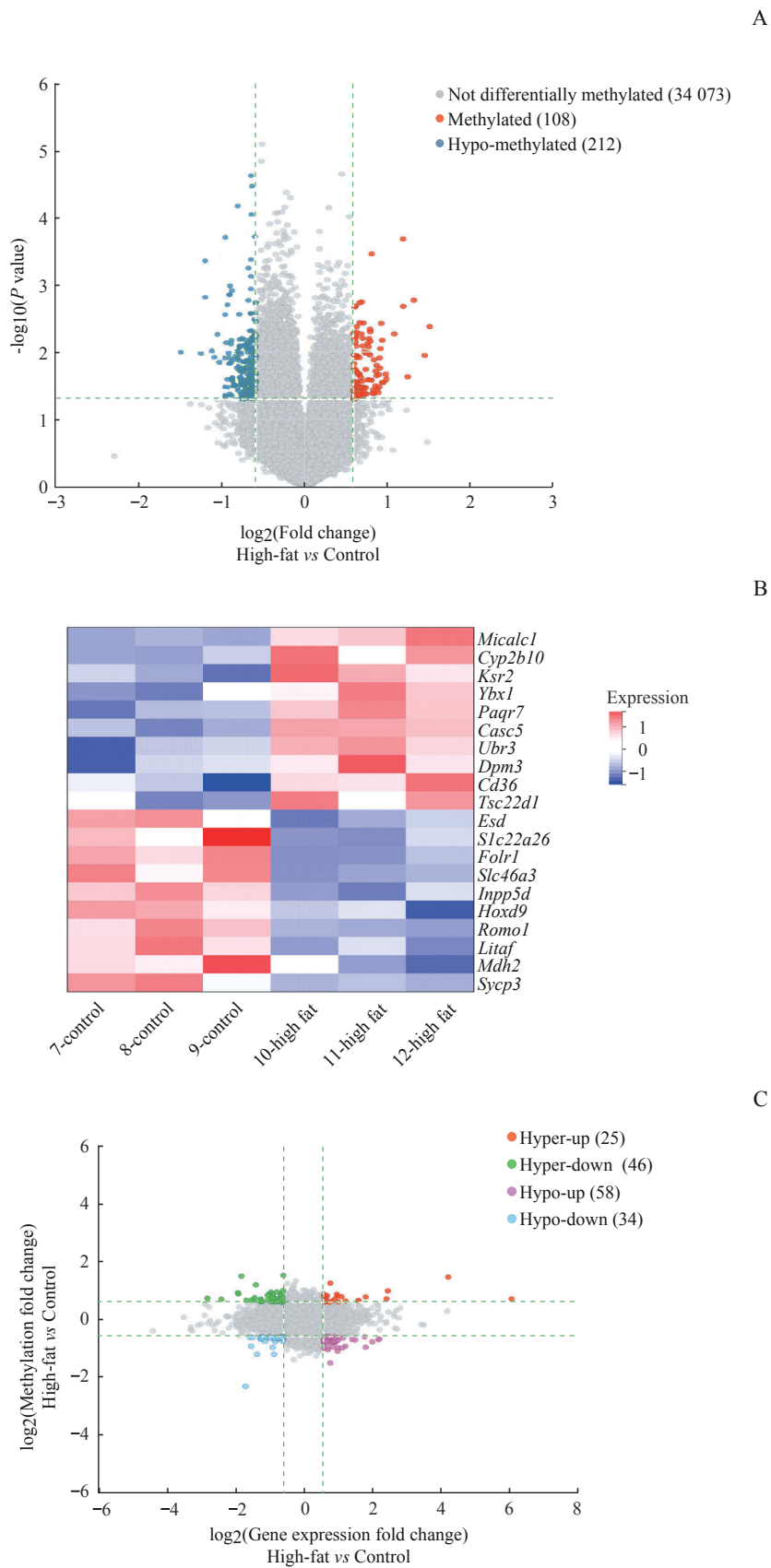
2.3 小鼠肝脏 mRNA 差异 m⁶A 修饰基因与差异表达基因的联合分析

2 组小鼠肝组织基因芯片差异甲基化分析发现, 与基础组相比, 高脂组有 320 个 mRNA 发生 m⁶A 甲基化差异修饰 (differentially methylated m⁶A site, DMMS) (变化倍数 >1.5, $P < 0.05$), 其中有 108 个上调基因、212 个下调基因 (图 3A)。将 2 组间差异表达的基因进行排序筛选, 将 m⁶A 上调差异的前 10 位基因和 m⁶A 下调差异的前 10 位基因作热图分析, 见图 3B。上调和下调前 10 位基因的具体信息见表 1。进一步将含有 m⁶A 甲基化水平与 mRNA 表达水平差异均 1.5 倍及以上的基因取交集, 共得到 163 个差异基因, 包括 25 个 m⁶A 甲

