

# 长链非编码 RNA AI662270 调控衰老小鼠脂肪细胞胰岛素抵抗的机制研究

张一凡<sup>1,2,3</sup>, 胡雅琪<sup>1,2</sup>, 王锐<sup>1,2</sup>, 王淑文<sup>1,2</sup>, 袁成福<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>国家中医药管理局中药药理(肿瘤)科研三级实验室, 湖北宜昌 443002; <sup>2</sup>三峡大学基础医学院, 湖北宜昌 443002; <sup>3</sup>海安市人民医院病理科, 江苏南通 226600

[中图分类号] R34; R589.1; R589.2

[文献标志码]

[DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0251.2025.0319

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 张一凡, 胡雅琪, 王锐, 等. 长链非编码 RNA AI662270 调控衰老小鼠脂肪细胞胰岛素抵抗的机制研究[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(8): 999-1007.

[收稿日期] 2024-02-29

[录用日期] 2024-04-25

[上线日期] 2025-03-19

**[摘要]** **目的** 探究长链非编码 RNA(lncRNA)AI662270 调控衰老小鼠脂肪细胞胰岛素抵抗的机制。**方法** (1)20 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为青年组与老年组( $n=10$ ), 青年组小鼠饲养至 4 月龄后采用乌拉糖麻醉后眼球取血处死, 老年组饲养至 18 月龄后采用相同处死方式, 分离附睾白色脂肪组织(eWAT)和肝组织。采用 Western blotting 检测肿瘤抑制基因 1(p16ink4a)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 p21(p21kip1)的表达情况, RT-qPCR 检测 4 个差异 lncRNAs(C4a、AI662270、BATE1、Gm29719)的表达情况。取小鼠胚胎成纤维细胞 3T3-L1, 设置正常对照组(诱导分化为成熟脂肪细胞后不做处理)与衰老模型组[即阿霉素处理(ADR)组, 采用 0.2  $\mu\text{mol/L}$  阿霉素诱导构建衰老脂肪细胞模型], 采用  $\beta$ -半乳糖苷酶染色检测脂肪细胞的染色情况; RT-qPCR 检测 AI662270 和衰老标志物(p16ink4a、p21kip1、p53)的表达情况; Western blotting 检测磷酸化 H2A 组蛋白家族成员 X(gama-H2AX)、p16ink4a、p21kip1 蛋白的表达情况。(2)采用己糖激酶法检测小鼠血清和 3T3-L1 脂肪细胞培养基中的葡萄糖含量; RT-qPCR 检测小鼠 eWAT 和脂肪细胞中胰岛素敏感性关键基因蛋白激酶 B(Akt)、胰岛素受体底物 1(IRS1)、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、葡萄糖转运体 4(GLUT4) mRNA 的表达情况; Western blotting 检测 IRS1、PI3K、Akt、p-Akt 蛋白的表达情况。(3)采用 Spearman 相关分析探讨 AI662270 表达水平与 IRS1、PI3K mRNA 表达水平的相关性; 构建衰老脂肪细胞 AI662270 低表达模型, 采用 RT-qPCR 验证 AI662270 的敲低效率; 采用己糖激酶法检测衰老脂肪细胞敲低 AI662270 后, 细胞培养基中的葡萄糖含量, RT-qPCR 检测 Akt、IRS1、IRS2、PI3K mRNA 的表达情况, Western blotting 检测 Akt、p-Akt 蛋白的表达情况。(4)采用生物信息学分析预测 AI662270 的下游靶基因及二者的结合位点, RT-qPCR 和 Western blotting 验证 AI662270 敲低后, 其下游靶基因的表达情况。**结果** (1)与青年组比较, 老年组小鼠 eWAT 中 p16ink4a、p21kip1 蛋白表达水平明显增高, eWAT 和肝组织中 C4a、AI662270、BATE1、Gm29719 的表达水平明显增高( $P<0.05$ )。 $\beta$ -半乳糖苷酶染色结果显示, 与正常对照组比较, 阿霉素处理的衰老脂肪细胞中蓝绿色增强, 呈扩大、扁平的细胞形态; 与正常对照组比较, ADR 组脂肪细胞中 AI662270 及 p16ink4a、p21kip1 mRNA 表达水平明显增高, gama-H2AX、p16ink4a、p21kip1 蛋白表达水平明显增高( $P<0.05$ )。(2)与青年组比较, 老年组小鼠血清中葡萄糖含量明显增加( $P<0.01$ ); 与正常对照组比较, ADR 组脂肪细胞培养基中葡萄糖含量明显增加( $P<0.05$ ); 与青年组比较, 老年组小鼠 eWAT 中 IRS1、PI3K 等的表达水平明显降低( $P<0.01$ ); 与正常对照组比较, ADR 组脂肪细胞中 IRS1、PI3K 等的表达水平也明显降低( $P<0.05$ )。(3)Spearman 相关分析结果显示, AI662270 表达水平与 IRS1、PI3K mRNA 表达水平均呈负相关( $P<0.05$ ); RT-qPCR 检测结果显示, 与 siNC 组比较, siAI662270 组脂肪细胞中 AI662270 的表达水平明显降低( $P<0.05$ ), 即成功构建了衰老脂肪细胞 AI662270 低表达模型; 己糖激酶法检测结果显示, 衰老脂肪细胞敲低 AI662270 后, 细胞培养基中的葡萄糖含量明显降低( $P<0.05$ ); 敲低 AI662270 后, 衰老脂肪细胞中 IRS1、IRS2、PI3K mRNA 的表达水平( $P<0.05$ )以及 p-Akt/Akt 比值明显增高( $P<0.01$ )。(4)生物信息学预测结果显示, AI662270 下游的靶基因为 miR-3073b-3p; 血红素加氧酶 1(Hmox1)为 miR-

**[基金项目]** 国家自然科学基金(82174035, 82374107, 81974528, 81773959); 湖北省自然科学基金(2021CFA015); 湖北省肿瘤微环境与免疫治疗重点实验室开放基金(2023KZL01)

**[作者简介]** 张一凡, 硕士研究生, 主要从事代谢性疾病及其药物干预方面的研究

**[通信作者]** 袁成福, E-mail: yuancf46@ctgu.edu.cn

3073b-3p的靶基因;与siNC组比较,siAI662270组衰老脂肪细胞中miR-3073b-3p的表达水平明显增高,Hmox1 mRNA和蛋白表达水平明显降低( $P<0.01$ )。结论 衰老可增加小鼠eWAT中AI662260的表达,且AI662260的表达与胰岛素敏感性呈负相关;AI662260敲低可降低衰老脂肪细胞培养基中的葡萄糖含量,上调IRS1、PI3K的表达,增加衰老脂肪细胞的胰岛素敏感性,其机制可能与AI662270/miR-3073b-3p/Hmox1通路有关。

[关键词] 衰老;附睾白色脂肪组织;胰岛素抵抗;长链非编码RNA AI662270

## Study on the mechanism of long non-coding RNA AI662270 regulating insulin resistance in adipocytes in aging mice

Zhang Yi-Fan<sup>1,2,3</sup>, Hu Ya-Qi<sup>1,2</sup>, Wang Rui<sup>1,2</sup>, Wang Shu-Wen<sup>1,2</sup>, Yuan Cheng-Fu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Third-Grade Pharmacological Laboratory on Traditional Chinese Medicine, National Administration of Traditional Chinese Medicine, China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China

