

YBX3 通过调节 UCP1 的表达调控棕色脂肪产热和能量消耗

王文琴,高贤龙,巩永凤,冯科

(滨州医学院基础医学院生理教研室,山东烟台 264003)

摘要:目的 探讨棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)中 Y 盒蛋白 3(Y-box binding protein 3, YBX3)水平对小鼠产热和能量消耗的影响作用机制。方法 将小鼠置于 4 °C 环境作为冷刺激方法。用慢病毒侵染法构建过表达 YBX3 或者抑制 YBX3 表达的人血管基质组分细胞系。测量细胞的耗氧率用于评估细胞的线粒体功能。向小鼠 BAT 注射 YBX3 的小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)构建抑制小鼠 BAT 中 YBX3 表达的模型。检测小鼠的 O₂ 消耗速率、CO₂ 释放速率和能量消耗速率用于评估小鼠能量代谢情况。采用 qRT-PCR、Western blotting、免疫荧光染色法检测过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α , PGC-1 α)、解偶联蛋白 1(uncoupling protein 1, UCP1)和 YBX3 基因的表达。采用苏木精-伊红法染色检测 BAT 中脂肪细胞脂滴大小。采用 RNA 结合蛋白免疫沉淀提取与 YBX3 特异性结合的 mRNA。采用二代测序方法鉴定 mRNA。采用双荧光素酶报告基因系统检测 YBX3 与目的序列结合的情况。结果 在寒冷刺激下野生型小鼠 BAT 中 YBX3 的表达显著增加($P<0.05$)。过表达 YBX3 的人血管基质组分细胞系诱导为成熟棕色脂肪细胞后可以促进产热基因 PGC-1 α 和 UCP1 的表达($P<0.05$)。抑制 YBX3 表达的人血管基质组分细胞系诱导为成熟棕色脂肪细胞后可以抑制 PGC-1 α 和 UCP1 的表达($P<0.05$)、抑制线粒体氧化磷酸化($P<0.05$)。与对照组相比,小鼠注射 si-Ybx3 之后能量消耗显著降低($P<0.05$),在寒冷环境难以维持体温($P<0.05$),产热基因表达被显著抑制($P<0.01$),BAT 中脂肪细胞脂滴大小显著增加($P<0.05$)。与在 25 °C 相比,4 °C 环境刺激下 BAT 中 YBX3 在细胞核中的表达显著增加($P<0.05$)。YBX3 能够特异地与 PGC-1 α mRNA 3'非翻译区特定位点相结合($P<0.05$)。YBX3 能够特异地与 PGC-1 α 和 UCP1 启动子区域相结合($P<0.05$)。结论 BAT 中 YBX3 能够通过调控 PGC-1 α 和 UCP1 的表达影响产热和能量代谢。

关键词: Y-盒蛋白 3;产热;能量消耗;棕色脂肪组织;解偶联蛋白 1

中图分类号:R574 文献标志码:A

YBX3 regulates thermogenesis and energy expenditure by regulating UCP1 in brown adipose tissue

WANG Wenqin, GAO Xianlong, GONG Yongfeng, FENG Ke

(Department of Physiology, School of Basic Medicine, Binzhou Medical University, Yantai 264003, Shandong, China)

Abstract: Objective To observe the effects and mechanisms of Y-box protein 3 (YBX3) deletion in brown adipose tissue (BAT) on thermogenesis and energy consumption in mice. **Methods** The mice were placed in a 4 °C environment as a cold stimulation method. Lentiviral infection assay was used to construct a human stromal vascular fraction cell line that overexpresses YBX3 or inhibits YBX3 expression. Oxygen consumption rate was used to assess mitochondrial function. Mouse BAT was injected with YBX3 siRNA (si-Ybx3) to inhibit YBX3 expression in BAT. The oxygen consumption rate, CO₂ release rate and energy consumption rate of mice were detected to evaluate the energy metabolism of mice. qRT-PCR, Western blotting, and immunofluorescence staining assays were used to detect peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α (PGC-1 α), uncoupling protein 1 (UCP1) and YBX3 expression. HE staining was used to detect the size of lipid droplets of adipocytes in BAT. RNA-binding protein immunoprecipitation

was used to extract the mRNA binding specifically to YBX3. Next-generation sequencing assay was used to identify mRNA. Dual-luciferase reporter gene systems were used to detect the binding of YBX3 to the target sequence.

Results YBX3 expression in BAT of wild-type mice was induced by cold stimulation ($P < 0.05$). Overexpressing YBX3 promoted the expression of the thermogenic gene PGC-1 α and UCP1 after human stromal vascular fraction cell line cells being induced into mature brown adipocytes ($P < 0.05$). Silencing YBX3 in human stromal vascular fraction cell line cells inhibited the expression of PGC-1 α and UCP1 ($P < 0.05$) and mitochondrial oxidative phosphorylation after being induced into mature brown adipocytes ($P < 0.05$). Compared with the control group, mice injected with si-Ybx3 had significantly lower energy consumption ($P < 0.05$), lower body temperature in a cold environment ($P < 0.05$), and lower expression levels of thermogenic genes ($P < 0.05$). The size of lipid droplets in adipocytes increased significantly ($P < 0.05$). Compared with at 25 °C, the expression of YBX3 in the nucleus of brown adipocytes significantly increased from mice kept at 4 °C ($P < 0.05$). YBX3 specifically bound to the target sequence in the 3' untranslated region of PGC-1 α mRNA ($P < 0.05$). YBX3 specifically bound to PGC-1 α and UCP1 promoter regions ($P < 0.05$). **Conclusion** YBX3 in BAT can affect thermogenesis and energy metabolism by regulating the expressions of PGC-1 α and UCP1.