基化水平升高且 mRNA 表达上调的基因, 46 个 m⁶A 甲基化水平升高且 mRNA 表达下调的基因, 58 个 m⁶A 甲基化水平降低且 mRNA 表达上调的基因, 34 个 m⁶A 甲基化水平降低且 mRNA 表达下调的基因 (图 3C)。

2.4 小鼠肝组织差异 m⁶A 修饰与差异表达的基因信息

进一步对小鼠肝组织 m⁶A 修饰和表达差异均 1.5 倍及以上的基因与 m⁶A 修饰差异显著的基因 (变化倍数 >1.5, 且 $P < 0.05$) 取交集。将高甲基化高表达的基因和 m⁶A 甲基化修饰显著上调的基因取交集后, 筛选出 19 个基因 (图 4A); 将高甲基化低表达的基因和 m⁶A



Note: A. Volcano plot of differential m⁶A methylation mRNAs. B. Cluster diagram showed top 10 differentially m⁶A-methylated mRNAs. C. Four quadrant diagrams showed differential methylation associated with gene expression in the high-fat group and the control group.

图3 小鼠肝脏 mRNA 差异 m⁶A 修饰基因与差异表达基因的联合分析

Fig 3 Conjoint analysis of differential m⁶A methylation mRNAs and differentially expressed genes in the livers of mice