<sup>2</sup>College of Basic Medical Science, China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China

<sup>3</sup>Department of Pathology, Hai'an People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226600, China

\*Corresponding author, Email: yuancf46@ctgu.edu.cn

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82174035, 82374107, 81974528, 81773959), the Natural Science Foundation of Hubei Province (2021CFA015), and the Open Foundation for Tumor Microenvironment and Immunotherapy Key Laboratory of Hubei Province (2023KZL01)

**[Abstract] Objective** To investigate the mechanism by which long non-coding RNA (lncRNA) AI662270 regulates insulin resistance in adipocytes in aging mice. **Methods** (1) Twenty male C57BL/6 mice were randomly divided into youth (4-month-old) group and aged (18-month-old) group ( $n=10$ ). Mice in youth group were raised to 4 months of age and euthanized by orbital exsanguination under urethane anesthesia, while aged mice were euthanized at 18 months using the same sacrifice method. Epididymal white adipose tissue (eWAT) and liver tissue were rapidly dissected. Western blotting was employed to detect the protein expression levels of tumor suppressor gene 1 (p16ink4a) and cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (p21kip1), RT-qPCR was used to measure the expression of 4 differentially expressed lncRNAs (C4a, AI662270, BATE1 and Gm29719). Mouse embryonic fibroblasts (3T3-L1) were cultured and divided into a normal control group (no treatment after induced differentiation into mature adipocytes) and a senescence model group [doxorubicin (ADR)-treated group; 0.2  $\mu\text{mol/L}$  ADR was used to induce senescent adipocytes].  $\beta$ -galactosidase staining was performed to assess adipocyte senescence. RT-qPCR was applied to evaluate the expression of AI662270 and senescence markers (p16ink4a, p21kip1, p53), while Western blotting was utilized to detect the expression levels of phosphorylated H2A histone family member X ( $\gamma$ -H2AX), p16ink4a, and p21kip1 proteins. (2) Hexokinase method was adopted to measure glucose content in mouse serum and 3T3-L1 adipocyte culture medium. RT-qPCR was performed to analyze mRNA expression levels of insulin sensitivity-related gene protein kinase B (Akt), insulin receptor substrate 1 (IRS1), phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) and glucose transporter 4 (GLUT4) in mouse eWAT and adipocytes. Western blotting was conducted to determine the protein expression levels of IRS1, PI3K, Akt, and p-Akt. (3) Spearman correlation analysis was applied to examine the correlation between AI662270 expression levels and IRS1/PI3K mRNA expression levels. A low-expression model of AI662270 in senescent adipocytes was constructed, and RT-qPCR was used to verify the knockdown efficiency. Hexokinase method was employed to assess glucose content in the cell culture medium of senescent adipocytes after AI662270 knockdown. RT-qPCR was performed to measure the mRNA expressions of Akt, IRS1, IRS2, and PI3K, while Western blotting was utilized to detect the expressions levels of Akt and p-Akt proteins. (4) Bioinformatics analysis was performed to predict downstream target genes of AI662270 and their binding sites. RT-qPCR and Western blotting were subsequently applied to validate the expression of these downstream target genes following AI662270 knockdown. **Results** (1) Compared with youth group, the protein expression levels of p16ink4a and p21kip1 in eWAT of aged mice were significantly increased ( $P<0.05$ ). Additionally, the expression levels of C4a, AI662270, BATE1, and Gm29719 in both eWAT and liver tissues were significantly increased in aged group ( $P<0.05$ ).  $\beta$ -galactosidase staining revealed enhanced blue-green coloration and enlarged, flattened cellular morphology in ADR-treated senescent adipocytes compared with normal control group. Compared with normal control group, ADR-treated senescent adipocytes significantly increased the mRNA expression levels of AI662270, p16ink4a, and p21kip1, and significantly elevated protein expression levels of  $\gamma$ -H2AX, p16ink4a, and p21kip1 ( $P<0.05$ ). (2) Serum glucose content was significantly higher in aged group mice compared with youth group ( $P<0.01$ ), and glucose content in the adipocyte culture medium in ADR group was significantly increased ( $P<0.05$ ). The expression levels of IRS1 and PI3K in eWAT in aged group were significantly reduced compared with youth group ( $P<0.01$ ). Compared with normal control group, the expression levels of IRS1 and PI3K in adipocytes in ADR-treated group were also significantly reduced ( $P<0.05$ ). (3) Spearman correlation analysis demonstrated that the expression level of AI662270 was negatively correlated with the mRNA expression levels of IRS1 and PI3K ( $P<0.05$ ). RT-qPCR showed that AI662270 expression level was significantly reduced in the siAI662270-transfected senescent adipocytes compared with siNC group ( $P<0.05$ ).

indicating the low expression model of aged adipocytes AI662270 was successfully constructed. Hexokinase assay results showed that glucose content in the cell culture medium was significantly reduced after the AI662270 was knocked down by senescent adipocytes ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the mRNA expression levels of *IRS1*, *IRS2* and *PI3K* ( $P < 0.05$ ) and the p-Akt/Akt ratio in senescent adipocytes was significantly increased after knockdown of AI662270 ( $P < 0.01$ ). (4) Bioinformatics analysis predicted miR-3073b-3p as a downstream target gene of AI662270, and heme oxygenase 1 (*Hmox1*) was identified as a target molecule of miR-3073b-3p. The expression level of miR-3073b-3p in senescent adipocytes in siAI662270 group was significantly increased, while the mRNA and protein expression level of *Hmox1* were significantly decreased compared with siNC group ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** Aging significantly increases the expression of AI662270 in eWAT of mice, and the expression of AI662270 was negatively correlated with insulin sensitivity. AI662270 knockdown can reduce glucose content in senescent adipocyte culture medium, upregulate the expression of *IRS1* and *PI3K*, and increase insulin sensitivity in senescent adipocytes, which may be mediated through the AI662270/miR-3073b-3p/*Hmox1* pathway.

**[Key words]** aging; epididymal white adipose tissue; insulin resistance; long non-coding RNA AI662270

自然衰老是一个退行性过程,伴随着体内代谢环境紊乱和机体功能减退,可增高胰岛素抵抗、2型糖尿病及代谢性综合征等的患病率<sup>[1-2]</sup>。脂肪组织作为机体营养代谢的调节中心,参与维持能量稳态和系统炎症反应。年龄增长或其他内、外源性刺激均可导致脂肪组织衰老,造成脂肪组织的功能减退,主要表现为衰老细胞蓄积、胰岛素敏感性降低<sup>[2]</sup>以及线粒体功能障碍等<sup>[3]</sup>。同时,衰老脂肪细胞的累积和脂肪细胞的面积增大可引发脂肪组织的病理重塑,导致肥胖症及其相关代谢并发症的发生<sup>[4]</sup>。衰老引起的肥胖已被认为是胰岛素抵抗发展的主要原因之一<sup>[5]</sup>,通过减少热量摄入来限制肥胖已被证实可缓解与年龄相关的胰岛素抵抗及炎症。脂肪组织分泌的细胞因子可通过多种形式作用于自身或其他组织器官<sup>[6]</sup>。脂肪组织是胰岛素底物信号传递的重要靶器官之一<sup>[7-8]</sup>。白色脂肪细胞是白色脂肪组织中含量最多的细胞,功能为专门储存(以甘油三酯形式)和调动(以脂肪酸形式)能量,其代谢活动对脂肪组织维持全身能量平衡起着重要作用<sup>[9]</sup>。因此白色脂肪代谢功能障碍是胰岛素抵抗和相关代谢紊乱发生发展中的重要事件<sup>[10]</sup>。非编码RNA约占灵长类基因组转录本的98%,参与表观遗传学的调控<sup>[11]</sup>,其中长链非编码RNA(lncRNA)的长度超过200个核苷酸,广泛且多样化地存在于真核细胞中,具有多种生物学功能<sup>[12]</sup>,可在细胞质中调控翻译、促进或抑制mRNA的降解或作为内源竞争RNA(ceRNA)吸附miRNA等<sup>[13]</sup>,在衰老脂肪细胞胰岛素抵抗的发生发展中发挥着重要的生物学作用<sup>[14]</sup>。本研究探讨衰老脂肪细胞中lncRNA AI662270的表达与胰岛素抵抗的关系,旨在为衰老小鼠胰岛素抵抗的发病机制研究及个体化治疗分子靶点的筛选提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** 胎牛血清(FBS)购自浙江四季青生物科技股份有限公司;青-链霉素(P/S)、胰酶购自北京雷根生物技术有限公司;DMEM高糖培养基购自