Key words: Y-box binding protein 3; Thermogenesis; Energy expenditure; Brown adipose tissue; Uncoupling protein 1

近年来,随着生活水平不断提高,肥胖以及肥胖相关并发症的发病率越来越高^[1-3],对人类健康带来极大的威胁。但目前应对肥胖的治疗手段十分有限,减肥手术和药物治疗带来的并发症和不良反应明显^[4]。因此,寻找治疗肥胖的新靶点和治疗策略成为当务之急。肥胖发生的本质是能量摄入和消耗的失衡^[5]。产热缺陷会导致能量消耗减少,促进肥胖。棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)含有大量的线粒体,通过线粒体氧化呼吸产热,消耗多余的热量、维持能量平衡,是非颤抖性产热的主要器官^[6-8],其中解偶联蛋白 1(uncoupling protein, UCP1)和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α , PGC-1 α),是调控 BAT 产热的关键基因^[9]。此外,BAT 在调节葡萄糖和脂质代谢、胰岛素敏感性和组织脂肪稳态方面也发挥着重要作用^[10]。因此,越来越多的研究集中在通过调控 BAT 功能调节人类能量代谢、治疗肥胖和糖尿病等方面的研究及作用机制^[11-12],但其中的产热机制和相应的靶点研究尚不清楚。

Y-盒蛋白家族是 DNA/RNA 结合蛋白,属于含有冷休克结构域的蛋白质大家族,包含三个成员,包括 Y 盒蛋白 1(Y-box binding protein 1, YBX1)、Y 盒蛋白 2(Y-box binding protein 2, YBX2)和 Y 盒蛋白 3(Y-box binding protein 3, YBX3)。冷休克结构域最初是在细菌的冷休克蛋白(cold shock protein, CSP)中发现的,其中一些 CSP 因温度突然降低而被诱导,以启动适应性反应^[13]。从细菌到人类,冷休克结构域在结合 RNA 或 DNA 方面都是保守的,这赋予 CSP 包括参与对冷应激的适应性反应在内的多种功能^[14-16]。在 BAT 中 YBX1 和 YBX2 高度富集,对棕色脂肪生成和产热发挥着关键的调节作用^[17-18]。但是 YBX3 在 BAT 中的作用尚不清

楚。本研究通过将 YBX3 过表达或者沉默的方式,观察 YBX3 是否与调控产热关键基因表达有相关性、是否调控 BAT 的产热功能、影响能量消耗,探究 YBX3 如何调控产热相关分子 UCP1 和 PGC-1 α 的机制,为 BAT 产热和机体能量代谢的调节提供新的研究思路和策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6~8 周龄雄性 C57BL/6 野生型小鼠 41 只,体质量 21~24 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,适应性喂养 2 周后进行后续实验。本研究所有动物实验的实施均经过滨州医学院动物伦理委员会审批,伦理审批号:2020-20。

1.1.2 细胞与质粒

人棕色脂肪组织来源的血管基质组分(human brown adipose tissue-derived stromal vascular fraction, hBAT-SVF)和人胚胎肾细胞 293(human embryonic kidney 293 cells, HEK293)细胞购自美国 ATCC 公司;pCMV6-Ctrl, pCMV6-Ybx3 质粒购自美国 Origene 科技公司。

1.1.3 主要试剂与仪器

DMEM 高糖培养基、青霉素-链霉素溶液、PBS 缓冲液均购自大连美仑生物技术有限公司;DEPC(diethyl pyrocarbonate,焦碳酸二乙酯)、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)、三碘甲状腺原氨酸(3,5,3-triiodothyronine, T3)、地塞米松、罗格列酮、胰岛素、吡啶美辛、Magna RIP[®] RNA 结合蛋白质免疫沉淀试剂盒均购自美国 Sigma 公司;RIPA 裂解液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electro-

phoresis, SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒、细胞核蛋白质提取试剂盒、基因引物均购自上海 Sangon Biotech 公司;Trizol 试剂购自美国 Ambion 公司;蛋白质浓度定量试剂盒、反转录试剂盒均购自日本 Takara 公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;EndoFree 小质粒试剂盒 II 购自北京天根生物科技有限公司;Seahorse XF 细胞线粒体压力测试试剂盒购自美国安捷伦科技有限公司;SYBR Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;抗 YBX3 购自美国 Thermo 公司和美国 Bethyl 公司;抗 UCP1、抗 PGC-1 α 、抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、抗肌动蛋白(beta-actin, β -ACTIN)购自武汉爱博泰克生物技术有限公司;FT3400 动物体温仪购自南京卡尔文生物科技有限公司;激光共聚焦显微镜购自德国蔡司公司;荧光定量 PCR 仪购自美国 Thermo 公司;电泳槽、电泳仪、转膜仪购自美国 Bio-Rad 公司;Seahorse 细胞代谢动态分析仪购自美国安捷伦科技有限公司;CLAMS 小动物能量代谢监测系统购自美国 Columbus 仪器公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞系的构建