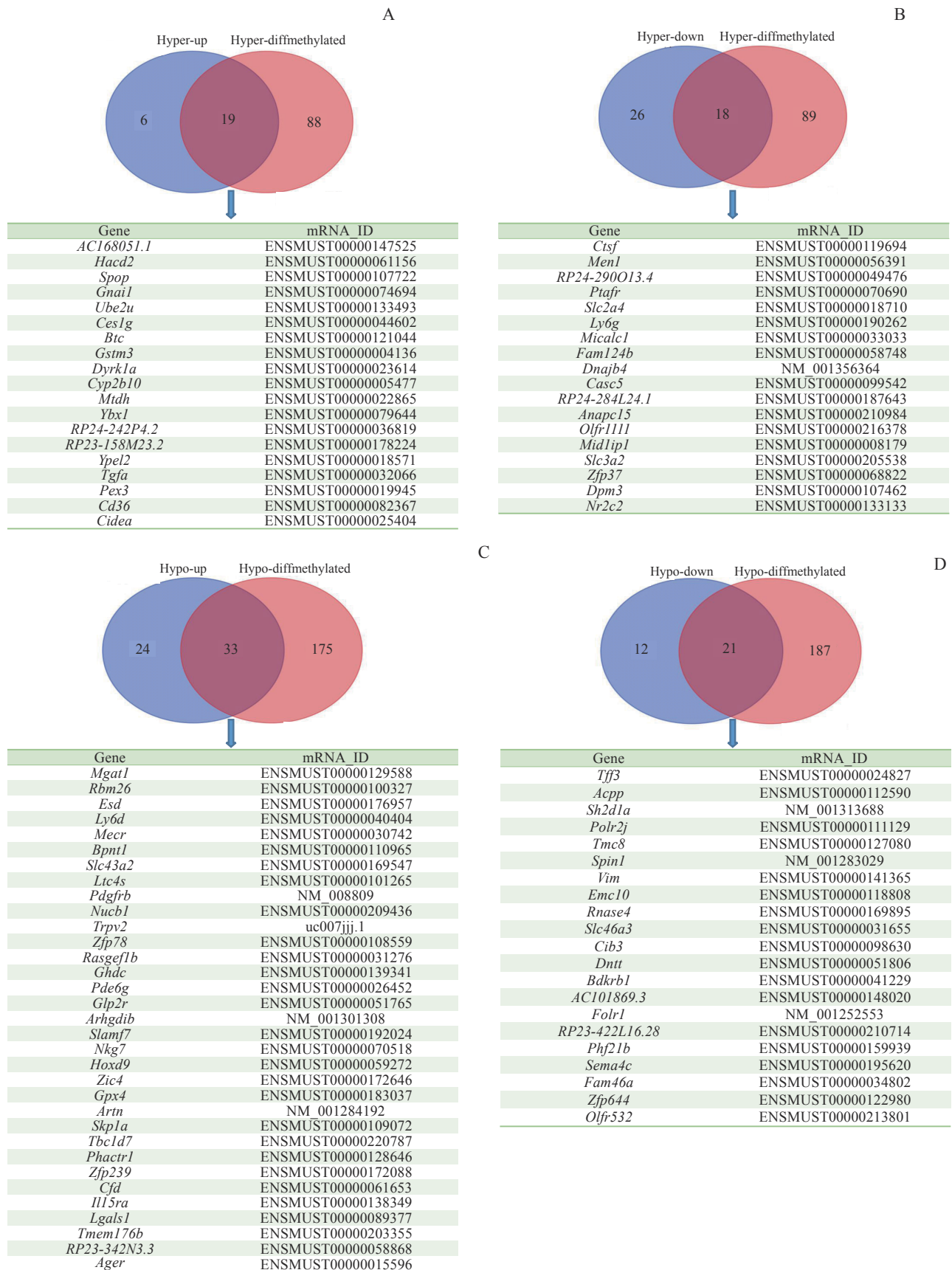


表1 前10位m⁶A差异修饰的mRNA信息Tab 1 Top 10 differentially m⁶A-methylated mRNAs

Gene	mRNA_ID	Locus	RNA length/nt	Fold change	P value
Up-regulated gene					
<i>Micalc1</i>	ENSMUST00000033033	chr7: 112374345-112395355: +	2 259	2.840	0.004
<i>Cyp2b10</i>	ENSMUST00000005477	chr7: 25897676-25926559: +	1 822	2.721	0.011
<i>Ksr2</i>	ENSMUST00000180430	chr5: 117414000-117775003: +	13 125	2.484	0.001
<i>Ybx1</i>	ENSMUST00000079644	chr4: 119277981-119294604: -	1 628	2.359	0.023
<i>Paqr7</i>	ENSMUST00000095074	chr4: 134497004-134510235: +	3 550	2.274	0.002
<i>Casc5</i>	ENSMUST00000099542	chr2: 119047119-119104121: +	6 525	2.270	0.000
<i>Ubr3</i>	ENSMUST00000131553	chr2: 69897303-69938659: +	1 801	2.113	0.005
<i>Dpm3</i>	ENSMUST00000107462	chr3: 89259358-89267077: +	827	1.978	0.025
<i>Cd36</i>	ENSMUST00000082367	chr5: 17782016-17835696: -	3 016	1.965	0.021
<i>Tsc22d1</i>	ENSMUST00000142683	chr14: 76487759-76506998: +	797	1.928	0.028
Down-regulated gene					
<i>Esd</i>	ENSMUST00000176957	chr14: 74732384-74749848: +	1 117	0.356	0.010
<i>Slc22a26</i>	ENSMUST00000120522	chr19: 7781041-7802578: -	2 854	0.421	0.010
<i>Folr1</i>	NM_001252553	chr7: 101858331-101870788: -	1 337	0.437	0.000
<i>Slc46a3</i>	ENSMUST00000138244	chr5: 147893881-147894815: -	388	0.437	0.001
<i>Inpp5d</i>	ENSMUST00000167032	chr1: 87676239-87720502: +	4 125	0.462	0.010
<i>Hoxd9</i>	ENSMUST00000059272	chr2: 74697727-74700208: +	2 136	0.471	0.012
<i>Romo1</i>	ENSMUST00000088610	chr2: 156144039-156145797: +	569	0.484	0.005
<i>Litaf</i>	ENSMUST00000117360	chr16: 10960824-10975579: -	763	0.492	0.014
<i>Mdh2</i>	ENSMUST00000019323	chr5: 135778480-135790391: +	1 456	0.509	0.032
<i>Syp3</i>	ENSMUST00000125612	chr10: 88459664-88473236: +	1 169	0.513	0.044

甲基化修饰显著上调的基因取交集后, 筛选出 18 个基因 (图 4B); 将低甲基化高表达的基因和 m⁶A 甲基化修饰显著下调的基因取交集后, 筛选出 33 个基因

(图 4C); 将低甲基化低表达的基因和 m⁶A 甲基化修饰显著下调的基因取交集后, 筛选出 21 个基因 (图 4D)。



Note: A to D—Venn diagrams for high/low m⁶A methylation and high/low expression genes.