美国Gibco公司;细胞级别NaHCO<sub>3</sub>、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMx)、地塞米松(DEX)、吡喹美辛、罗格列酮购自美国Sigma公司;细胞级别二甲亚砜(DMSO)、抗兔二抗购自武汉科瑞生物技术有限公司;焦碳酸二乙酯处理的超纯水、Lipo8000™转染试剂购自上海碧云天生物技术有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(7101454)购自上海国药集团化学试剂有限公司;一抗β-actin、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子p21(p21kip1)、蛋白激酶B(Akt)、p-Akt、磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)、胰岛素受体底物1(IRS1)、肿瘤抑制基因1(p16ink4a)、IRS2、血红素加氧酶1(*Hmox1*)、磷酸化H2A组蛋白家族成员X(gama-H2AX)购自沈阳万类生物科技有限公司;反转录试剂、SYBR Green PCR Premix购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;β-半乳糖苷酶染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;阴性对照(MOCK)、NCFAM、siRNA(si-AI662270)购自上海吉玛制药技术有限公司;葡萄糖生化试剂盒(己糖激酶法)购自北京中生北控生物科技股份有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验动物及分组** 20只8周龄雄性C57BL/6J小鼠购自三峡大学实验动物中心[实验动物生产许可证号:SCXK(鄂)2016-0006],饲养于三峡大学实验动物中心SPF级动物房,环境温度20~22℃,12h/12h昼夜交替循环。将小鼠分为青年组与老年组,每组10只,青年组小鼠饲养至4月龄后采用乌拉糖麻醉后眼球取血处死,老年组饲养至18月龄后采用相同处死方式,随后迅速分离附睾白色脂肪组织(epididymis white adipose tissue, eWAT)和肝组织,液氮速冻后于-80℃超低温冰箱保存备用。本研究获三峡大学医学实验动物伦理委员会批准(2019080D),实验过程遵循《实验动物福利伦理审查指南》。

**1.2.2 3T3-L1细胞诱导分化** 小鼠胚胎成纤维细胞系3T3-L1由美国ATCC细胞库提供。将细胞均匀种植于6孔板中,待细胞密度达80%时,将DMEM培养基更换为培养基I(含10%FBS和1%P/S的DMEM

高糖培养基), 于37℃、5% CO<sub>2</sub>环境中培养, 每隔1 d换液, 至细胞完全融合后的次日更换为培养基Ⅱ(含10% FBS、1% P/S、1 μmol/L DEX、0.5 mmol/L IBMX、5 μg/ml 胰岛素、125 μmol/L 吡啶美辛、1 mmol/L 罗格列酮的DMEM高糖培养基), 记为诱导分化D0; 48 h后更换为培养基Ⅲ(含5 μg/ml胰岛素的培养基Ⅰ)继续培养(D2)。每2 d更换1次培养基Ⅲ, 直至大量脂滴出现, 即诱导分化为成熟脂肪细胞。

**1.2.3 差异lncRNAs的验证** 本课题组前期研究对青年和老龄小鼠进行RNA-seq测序分析<sup>[15]</sup>, 因此本研究在青年和老龄小鼠中验证差异lncRNAs(AI662270、C4a、BATE1和Gm29719)的表达。

**1.2.4 衰老脂肪细胞模型的构建** 使用0.2 μmol/L阿霉素<sup>[16]</sup>(23214-92-8, 美国MCE公司)处理已分化成熟的脂肪细胞48 h, 诱导成熟的脂肪细胞至衰老状态。

**1.2.5 Western blotting检测** 取200 mg eWAT或收集3T3-L1脂肪细胞, 加入预冷的蛋白裂解液冰上裂解30 min, 震荡3次, 4℃下12 000×g离心25 min, 吸取中间澄清蛋白层。采用BCA法测定蛋白浓度, 制备蛋白样品; 取30 μg上样, 恒压80 V电泳, 待蛋白Marker进入分离胶时, 电压调至120 V; 恒流200 mA冰浴转膜; PVDF膜用5%脱脂奶粉封闭2 h后添加一抗[β-actin(1:2000)、p21kip1(1:1000)、Akt(1:1000)、p-Akt(1:1000)、PI3K(1:500)、IRS1(1:1000)、gamma-H2AX(1:2000)]孵育过夜(>14 h), 次日用TBST溶液洗膜10 min×3次, 室温孵育兔二抗(1:8000)1 h; TBST溶液洗膜10 min×3次, 用Bio-Rad凝胶成像仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司, ChemiDOC™ Imaging System]曝光显影, ImageJ软件分析条带灰度值。

**1.2.6 实时定量PCR(RT-qPCR)检测** 取eWAT 200 mg或收集脂肪细胞加入含700 μl RNA裂解液(Invitrogen™ Trizol)的EP管中充分裂解, 加入200 μl三氯甲烷剧烈摇晃30 s后冰上静置5 min, 4℃下12 000×g离心15 min, 吸取上清液; 加入等体积异丙醇, 10 min后4℃下12 000×g离心15 min, 弃上清液; 加入1 ml 75%乙醇, 4℃下7500×g离心5 min, 弃上清液; 干燥后用10~20 μl DEPC水溶解RNA, 随后检测RNA浓度。取1 μg RNA反转录成cDNA后进行PCR扩增。反应条件: 95℃预变性10 min; 95℃变性15 s、60℃退火1 min(共40个循环)。以β-actin或U6为内参, 采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算目的基因mRNA或miRNA的相对表达量。引物由上海生工生物工程股份有限公司设计合成, 序列见附表1(<https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.2025.0319FJ>)。

**1.2.7 β-半乳糖苷酶染色** 取小鼠胚胎成纤维细胞3T3-L1, 设置正常对照组与衰老模型组[阿霉素处理(ADR)组], 正常对照组细胞诱导分化为成熟脂肪细胞后不做处理, ADR组细胞使用0.2 μmol/L阿霉素处理以构建衰老脂肪细胞模型。吸除两组中的细胞培养液, 1×PBS洗涤3 min, 加入1 ml β-半乳糖苷酶固定液, 室温固定15 min。吸除固定液, 1×PBS洗涤3次后加入染色工作液, 37℃孵育过夜。去除染色工作液, 加入PBS于普通光学显微镜下观察细胞及细胞中的绿色染色情况。