根据文献[19],分别构建 pLVX-Ybx3 和 sh-Ybx3 质粒,对照质粒是 pLVX-Ctrl 和 sh-Ctrl,将构建好的质粒转染到 HEK293 细胞中,进行病毒的包装,48 h 后收集病毒,将其浓缩为 200 μ L,感染 hBAT-SVF 细胞 24 h 后加入嘌呤霉素进行筛选,通过验证即可得到稳定表达的细胞系,即 pLVX-Ctrl 组和 pLVX-Ybx3 组,sh-Ctrl 组和 sh-Ybx3 组。

1.2.2 细胞培养及诱导分化

将 hBAT-SVF 细胞接种于含有 10% 胎牛血清

和 1% 青霉素-链霉素溶液的 DMEM 高糖培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞汇合至 80% 时进行诱导分化,诱导培养基中加入 0.5 mmol/L IBMX、62.5 μ mol/L 吲哚美辛、2 μ g/mL 地塞米松、1 μ mol/L 胰岛素、1 nmol/L T3 和 1 μ mol/L 罗格列酮,连续换液 3 d 后,换为分化培养基,分化培养基中含有 1 μ mol/L 胰岛素、1 nmol/L T3 和 1 μ mol/L 罗格列酮,连续换液 7 d 后即诱导为成熟脂肪细胞。HEK293 细胞的培养如 hBAT-SVF,待细胞长满后可用胰酶消化传代,细胞铺板进行后续实验。

1.2.3 动物模型及分组

①常温和冷刺激模型:将 16 只 8~10 周的 C57BL/6 野生型小鼠随机分为 25 $^{\circ}$ C 组($n=8$)和 4 $^{\circ}$ C 组($n=8$),饲养 7 d。

② siRNA 处理模型:将 17 只 8~10 周的 C57BL/6 野生型小鼠随机分为 si-Ctrl 组($n=8$)和 si-Ybx3 组($n=9$),分别于小鼠肩胛 BAT 处多点原位注射 si-Ctrl/si-Ybx3(3 nmol/50 μ L PBS),每 4 天注射 1 次,注射 2 次后,每组随机取 3 只鼠放入代谢笼中监测 24 h 的 CO₂ 释放速率、O₂ 消耗速率和能量消耗速率;然后将两组小鼠放入 4 $^{\circ}$ C 环境中并可自由进食饮水,7 d 后测量直肠温度。

1.2.4 采用 qPCR 法检测 Ucp1、Ybx3 和 Pgc-1 α 基因的 mRNA 表达水平

采用 Trizol 法将组织或细胞充分裂解后,加入三氯甲烷剧烈振荡后,取其上清到等体积的异丙醇中沉淀 RNA,75% 乙醇洗涤沉淀后晾干,用 DEPC 溶解 RNA 并检测浓度,使用 Takara 逆转录试剂盒合成 cDNA,后进行实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)。所用引物序列如表 1 所示。

表 1 目的基因引物序列
Table 1 Primers of target genes

基因名称	正向(5'→3')	反向(5'→3')
Mouse-Ucp1	AGGCTTCCAGTACCATTAGGT	CTGAGTGAGGCAAAGCTGATTT
Mouse-Ybx3	GCAGTGAAGGATTTGAGCCC	GGATGGGGAAAGACCCCGTG
Mouse-Pgc-1 α	TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT	CCACTTCAATCCACCCAGAAAG
Mouse- β -actin	ATGGAGGGGAATACAGCCC	TTCTTTGCAGTCTCTTCGTT
Human-Ucp1	AGGATCGGCCTCTACGACAC	GCCCAATGAATACTGCCACTC
Human-Ybx3	ACGTCGCAGGAAACCCC	CAAGGACTTTGGTGGCGAGA
Human-Pgc-1 α	GCTTCTGGGTGGACTCAAGT	GAGGGCAATCCGTCTTCATCC
Human- β -actin	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	AAGGGACTTCTGTAAACAATGCA

1.2.5 采用 Western blotting 法检测 UCP1 和 PGC-1 α 蛋白表达水平

使用 RIPA 蛋白裂解液提取组织或细胞中的蛋白质,按照细胞核蛋白质提取试剂盒说明书操作提取 25 $^{\circ}$ C 组和 4 $^{\circ}$ C 组小鼠 BAT 的组分;使用 Takara

蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度,取等量蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳,恒压 106 V 转膜 1 h;5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后加入一抗 YBX3(1:1 000)、UCP1(1:1 000)、PGC-1 α (1:1 000)、GAPDH(1:2 000)、 β -ACTIN(1:2 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;洗膜 3 次,加入二

抗(1:5 000)室温孵育 1 h,洗膜后即可曝光。

1.2.6 免疫荧光染色检测 YBX3 基因分布

取 25 °C 组和 4 °C 组小鼠 BAT, PBS 冲洗,切成约 4 mm×4 mm×2 mm 的小块后用 1% 多聚甲醛通透 20 min; 10% 胎牛血清(含 0.2% Tween 20)室温封闭 90 min; YBX3 一抗(1:100)4 °C 孵育过夜, PBS 清洗 3 遍; 小鼠二抗(1:100)室温避光孵育 1 h, PBS 清洗 3 遍; 加 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)室温避光孵育 5 min, PBS 洗 3 遍后使用激光共聚焦显微镜检测 YBX3 基因的分布。

1.2.7 RNA 免疫沉淀(RNA Immunoprecipitation, RIP)检测 UCP1 和 PGC-1 α 基因表达量

根据试剂盒说明书提取 8 只野生型小鼠的 BAT 组织的 YBX3/IgG 所结合的 RNA 后续经过二代测序的方式,将核糖体 RNA 去除之后,鉴定出与 YBX3 特异性结合的所有 mRNA 序列,或者将其反转录为 cDNA。分为 IgG 组和 YBX3 组。