图4 小鼠肝组织差异显著的m⁶A修饰且差异表达的基因信息

Fig 4 Differential m⁶A modification and differentially expressed genes in mouse liver tissue

3 讨论

NAFLD的病因及发病机制比较复杂,目前仍未完全阐明。现阶段NAFLD的治疗主要通过改善生活方式以稳定机体调节机制,积极寻找并去除可能的病因和诱因,以及减肥等,尚未发现可以根治该病的药物^[16]。因此,NAFLD的治疗也是全球面临的一大难题。

m⁶A修饰是一种新型的表观转录后调控基因表达的重要方式,在多种疾病中的作用备受关注。已有研究^[17]证实m⁶A在人类生命过程中的各个阶段起关键作用,并参与NAFLD、肥胖和2型糖尿病等疾病的发生和发展。PENG等^[18]研究发现,mRNA的m⁶A修饰与脂质代谢关系密切,高脂饮食诱导脂肪肝的m⁶A修饰发生改变,影响肝脏的胰岛素敏感性。m⁶A甲基化作为新型生物标志物,为代谢性疾病的治疗提供了潜在的新靶点。因此,建立高脂饮食诱导下肝组织m⁶A修饰差异表达谱具有重要意义。

近年来,微阵列芯片作为一种快速、并行、高效的分子生物学研究工具,对探究基因表达的调控机制有重要的辅助作用。本研究通过高脂饲料喂养小鼠,构建了稳定可靠的小鼠NAFLD模型。研究发现NAFLD小鼠总m⁶A甲基化水平升高,在RNA样本质检合格的前提下,进一步进行真核生物转录组基因m⁶A微阵列芯片表达谱分析,基于检测结果建立了高脂饮食诱导下肝组织m⁶A修饰差异表达谱。其中,有320个基因m⁶A甲基化修饰水平变化显著($P < 0.05$ 且变化倍数 > 1.5),且发现有163个基因m⁶A甲基化水平和mRNA表达水平均差异显著。该结果提示m⁶A甲基化水平可能影响转录组基因表达的变化,且与肝脏脂质代谢的调控密切相关,这163个差异基因在NAFLD发生和发展中可能发挥重要的调控作用。

现有文献证实,筛选出的部分差异表达基因与NAFLD的发生和发展有不同程度的相关性。例如,有研究^[19]表明小鼠肝脏组织*Hacd2*缺失可通过减少血清中长链脂肪酸的生成增加以产热为主的能量消耗,改善高脂饮食诱导的NAFLD等。*Cd36*缺失的小鼠肝脏中*Srebpl*、*Ppar γ* 和*Fasn*等成脂相关基因表达降低,在HepG2细胞中也证实*CD36*通过与*INSIG2*结合,促进肝脏*SREBP1*表达和脂质从头合成途径,从而促进NAFLD的发生和发展^[20]。外周血PPAR γ 和*CIDEA*的mRNA分子表达水平与血浆三酰甘油和总胆固醇水平呈显著负相关^[21]。SANS等^[22]的研究表明:在肥胖患

者中,肝脏*CIDEA*的表达与NAFLD活性评分和肝损伤密切相关;肝脏*CIDEA*的表达与肥胖程度呈正相关,且会加重NAFLD的进展。TANG等^[23]报道,高脂饮食小鼠肝脏中*CIDEA*的m⁶A甲基化水平升高与mRNA表达水平呈显著正相关,经实验证实mettl16介导的m⁶A甲基化通过上调*CIDEA*表达水平促进NAFLD进展。有研究^[24]显示,*Ces1/Es-x*在小鼠肝脏脂肪代谢中起调节作用,*Ces1/Es-x*基因敲除小鼠出现肥胖、脂肪肝、高胰岛素血症等NAFLD表现。高脂诱导的肥胖小鼠中,*MECR*基因的表达水平与2型糖尿病密切相关,ATP降低MECR蛋白水平可能参与胰岛素抵抗的发生^[25]。高脂饮食可诱导小鼠肝脏发生严重的脂肪样变,而纤维化相关基因*Pdgfrb*、*Tgfb*在小鼠体内表达升高^[26]。以上研究都提示,本次研究中筛选出的差异基因对NAFLD的发病机制研究有重要意义。