**1.2.8 葡萄糖含量测定** 使用葡萄糖生化试剂盒(己糖激酶法)检测小鼠血清或脂肪细胞DMEM高糖培养基上清中的葡萄糖含量, 依据说明书将R1和R2试剂按照1:9的比例混合配制成工作液, 混匀备用, 然后用微量加样器吸取适量待测样本加入96孔板中, 再加入已配制好的工作液。设置空白对照孔和标准品对照孔, 于37℃恒温箱中孵育10 min后, 采用酶标仪检测500 nm处各孔的吸光度(OD)值, 并用校准法计算葡萄糖含量。A<sub>样品</sub>=(OD<sub>样本</sub>-OD<sub>空白</sub>)/(OD<sub>标准品</sub>-OD<sub>空白</sub>)。

**1.2.9 siRNA转染荧光效率验证** 取3T3-L1细胞, 设置试剂对照(MOCK)组与转染NCFAM(NCFAM)组, MOCK组细胞不做处理, NCFAM组细胞转染NCFAM。将3T3-L1脂肪细胞接种于12孔板中, 待细胞融合度达到70%时, 将含有10% FBS的高糖培养基更换为无血清DMEM高糖培养基, 配制转染混合液(无血清培养基50 μl、NCFAM 40 pmol、Lipo8000™ 1.6 μl), 室温放置20 min后均匀滴加至12孔板中, 6 h后更换为10% FBS培养基, 培养期间每6 h在荧光显微镜下观察细胞绿色荧光表达情况。

**1.2.10 siRNA转染** 取3T3-L1细胞, 设置siNC组(Lipo8000™转染试剂转染对照NC)与siAI662270组(转染siAI662270)。将3T3-L1脂肪细胞接种于12孔板中, 当细胞融合度达到70%时, 将含0.2 μmol/L阿霉素的10% FBS培养基更换为无血清DMEM高糖培养基, 配制转染混合液(无血清培养基50 μl、siAI662270 40 pmol或siNC 40 pmol、Lipo8000™ 1.6 μl), 室温放置20 min后均匀滴加至12孔板中, 6 h后更换为含0.2 μmol/L阿霉素的10% FBS培养基, 继续培养至24 h, 收集细胞, 提取细胞总RNA; 或培养至48 h, 收集细胞, 提取细胞蛋白。

**1.2.11 Spearman相关分析** 选用青年组和老年组小鼠eWAT中胰岛素敏感性指标基因mRNA的表达量和AI662270的表达量进行分析。以AI662270的表达量为X轴, 胰岛素敏感性指标基因(PI3K、IRS1)的mRNA表达量为Y轴, 使用GraphPad Prism 9.0制图, 并计算其r值。

**1.2.12 生物信息学分析预测下游靶基因** 通过生物信息学分析网站 LncRNASNP2(<https://bioinfo.life.hust.edu.cn/lncRNASNP2>)预测 AI662270 与 miR-3073b-3p 的互补结合位点<sup>[17]</sup>, ENCORI(<https://starbase.sysu.edu.cn/>)预测 miR-3073b-3p 的下游靶基因。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, GraphPad Prism 9.0 软件制图。所有数据均符合正态分布且方差齐,以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 衰老与青年小鼠中差异 lncRNAs 的表达情况**

Western blotting 检测结果显示,与青年组比较,老年组小鼠 eWAT 中 p16ink4a、p21kip1 蛋白表达水平明显升高( $P < 0.001$ 、 $P < 0.05$ ,图 1A),表明衰老小鼠模型构建成功。RT-qPCR 检测结果显示,与青年组比较,老年组小鼠 eWAT 和肝组织中 C4a、AI662270、BATE1、Gm29719 表达水平明显升高( $P < 0.05$ ,图 1B)。

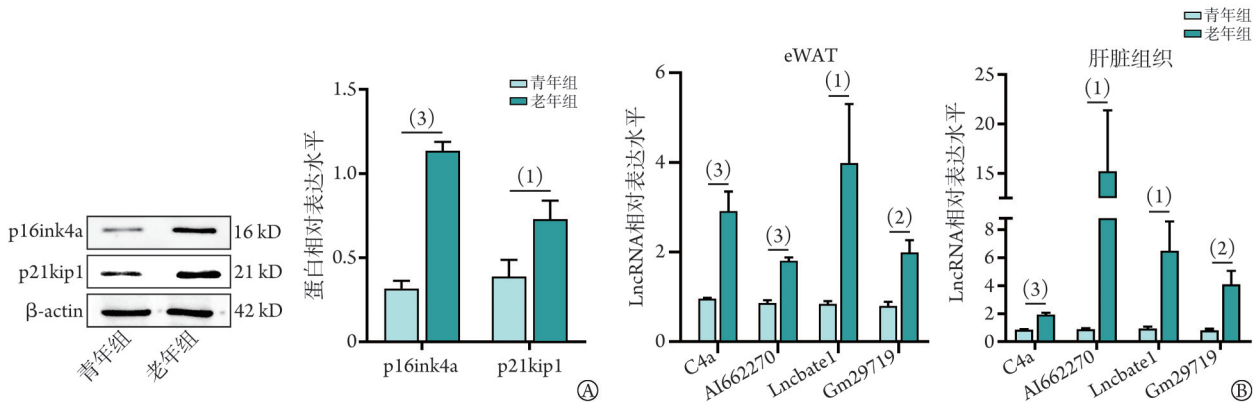


Fig.1 p21kip1. 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 p21; p16ink4a. 肿瘤抑制基因 1; A. Western blotting 检测衰老和青年小鼠 eWAT 中 p16ink4a 和 p21kip1 的表达( $n=6$ ); B. RT-qPCR 检测衰老和青年小鼠 eWAT 和肝组织中候选 lncRNAs 的表达( $n=6$ ); (1) $P < 0.05$ , (2) $P < 0.01$ , (3) $P < 0.001$

**图 1** LncRNAs 在青年和衰老小鼠附睾白色脂肪组织(eWAT)和肝组织中的表达情况

**Fig.1** Expression of candidate lncRNAs in epididymal white adipose tissue (eWAT) and liver tissue of young and aging mice

**2.2 衰老 3T3-L1 脂肪细胞中 AI662270 的表达情况**

$\beta$ -半乳糖苷酶染色结果显示,正常对照组白色脂肪细胞中蓝绿色较弱,细胞形态正常;与正常对照组比较,ADR 组衰老白色脂肪细胞中蓝绿色增强,呈扩大、扁平的细胞形态(图 2A)。RT-qPCR 和 Western blotting 检测结果显示,与正常对照组比较,ADR 组脂肪细胞中 AI662270 及 p16ink4a、p21kip1 mRNA 表达水平以及 gamma-H2AX、p16ink4a、p21kip1 蛋白表达水平明显升高( $P < 0.05$ ),但 p53 mRNA 表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 2B-D)。

**2.3 衰老对小鼠脂肪组织胰岛素敏感性的影响**

与青年组比较,老年组小鼠血清中葡萄糖含量明显增加( $P < 0.05$ ,图 3A)。RT-qPCR 和 Western blotting 检测结果显示,与青年组比较,老年组小鼠 eWAT 中 IRS1、PI3K、GLUT4 mRNA 表达水平,IRS1、PI3K 蛋白表达水平,以及 p-Akt/Akt 比值明显降低( $P < 0.01$  或  $P < 0.001$ ),但 Akt mRNA 表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 3B、C)。