1.2.8 Seahorse 细胞代谢动态分析仪检测细胞的耗氧率(optical character recognition, OCR)

在 Seahorse 专用的培养板中诱导分化 hBAT-SVF 为成熟的脂肪细胞,使用 Seahorse 细胞代谢动态分析仪进行线粒体压力测试。测量基础呼吸的 OCR 后,首先注射 100 μ mol/L 寡霉素,第二次注射 100 μ mol/L 羰基氰-4(三氟甲氧基)苯胺(trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenylhydrazine, FCCP),然后第三次注射 50 μ mol/L 鱼藤酮和抗霉素 A 的混合物后对相应的 OCR 进行分析。

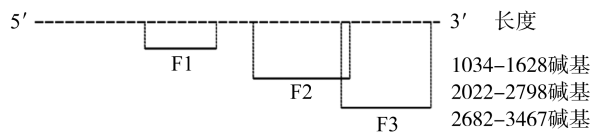


图1 *Pgc-1 α* mRNA 3'UTR 片段 1(F1)、片段 2(F2)和片段 3(F3)示意图

Figure 1 Schematic diagram of *Pgc-1 α* mRNA 3'UTR fragment 1 (F1), fragment 2 (F2), and fragment 3 (F3)

构建连接有 *Pgc-1 α* 和 *Ucp1* 的启动子区序列分别克隆到萤火虫荧光素酶报告基因载体 pGL3-Basic 上,并将构建好的质粒、pGL4.74(海肾荧光素酶对照载体)和 pCMV6-*Ybx3* 或 pCMV6-*Ctrl* 用聚乙烯亚胺(polyethyleneimine, PEI)共转染到 HEK293 细胞中,分为 pCMV6-*Ybx3* 组和 pCMV6-*Ctrl* 组。24 h 后根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书进行操作。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8 软件,对数据进行正态性检验,符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较采用 *t* 检验,三组间差异比较采用单因素方差

1.2.9 采用苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE 染色)法检测脂肪细胞内脂滴大小

将小鼠棕色脂肪组织用 4% 多聚甲醛固定后石蜡包埋,切成 10 μ m 的薄片,采用 HE 染色,用光学显微镜观察脂肪细胞内脂滴大小。

1.2.10 双荧光报告基因系统检测荧光素酶活性

构建连接有 *Pgc-1 α* 基因的 3' 非编码区(untranslational region, UTR 区)和 *Pgc-1 α* 基因的 3'UTR 突变体区(删除 Y-盒蛋白识别序列, Y-box protein recognition sequence, YRS, [UAC][CA]CA[UC]C[ACU])的 psiCHECK-2 质粒,将其与 pCMV6-*Ybx3* 或 pCMV6-*Ctrl* 共转染。

YBX3 能够通过与其靶基因 mRNA 的 3'UTR 区的 YRS([UAC][CA]CA[UC]C[ACU])特异性结合影响对应靶基因的表达。据此分析 *Pgc-1 α* mRNA 和 *Ucp1* mRNA 的 3'UTR 区序列。发现 UCP1 的 3'UTR 区没有对应的 YRS。PGC-1 α 的 3'UTR 区有 3 801 个碱基,其中 YRS 有 9 个序列。将 PGC-1 α mRNA 3'UTR 分为 3 个片段:片段 1(F1)、片段 2(F2)和片段 3(F3),对应的序列位点如图 1 所示。根据 YBX3 与 PGC-1 α 的 3'UTR 区各个序列的结合强弱进行排序^[20],选取结合强烈的 5 个序列,分别是 TCCATCC(在 F1)、TACACCT(在 F2)、CACATCT(在 F2)、CCCATCA(在 F3)、CCCATCA(在 F3)。为了确定 YBX3 是否能与这些预测的结合位点结合,需要将这些序列分别删除进行验证,因此分为 F1 组、F1-del 组、F2 组、F2-del1 组、F2-del2 组、F3 组、F3-del1 组和 F3-del2 组。

分析,两两多重比较采用 Tukey's 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BAT 中 YBX3 的表达与 UCP1 变化趋势一致

与 25 °C 组相比,4 °C 组 BAT 中 YBX3 的 mRNA 和蛋白质水平均增加($P < 0.05$),PGC-1 α 和 UCP1 的 mRNA 和蛋白质水平也增加($P < 0.05$),它们表达的变化趋势一致(图 2A、B)。

与 pLVX-*Ctrl* 组相比,pLVX-*Ybx3* 组细胞中 YBX3 的 mRNA 增加了 3.8 倍,蛋白表达水平增加

了7倍,同时,PGC-1 α 和UCP1的表达上调,见图2C-D($P<0.05$)。sh-*Ybx3*组细胞中,YBX3的表达在mRNA和蛋白质水平均被抑制,对应地,PGC-1 α