本研究未对筛选出的差异基因进行进一步验证。后续我们将围绕差异基因进行验证,并通过干扰或过表达差异基因,开展进一步的功能分析,为NAFLD的预防和治疗提供新的靶点。

综上所述,本研究通过比较正常小鼠与NAFLD模型小鼠中肝脏组织的m⁶A甲基化及mRNA表达差异,发现NAFLD小鼠肝组织中m⁶A修饰水平发生了显著变化,且mRNA表达水平变化显著,表明m⁶A甲基化可能通过影响mRNA的表达调控NAFLD的发生和发展。本研究建立了主要差异基因表达谱,为筛选更多的NAFLD治疗靶点提供了一定的理论基础。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

本研究涉及的所有动物实验均已通过山东第一医科大学第一附属医院医学伦理委员会的审核批准,审批号为[2022]动伦审字(S081)号。所有实验过程均遵照《实验动物福利伦理审查指南》的条例进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by Medical Ethics Committee of The First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University (Approval Letter: [2022] Animal Ethics Society No.S081), and all experimental animal protocols were carried out by following the guidelines of *Guideline for Ethical Review of Animal Welfare*.

作者贡献/Authors' Contributions

马万山、逯素梅、刘君君参与了实验设计以及论文的写作和修改,

刘君君、张炳杨、李永清负责实验操作与数据分析。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The study was designed by MA Wanshan, LU Sumei and LIU Junjun. The manuscript was drafted and revised by MA Wanshan, LU Sumei and LIU Junjun. The experiments were performed by LIU Junjun, ZHANG Bingyang and LI Yongqing. The data were analyzed by LIU

Junjun, ZHANG Bingyang and LI Yongqing. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2023-04-14
- Accepted: 2023-09-12
- Published online: 2023-10-28