**2.4 衰老对脂肪细胞胰岛素敏感性的影响**

与正常对照组比较,ADR 组脂肪细胞的培养基中葡萄糖含量明显增加( $P < 0.01$ ,图 4A)。RT-qPCR 和 Western blotting 检测结果显示,与正常对照组比较,ADR 组脂肪细胞中胰岛素信号通路关键基因 IRS1、IRS2、

PI3K、GLUT4 mRNA 表达水平,IRS1、PI3K 蛋白表达水平,以及 p-Akt/Akt 比值明显降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.001$ ),但 Akt mRNA 表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 4B、C)。

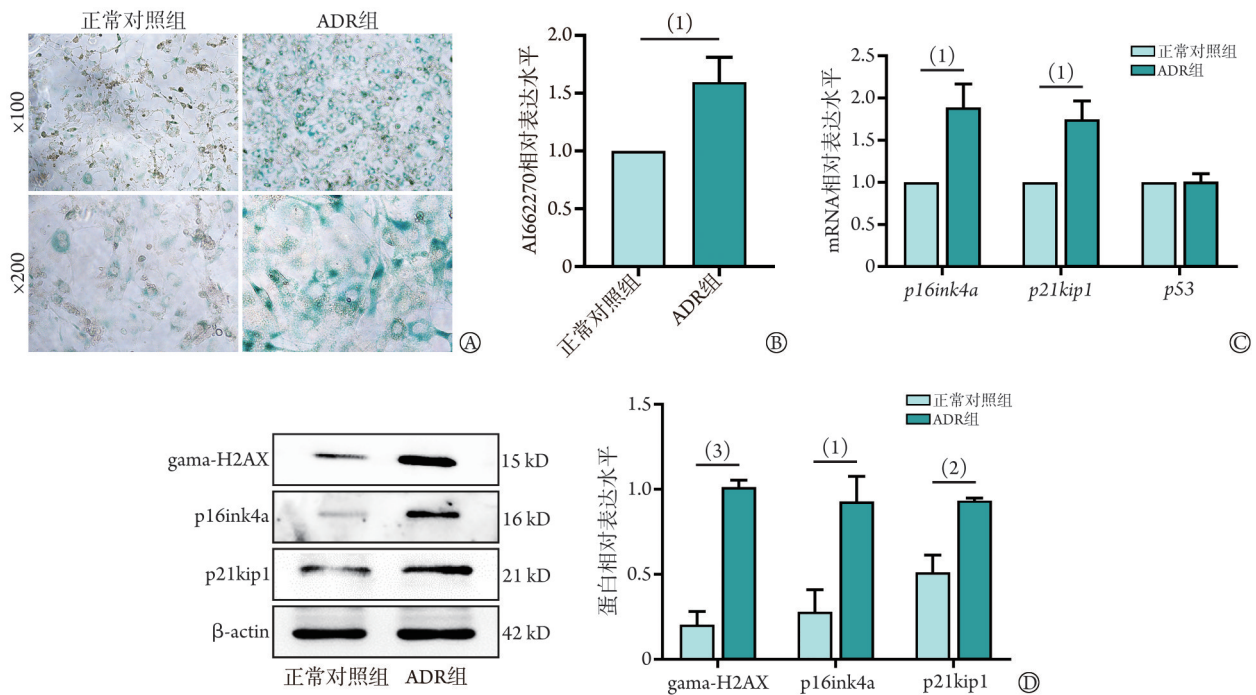
**2.5 AI662270 与胰岛素敏感性指标的相关性分析**

Spearman 相关分析显示,青年和老龄小鼠 eWAT 中 AI662270 表达水平与 IRS1、PI3K mRNA 表达水平均呈负相关关系( $r = -0.6616$ ,  $P = 0.0191$ ;  $r = -0.8888$ ,  $P = 0.0001$ ;图 5)。

**2.6 AI662270 敲低对衰老脂肪细胞胰岛素敏感性的影响**

荧光显微镜下可观察到 NCFAM 组 3T3-L1 脂肪细胞中绿色荧光蛋白表达,即 siRNA 成功转入 3T3-L1 脂肪细胞(图 6A);RT-qPCR 验证结果显示,与 siNC 组比较,siAI662270 组衰老脂肪细胞中 AI662270 的表达明显下调( $P < 0.05$ ),表明成功敲低衰老脂肪细胞中的 AI662270(图 6B)。与 siNC 组比较,siAI662270 组衰老脂肪细胞培养基中葡萄糖含量明显减少( $P < 0.05$ ,图 6C)。RT-qPCR 和 Western blotting 检测结果显示,与 siNC 组比较,siAI662270 组衰老脂肪细胞中 IRS1、IRS2、PI3K mRNA 表达水平以及 p-Akt/Akt 比值明显升高( $P < 0.05$ ),但 Akt mRNA 表达水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,图 6D、E)。

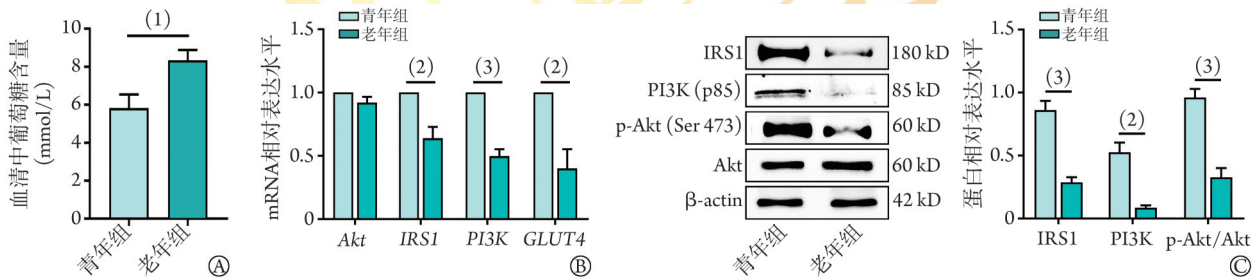
**2.7 AI662270 参与调控衰老脂肪细胞胰岛素敏感性**



ADR. 阿霉素处理; p21kip1. 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 p21; p16ink4a. 肿瘤抑制基因 1; gamma-H2AX. 磷酸化 H2A 组蛋白家族成员 X; A. 衰老脂肪细胞  $\beta$ -半乳糖苷酶染色; B. RT-qPCR 检测脂肪细胞中 AI662270 的表达 ( $n=4$ ); C. RT-qPCR 检测脂肪细胞中衰老标志物 p16ink4a、p21kip1、p53 mRNA 的表达 ( $n=3$ ); D. Western blotting 检测脂肪细胞中衰老标志物 gamma-H2AX、p16ink4a、p21kip1 蛋白的表达 ( $n=3$ ); (1) $P<0.05$ , (2) $P<0.01$ , (3) $P<0.001$

图2 LncRNA AI662270 在衰老脂肪细胞中的表达情况

Fig.2 Expression of lncRNA AI662270 in aging adipocytes



Akt. 蛋白激酶 B; IRS1. 胰岛素受体底物 1; IRS2. 胰岛素受体底物 2; PI3K. 磷脂酰肌醇 3 激酶; GLUT4. 葡萄糖转运体蛋白 4; A. 小鼠血清中葡萄糖含量 ( $n=7$ ); B. RT-qPCR 检测小鼠 eWAT 中胰岛素信号通路关键基因的表达 ( $n=6$ ); C. Western blotting 检测小鼠 eWAT 中胰岛素信号通路关键蛋白的表达 ( $n=6$ ); (1) $P<0.05$ , (2) $P<0.01$ , (3) $P<0.001$