和UCP1的表达也受到抑制,如图2E~G($P<0.05$)。sh-*Ybx3*组细胞OCR低于sh-ctrl组($P<0.05$)。

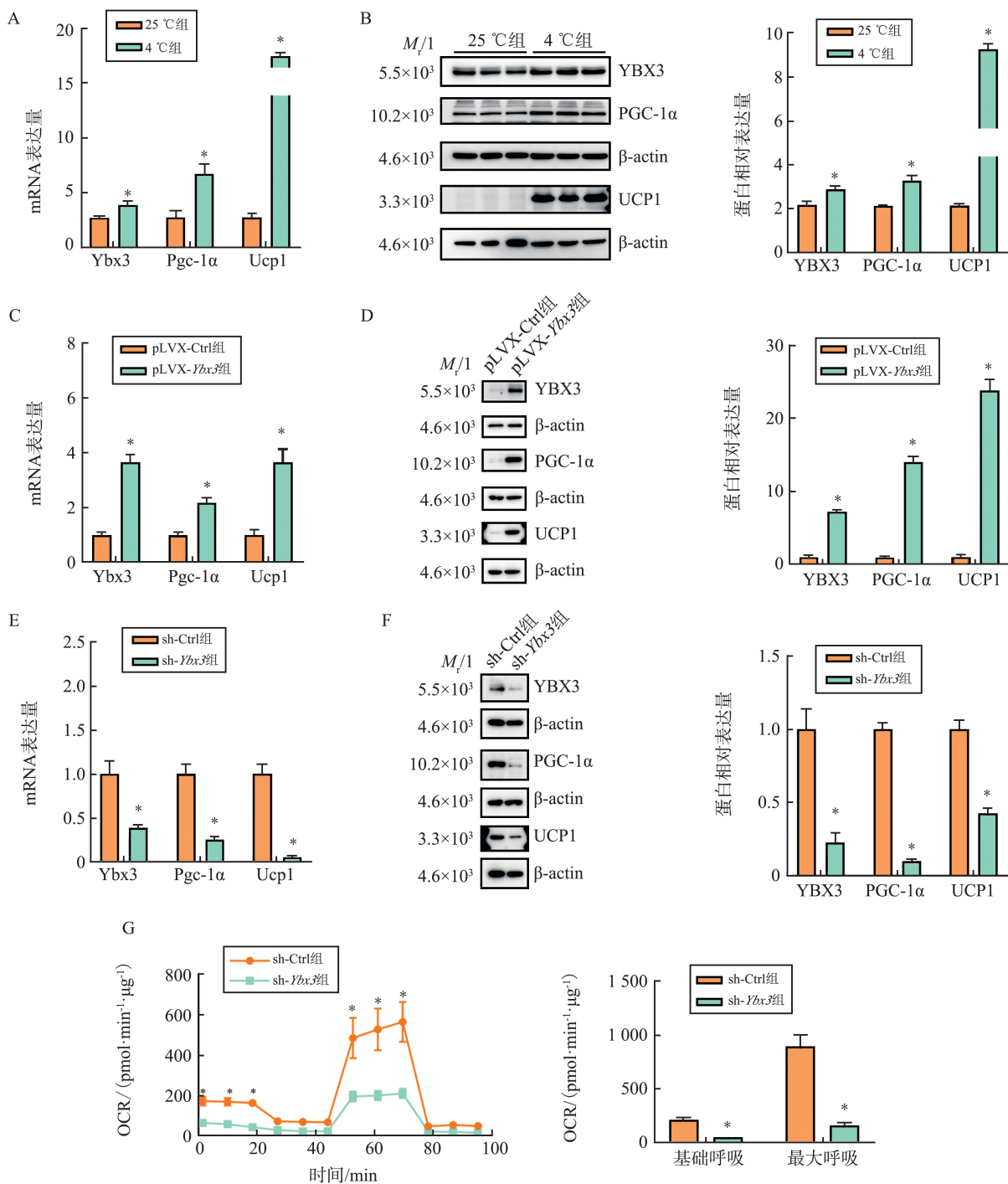


图2 棕色脂肪中YBX3的表达与UCP1的变化趋势一致

A~B: 4 °C组和25 °C组中YBX3、PGC-1 α 和UCP1的mRNA(A)和蛋白质(B)表达水平;C~D: pLVX-Ctrl组与pLVX-*Ybx3*组YBX3、PGC-1 α 和UCP1的mRNA(C)和蛋白质(D)表达水平;E~G: sh-Ctrl组与sh-*Ybx3*组YBX3、PGC-1 α 和UCP1的mRNA(E)和蛋白质(F)表达水平及OCR(G)。* $P<0.05$ 。