参 · 考 · 文 · 献

- [1] 祥蔚. IL-17A 基因敲除减轻 LPS 诱导的脂肪肝小鼠炎症性肝损伤及其机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2017.
- XIANG W. IL-17A deficiency alleviates LPS-induced steatotic liver injury in mice and the underlying mechanism[D]. Chongqing: Third Military Medical University of Chinese P. L. A., 2017.
- [2] ESTES C, ANSTEE Q M, ARIAS-LOSTE M T, et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030[J]. *J Hepatol*, 2018, 69(4): 896-904.
- [3] CHENG Y, HOU T, PING J, et al. Quantitative succinylome analysis in the liver of non-alcoholic fatty liver disease rat model[J]. *Proteome Sci*, 2016, 14: 3.
- [4] XU Z J, SHI J P, YU D R, et al. Evaluating the relationship between metabolic syndrome and liver biopsy-proven non-alcoholic steatohepatitis in China: a multicenter cross-sectional study design[J]. *Adv Ther*, 2016, 33(11): 2069-2081.
- [5] YOUNOSSI Z M, KOENIG A B, ABDELATIF D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. *Hepatology*, 2016, 64(1): 73-84.
- [6] YOUNOSSI Z M, GOLABI P, DE AVILA L, et al. The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Hepatol*, 2019, 71(4): 793-801.
- [7] PASCHOS P, PALETAS K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome[J]. *Hippokratia*, 2009, 13(1): 9-19.
- [8] STEFAN N, HÄRING H U, CUSI K. Non-alcoholic fatty liver disease: causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019, 7(4): 313-324.
- [9] ALEXANDER M, LOOMIS A K, VAN DER LEI J, et al. Risks and clinical predictors of cirrhosis and hepatocellular carcinoma diagnoses in adults with diagnosed NAFLD: real-world study of 18 million patients in four European cohorts[J]. *BMC Med*, 2019, 17(1): 95.
- [10] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER-TETRI B A, RINELLA M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies[J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 908-922.
- [11] DIEHL A M, DAY C. Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(21): 2063-2072.
- [12] 王园园, 蒋建萍. 非酒精性脂肪肝与代谢综合征各组分关系的研究进展[J]. *中国当代医药*, 2022, 29(15): 36-39, 43.
- WANG Y Y, JIANG J P. Research progress of the relationship between nonalcoholic fatty liver disease and components of metabolic syndrome[J]. *China Modern Medicine*, 2022, 29(15): 36-39, 43.
- [13] ZHOU J, ZHOU F, WANG W, et al. Epidemiological features of NAFLD from 1999 to 2018 in China[J]. *Hepatology*, 2020, 71(5): 1851-1864.
- [14] 李永清. METTL3 介导的 CYP2B6 m⁶A 甲基化修饰在非酒精性脂肪肝肝病肝细胞胰岛素敏感性中的作用和机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2022.
- LI Y Q. Role and mechanism of METTL3-mediated CYP2B6 m⁶A methylation modification in insulin sensitivity in hepatocytes with non-alcoholic fatty liver disease[D]. Jinan: Shandong University, 2022.
- [15] 叶棣文, 马万山, 逯素梅. RNAm⁶A 甲基化修饰在代谢综合征中的研究进展[J]. *临床检验杂志*, 2022, 40(9): 691-694.
- YE D W, MA W S, LU S M. Advances in the study of RNA m⁶A methylation modification in the metabolic syndrome[J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 2022, 40(9): 691-694.
- [16] SUMIDA Y, YONEDA M. Current and future pharmacological therapies for NAFLD/NASH[J]. *J Gastroenterol*, 2018, 53(3): 362-376.
- [17] 陈子扬, 蒲锐, 邓爽, 等. m⁶A 甲基化与代谢性疾病调控[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(20): 3250-3255.
- CHEN Z Y, PU R, DENG S, et al. N⁶-methyladenosine methylation and its regulation in metabolic diseases[J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2022, 26(20): 3250-3255.
- [18] PENG Z, GONG Y, WANG X, et al. METTL3-m⁶A-Rubicon axis inhibits autophagy in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(2): 932-946.
- [19] 韦冷云. Hacd2 在脂质代谢中的功能及其作用机制[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
- WEI L Y. Function and mechanism of Hacd2 in lipid metabolism[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.
- [20] 曾晗. CD36 在肝细胞脂质从头合成中的作用及机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2022.
- ZENG H. The role of CD36 in regulation of hepatocyte de novo lipogenesis[D]. Chongqing: ChongQing Medical University, 2022.
- [21] 全雪薇, 冶学燕, 刘春燕, 等. 2 型糖尿病合并肥胖患者外周血 PPARG、CIDEA、ECHDC3、CGN mRNA 表达与血脂水平的关系研究[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2021, 31(6): 4-8, 199.
- TONG X W, YE X Y, LIU C Y, et al. Relationship between mRNA expression of PPARG, CIDEA, ECHDC3, CGN and lipid levels in peripheral blood of patients with type 2 diabetes mellitus complicated with obesity[J]. *Shenzhen Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, 2021, 31(6): 4-8, 199.
- [22] SANS A, BONNAFOUS S, ROUSSEAU D, et al. The differential expression of CIDE family members is associated with NAFLD progression from steatosis to steatohepatitis[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7501.
- [23] TANG J, ZHAO X, WEI W, et al. METTL16-mediated translation of CIDEA promotes non-alcoholic fatty liver disease progression via m⁶A-dependent manner[J]. *PeerJ*, 2022, 10: e14379.
- [24] QUIROGA A D, LI L, TRÖTZMÜLLER M, et al. Deficiency of carboxylesterase 1/esterase-x results in obesity, hepatic steatosis, and hyperlipidemia[J]. *Hepatology*, 2012, 56(6): 2188-2198.
- [25] 钱胜南. ATP 在胰岛素抵抗机制中对线粒体 MECR 蛋白的影响[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
- QIAN S N. Effect of ATP on mitochondrial MECR protein in the mechanism of insulin resistance[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [26] 潘晓燕. FOXO 转录因子在饮食诱导的脂肪性肝病中的作用机制研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- PAN X Y. Study on the mechanisms of action of FOXO transcriptional factors in diet-induced fatty liver disease[D]. Suzhou: Soochow University, 2018.

[本文编辑] 吴洋