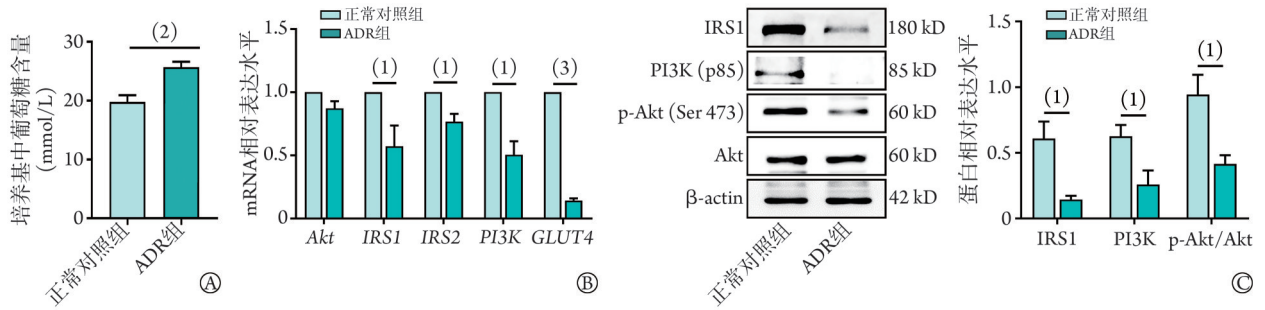
图3 衰老对小鼠附睾白色脂肪组织(eWAT)胰岛素敏感性的影响

Fig.3 Effect of senescence on insulin sensitivity in white adipose tissue (eWAT) of the epididymis in mice

的机制分析 LncRNASNP2 网站预测 AI662270 的下游靶基因为 miR-3073b-3p, 且二者具有结合位点。RT-qPCR 验证结果显示, 与青年组比较, 老年组小鼠 eWAT 中 miR-3073b-3p 表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ), 且衰老脂肪细胞中 miR-3073b-3p 表达水平也明显降低 ( $P<0.05$ )。Spearman 相关分析显示, 衰老小鼠 eWAT 中 AI662270 表达水平与 miR-3073b-3p 表达水平呈明显负相关 ( $r=-0.5508$ ,  $P=0.0412$ )。此外, 与 siNC 组比较, siAI662270 组衰老脂肪细胞中 miR-3073b-3p 表达水平明显升高 ( $P<0.01$ , 附图 1A-E, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0251.2025.0319FJ>),

提示 miR-3073b-3p 是 AI662270 的下游靶基因, 且 AI662270 与 miR-3073b-3p 呈负向调控关系。

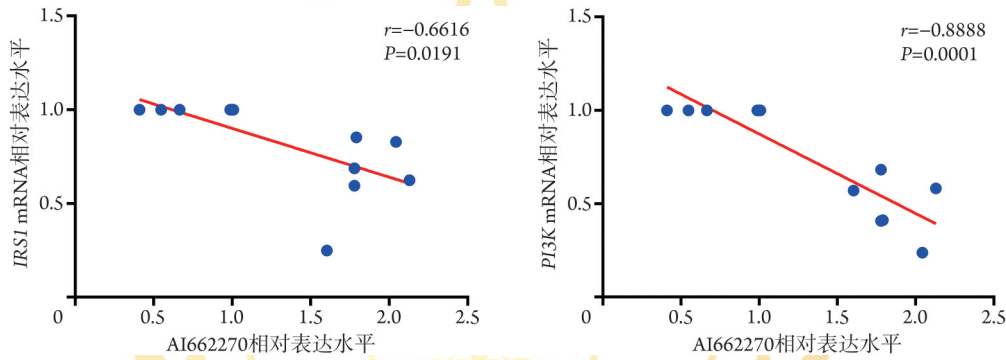
ENCORI 网站预测 miR-3073b-3p 下游的靶基因为 *Hmox1*; RT-qPCR 和 Western blotting 检测结果显示, 与青年组比较, 老年组小鼠 eWAT 中 *Hmox1* mRNA 和蛋白表达水平明显升高, 且衰老脂肪细胞中 *Hmox1* mRNA 和蛋白表达水平也明显升高 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。Spearman 相关分析显示, *IRS1*、*PI3K* mRNA 表达水平与 *Hmox1* mRNA 表达水平均呈负相关 ( $r=-0.7979$ ,  $P=0.0019$ ;  $r=-0.8045$ ,  $P=0.0016$ ); 衰老小鼠 eWAT 中 miR-3073b-3p 表达水平与 *Hmox1*



ADR. 阿霉素处理; Akt. 蛋白激酶B; IRS1. 胰岛素受体底物1; IRS2. 胰岛素受体底物2; PI3K. 磷脂酰肌醇3激酶; GLUT4. 葡萄糖转运体蛋白4; A. 培养基中葡萄糖含量( $n=3$ ); B. RT-qPCR检测脂肪细胞中胰岛素信号通路关键基因的表达( $n=3$ ); C. Western blotting检测脂肪细胞中胰岛素信号通路关键蛋白的表达( $n=3$ ); (1) $P<0.05$ , (2) $P<0.01$ , (3) $P<0.001$

图4 衰老对3T3-L1脂肪细胞胰岛素敏感性的影响

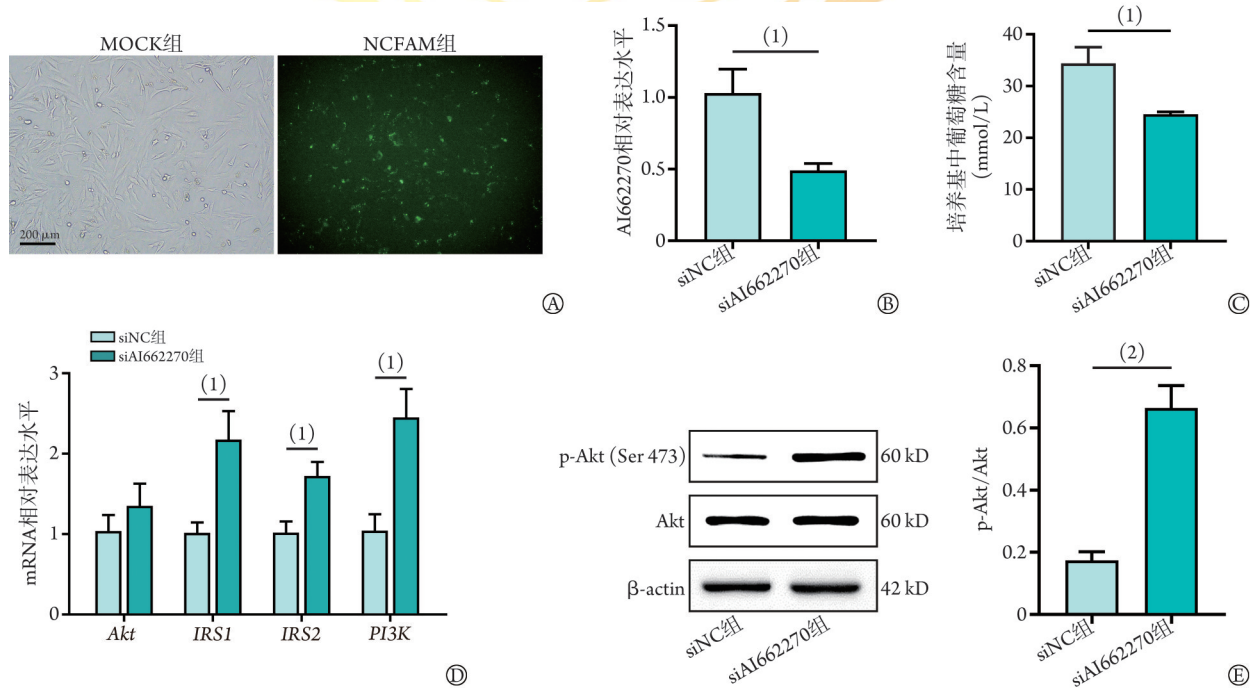
Fig.4 Effect of aging on insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes



IRS1. 胰岛素受体底物1; PI3K. 磷脂酰肌醇3激酶

图5 衰老小鼠附睾白色脂肪组织(eWAT)中AI662270与胰岛素敏感性指标的相关性

Fig.5 Correlation analysis of AI662270 with insulin sensitivity indicators genes in epididymal white adipose tissue (eWAT) of aging mice



MOCK. 试剂对照; Akt. 蛋白激酶B; IRS1. 胰岛素受体底物1; IRS2. 胰岛素受体底物2; PI3K. 磷脂酰肌醇3激酶; A. 转染荧光图; B. RT-qPCR检测衰老脂肪细胞中AI662270的敲低效果( $n=3$ ); C. 培养基中葡萄糖含量( $n=3$ ); D. RT-qPCR检测衰老脂肪细胞中胰岛素信号通路关键基因的表达( $n=3$ ); E. Western blotting检测衰老脂肪细胞中胰岛素信号通路关键蛋白的表达( $n=3$ ); (1) $P<0.05$ , (2) $P<0.01$

图6 敲低AI662270的衰老脂肪细胞胰岛素敏感性增加

Fig.6 Aging fat cells have increased insulin sensitivity after AI662270 knockdown

mRNA表达水平呈负相关( $r=-0.6170$ ,  $P=0.0109$ )。提示 miR-3073b-3p 的下游靶基因是 *Hmox1*, 且 miR-3073b-3p 与 *Hmox1* 呈负向调控关系。与 siNC 组比较, siAI662270 组衰老脂肪细胞中 *Hmox1* mRNA 和蛋白表达水平明显降低( $P<0.001$ ,  $P<0.01$ , 附图 1F-L, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0251.2025.0319FJ>)。

### 3 讨 论

胰岛素抵抗和 2 型糖尿病的患病率随着年龄的增长而增高<sup>[18]</sup>。脂肪组织是在衰老过程中早期诱导炎症和胰岛素抵抗的组织之一, 同时伴有白色脂肪的重新分布及代谢功能紊乱<sup>[19]</sup>, 其中 eWAT 是在年龄增长过程中首先出现胰岛素抵抗的白色脂肪组织<sup>[1]</sup>。因此, 深入探讨脂肪组织和脂肪细胞参与年龄相关胰岛素抵抗的分子机制对延缓增龄性代谢性疾病可能具有重要作用。

衰老是因持续有丝分裂刺激和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子如 p16ink4a 和 p21kip1 相互刺激而造成的。本研究结果显示, 在老龄小鼠 eWAT 中, 衰老相关基因 p16ink4a 和 p21kip1 的表达明显升高, 胰岛信号通路关键基因 *IRS1* 和 *PI3K* 等的表达明显降低, 且磷酸化的 Akt 表达明显下降, 表明衰老可导致小鼠 eWAT 胰岛素抵抗。

lncRNA 是经典的非编码 RNA, 参与调控基因表达、蛋白质翻译等生物学过程<sup>[20]</sup>。越来越多的证据表明, lncRNA 在衰老过程中发挥着重要的作用, 如有研究发现 lncRNA OIP5-AS1 可通过海绵吸附 miR-4500 靶向抑制精氨酸酶 2, 进而介导血管内皮衰老引起的内皮功能障碍<sup>[21]</sup>; 在骨骼肌衰老引起的肌肉减少症中, Yu 等<sup>[22]</sup>研究发现 lncRNA GPRCSD-AS1 可通过 ceRNA 机制海绵吸附 miR-520d-5p, 加速成肌细胞增殖和分化, 从而促进骨骼肌发育并延缓骨骼肌衰老。此外, 在衰老相关的肝脏疾病中, 调节性 T 细胞中的特异性 lncRNA 参与调节衰老肝脏的免疫代谢稳态<sup>[23]</sup>。由此可见, lncRNA 广泛参与衰老所致的疾病并在其中发挥着重要功能。

本课题组前期开展了 lncRNA 通过 ceRNA 海绵吸附 miRNA 的方式参与疾病发展的分子机制研究<sup>[24]</sup>。有研究基于 RNA-seq 测序技术发现老龄小鼠中存在多条差异表达的 lncRNAs<sup>[24]</sup>, 提示 lncRNA 可能在自然衰老进程中发挥一定作用。本研究对差异 lncRNAs 进行分析发现, 与 4 月龄小鼠比较, 18 月龄小鼠 eWAT 中 AI662270、C4a、Gm29719 和 BATE1 的表达明显上调, 与测序结果一致; 体外实验使用阿霉素构建的衰老脂肪细胞模型证实 AI662270 在衰老脂肪细胞中呈高表达, 提示 AI662270 可能参与调节衰老脂肪细胞的胰岛素敏感性。但 AI662270 在衰老过程中

参与胰岛素抵抗发生发展的分子机制目前仍不明确。Hong 等<sup>[25]</sup>研究发现 AI662270 定位于细胞质, 而定位于细胞质中的 lncRNA 可作为 ceRNA 内源竞争性结合 miRNA 来调控下游靶基因的表达, 提示 AI662270 可能通过 ceRNA 机制海绵吸附 miRNA 进而调控基因的表达; 敲除 AI662270 后高脂饮食小鼠体内的代谢紊乱缓解, 主要表现为脂质积累减少、动脉粥样硬化斑块减小、巨噬细胞胆固醇外排增加、泡沫细胞形成减少。本研究使用 lncRNASNP2 预测 AI662270 下游可能海绵吸附的 miRNA 为 miR-3073b-3p, 并在体内外衰老模型中验证 miR-3073b-3p 的表达, 结果显示 miR-3073b-3p 在 ADR 组中的表达较正常对照组明显降低, 且与 AI662200 的表达呈负相关; 随后应用 ENCORI 预测 miR-3073b-3p 的下游靶基因, 其中下游靶基因 *Hmox1* 已被证实可加剧小鼠和人体的胰岛素抵抗<sup>[26]</sup>, 且 *Hmox1* 的表达与胰岛素信号通路相关基因的表达呈负相关, 并可降低脂肪细胞的葡萄糖摄取率<sup>[27]</sup>。另外有研究表明, 在老年小鼠的小胶质细胞中, *Hmox1* 呈高表达<sup>[28]</sup>, 表明 *Hmox1* 与衰老密切相关。本研究发现, 衰老小鼠 eWAT 中 *Hmox1* 蛋白高表达, 且 *Hmox1* 在衰老脂肪细胞中的表达也明显上调; 衰老小鼠脂肪组织和衰老脂肪细胞中胰岛素敏感性关键蛋白 p-Akt 的表达明显降低, 衰老小鼠血清和衰老脂肪细胞培养基中的葡萄糖含量增加, 表现为胰岛素抵抗。因此 *Hmox1* 可能在自然衰老引起的胰岛素抵抗中发挥着重要作用。同时, 在 AI662270 敲低的衰老脂肪细胞中, miR-3073b-3p 的表达明显升高而 *Hmox1* 的表达明显降低, 细胞培养基中的葡萄糖含量降低, 胰岛素敏感性关键蛋白的表达升高, 胰岛素敏感性增加。因此, AI662270 可能参与调控衰老脂肪细胞的胰岛素抵抗, 可能涉及的通路为 AI662270/miR-3073b-3p/*Hmox1*, 即 AI662270 通过靶向下调 miR-3073b-3p 的表达及上调 *Hmox1* 的表达, 导致衰老脂肪细胞的胰岛素抵抗。