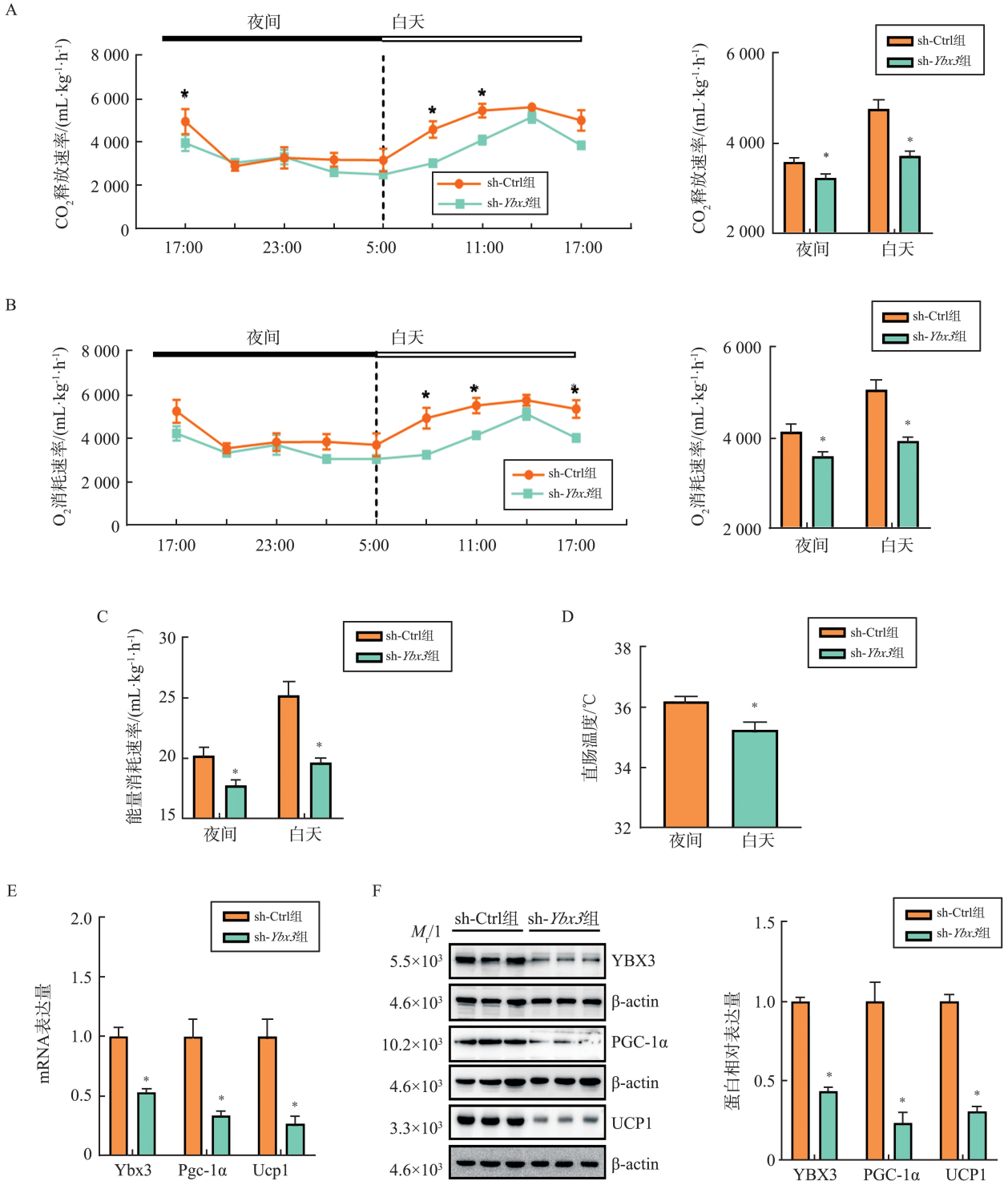
Figure 2 YBX3 expression in brown fat positively correlated with UCP1

A-B: The mRNA(A) and protein(B) expressions of YBX3, PGC-1 α and UCP1 in the 4 °C group and 25 °C group; C-D: mRNA(C) and protein(D) expressions of YBX3, PGC-1 α and UCP1 in pLVX-Ctrl group and pLVX-*Ybx3* group; E-G: The mRNA (E) and protein (F) expressions of YBX3, PGC-1 α , and UCP1, as well as the oxygen consumption rate (OCR, G) of BAT in sh-Ctrl group and sh-*Ybx3* group. * $P<0.05$.

2.2 小鼠 BAT 中缺失 YBX3 导致产热受损

与 *si-Ctrl* 组小鼠对比,无论在夜间还是白天,*si-Ybx3* 组小鼠在 24 h 之内 CO_2 释放速率、 O_2 消耗速率和能量消耗速率降低(图 3A~C) ($P < 0.05$)。将小鼠置于 4 °C 环境中饲养 7 d 后,*si-Ybx3* 组小鼠的直肠温度低于 *si-Ctrl* 组小鼠(图 3D) ($P < 0.05$)。

si-Ybx3 组小鼠 BAT 的 *Ybx3* mRNA 水平和蛋白质水平比 *si-Ctrl* 组小鼠降低了约 50% (图 3E-F),同时,*si-Ybx3* 组小鼠的 *PGC-1 α* 和 *UCP1* 表达受到抑制(图 3E、F) ($P < 0.05$)。HE 染色结果表明,*si-Ybx3* 组小鼠 BAT 细胞中有更大的脂滴(图 3G、H)。



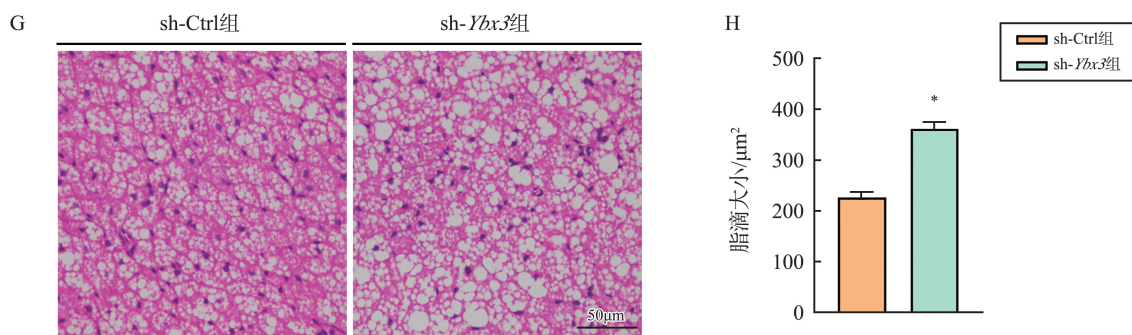


图3 小鼠BAT中YBX3的缺失导致产热受损

A~C: si-Ctrl组和si-Ybx3组小鼠在24 h光-暗周期内CO₂释放速率(A)、O₂消耗速率(B)和能量消耗速率(C);D~H: si-Ctrl组与si-Ybx3组小鼠在4℃环境下饲养7 d后的直肠温度(D),YBX3、PGC-1α和UCP1的mRNA(E)和蛋白(F)表达水平以及HE染色(G)和脂肪滴大小定量(H),放大倍数:400×。*P<0.05。