综上所述, 本研究结果表明, AI662270 在衰老小鼠 eWAT 发生胰岛素抵抗的过程中发挥着关键作用, 且 AI662270/miR-3073b-3p/*Hmox1* 表达的相关性符合 lncRNA 竞争性抑制 miRNA 的作用机制, 可能通过海绵吸附 miR-3073b-3p 来调控 *Hmox1* 的表达, 进而参与调控衰老脂肪细胞的胰岛素敏感性。然而本研究尚未涉及具体的机制验证, 未来还需深入探究非编码 RNA 在脂肪组织及其他多种组织器官衰老和胰岛素抵抗中的作用机制, 为延缓脂肪细胞衰老、改善与年龄相关的代谢性疾病提供新的分子靶点。

### 【参考文献】

- [1] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, et al. Hallmarks of aging: an

- expanding universe[J]. *Cell*, 2023, 186(2): 243-278.
- [2] Zeng Q, Gong Y, Zhu N, *et al*. Lipids and lipid metabolism in cellular senescence: emerging targets for age-related diseases[J]. *Ageing Res Rev*, 2024, 97: 102294.
- [3] Guo Y, Guan T, Shafiq K, *et al*. Mitochondrial dysfunction in aging[J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 88: 101955.
- [4] Fountain WA, Bopp TS, Bene M, *et al*. Metabolic dysfunction and the development of physical frailty: an aging war of attrition[J]. *Geroscience*, 2024, 46(4): 3711-3721.
- [5] Garg UK, Mathur N, Sahlot R, *et al*. Abdominal fat depots and their association with insulin resistance in patients with type 2 diabetes[J]. *PLoS One*, 2023, 18(12): e0295492.
- [6] Patel S, Sparman NZR, Arneson D, *et al*. Mammary duct luminal epithelium controls adipocyte thermogenic programme[J]. *Nature*, 2023, 620(7972): 192-199.
- [7] Zhao Y, Yue R. Aging adipose tissue, insulin resistance, and type 2 diabetes[J]. *Biogerontology*, 2024, 25(1): 53-69.
- [8] 杨华, 刘宋芳, 马楼艳, 等. 锌指蛋白 Zpr1 对 3T3-L1 前脂肪细胞分化及胰岛素信号通路的影响及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(4): 394-402.
- [9] Huang Y, Gao P, Young LH, *et al*. Targeting white adipose tissue to combat insulin resistance[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2024, 45(10): 868-871.
- [10] Corrales P, Martin-Taboada M, Vivas-García Y, *et al*. MicroRNAs-mediated regulation of insulin signaling in white adipose tissue during aging: role of caloric restriction[J]. *Aging Cell*, 2023, 22(11): e13919.
- [11] Nojima T, Proudfoot NJ. Mechanisms of lncRNA biogenesis as revealed by nascent transcriptomics[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(6): 389-406.
- [12] Herman AB, Tsitsipatis D, Gorospe M. Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation[J]. *Mol Cell*, 2022, 82(12): 2252-2266.
- [13] Matboli M, Kamel MM, Essawy N, *et al*. Identification of novel insulin resistance related ceRNA network in T2DM and its potential editing by CRISPR/Cas9[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8129.
- [14] Sathishkumar C, Prabu P, Mohan V, *et al*. Linking a role of lncRNAs (long non-coding RNAs) with insulin resistance, accelerated senescence, and inflammation in patients with type 2 diabetes[J]. *Hum Genomics*, 2018, 12(1): 41.
- [15] Hu Y, Zhang Y, Wang S, *et al*. lncRNA Gm15232 promotes lipogenesis in aging mice through the miR-192-3p/GCR pathway[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2024, 79(4): glae066.
- [16] Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, *et al*. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age[J]. *Nat Med*, 2018, 24(8): 1246-1256.
- [17] Miao YR, Liu W, Zhang Q, *et al*. lncRNASNP2: an updated database of functional SNPs and mutations in human and mouse lncRNAs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D276-D280.
- [18] 花慧, 祝超瑜, 肖元元, 等. 2型糖尿病患者胰腺脂肪沉积的影响因素及其与胰岛功能的相关性分析[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(5): 527-533.
- [19] Mueller E. Browning and graying: novel transcriptional regulators of brown and beige fat tissues and aging[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2016, 7: 19.
- [20] Su PP, Liu DW, Zhou SJ, *et al*. Down-regulation of Risa improves podocyte injury by enhancing autophagy in diabetic nephropathy[J]. *Mil Med Res*, 2023, 10(1): 32-44.
- [21] Wang Y, Li Y, Li Y, *et al*. The lncRNA OIP5-AS1/miR-4500 axis targeting ARG2 modulates oxidative stress-induced premature senescence in endothelial cells: implications for vascular aging[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2023, 27(4-5): 393-407.
- [22] Yu M, He X, Liu T, *et al*. lncRNA GPRC5D-AS1 as a ceRNA inhibits skeletal muscle aging by regulating miR-520d-5p[J]. *Aging (Albany NY)*, 2023, 15(23): 13980-13997.
- [23] Ding C, Yu Z, Sefik E, *et al*. A T(reg)-specific long noncoding RNA maintains immune-metabolic homeostasis in aging liver[J]. *Nat Aging*, 2023, 3(7): 813-828.
- [24] Li L, Zhang Y, Gao Y, *et al*. lncSNHG14 promotes nutlin3a resistance by inhibiting ferroptosis via the miR-206/SLC7A11 axis in osteosarcoma cells[J]. *Cancer Gene Ther*, 2023, 30(5): 704-715.
- [25] Hong Y, Zhang Y, Chen H, *et al*. Genetic dissection of the impact of lncRNA AI662270 during the development of atherosclerosis[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 97.
- [26] Jais A, Einwallner E, Sharif O, *et al*. Heme oxygenase-1 drives metaflammation and insulin resistance in mouse and man[J]. *Cell*, 2014, 158(1): 25-40.
- [27] Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Rodríguez A, *et al*. HMOX1 as a marker of iron excess-induced adipose tissue dysfunction, affecting glucose uptake and respiratory capacity in human adipocytes[J]. *Diabetologia*, 2017, 60(5): 915-926.
- [28] Fernández-Méndivil C, Luengo E, Trigo-Alonso P, *et al*. Protective role of microglial HO-1 blockade in aging: Implication of iron metabolism[J]. *Redox Biol*, 2021, 38: 101789.

(责任编辑: 纪方方)