Figure 3 Deletion of YBX3 in mouse BAT resulted in impaired thermogenesis

A-C: In the si-Ctrl group and the si-Ybx3 group, CO₂ release rate (A), O₂ consumption rate (B) and energy expenditure rate (C) during a 24-h light-dark cycle; D-G: Rectal temperature (D), mRNA (E) and protein (F) expression levels of YBX3, PGC-1α, and UCP1, and HE staining (G) with lipid droplet size quantification (H) in the si-Ctrl group and the si-Ybx3 group. Magnification: 400×. *P<0.05.

2.3 寒冷刺激能够影响YBX3入核

与25℃相比,4℃组小鼠BAT细胞核中的

YBX3蛋白质水平升高(图4A)(P<0.05)。免疫荧光染色结果表明4℃组YBX3的入核增加(图4B)。

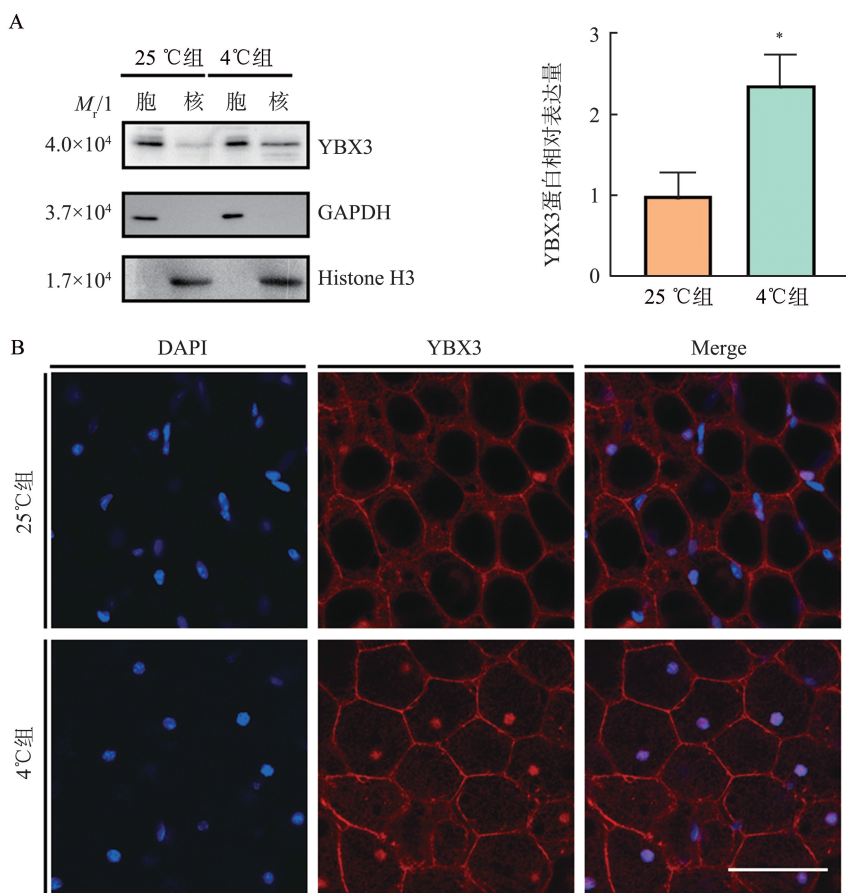


图4 寒冷刺激能够影响YBX3入核

A~B: 野生型小鼠在25℃或4℃环境下饲养7 d,在蛋白质(A)水平检测YBX3在从BAT中分离出的亚细胞定位,GAPDH(细胞质标志物)和H3(核标志物)作为对照,免疫荧光(B)染色检测YBX3在BAT中的定位。放大倍数:400×。*P<0.05。

Figure 4 Cold stimuli can affect the YBX3 entry nucleus

A-B: Wild-type mice kept at 25℃ or 4℃ for 7 days, detection of the subcellular localization of YBX3 in adipocytes isolated from BAT at the protein (A) level, with GAPDH (cytosolic fraction marker) and Histone H3 (nuclear fraction marker) serving as controls and immunofluorescence staining (B) of YBX3 in BAT. Magnification: 400×. *P<0.05.

2.4 YBX3 以 RNA 结合蛋白或者转录因子的身份调控 PGC-1 α 和 UCP1 的表达

RIP 检测结果表明, YBX3 可以与 UCP1 特异性结合, 对应的峰的信息如图 5A 所示。与 IgG 组相比, YBX3 组能够与 *Ucp1* 和 *Pgc-1 α* mRNA 特异性结合(图 5B-C) ($P < 0.05$)。双荧光报告系统检测结果表明, 与 pCMV6-Ctrl 组相比, pCMV6-Ybx3 组能够提升 3 个片段的荧光素酶活性(图

5D) ($P < 0.05$)。当删除 YRS 之后, 与对照组相比, 发现 F1-del 组(图 5E)、F2-del2 组中的(图 5F)以及 F3-del2 组(图 5G) 荧光素酶活性降低 ($P < 0.05$), F2-del1 组和 F3-del1 组与对照组相比差异无统计学意义。

与 pCMV6-Ctrl 组相比, pCMV6-Ybx3 组 *Ucp1* 和 *Pgc-1 α* 启动子的荧光素酶活性升高(图 5H-I) ($P < 0.05$)。

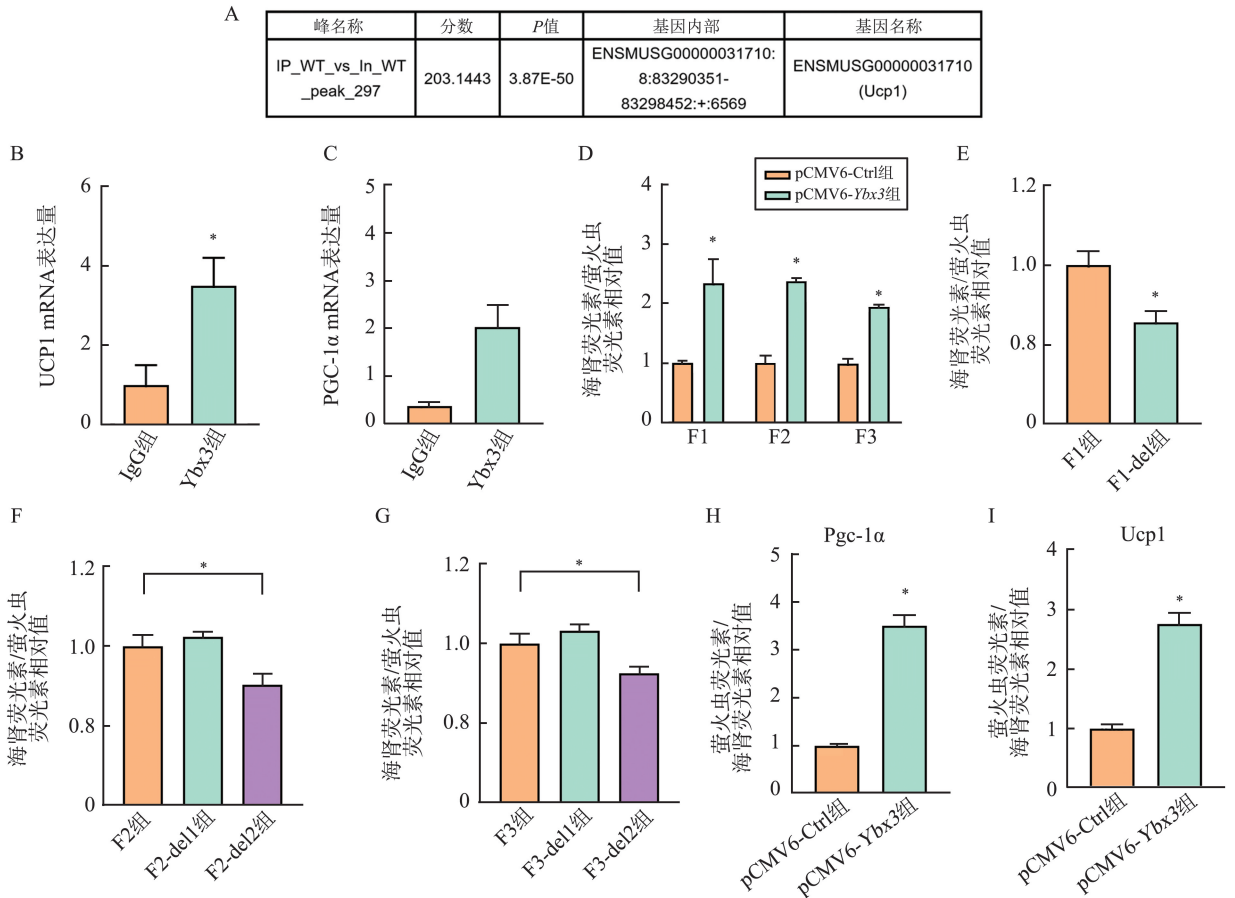


图 5 YBX3 以 RNA 结合蛋白或者转录因子的身份调控 PGC-1 α 和 UCP1 的表达

A: UCP1 的峰值注释; B~C: 通过 qPCR 分析 IgG 组和 YBX3 组测定的 YBX3 与 *ucp1* (B) 和 *pgc-1 α* (C) mRNA 的关联; D: pCMV6-Ctrl 组和 pCMV6-Ybx3 组的海肾荧光素/萤火虫荧光素相对值; E~G: 在 HEK293 细胞中转染含有 *Pgc-1 α* mRNA 3'UTR F1 (E)、F2 (F)、F3 (G) 或其相应缺失突变体组后测得的海肾荧光素/萤火虫荧光素相对值; H~I: pCMV6-Ctrl 组和 pCMV6-Ybx3 组的海肾荧光素/萤火虫荧光素相对值。* $P < 0.05$ 。

Figure 5 YBX3 regulated PGC-1 α and UCP1 expression as an RNA-binding protein or transcription factor

A: Peak annotation of UCP1; B-C: Association of YBX3 with *Ucp1* (B) and *Pgc-1 α* (C) mRNA as measured by RIP-qPCR analysis using either an anti-YBX3 antibody or control IgG; D: Renilla/firefly luciferase activity ratios measured in HEK293 cells transfected with luciferase reporter vector containing *Pgc-1 α* mRNA 3'UTR F1, F2 or F3 and pCMV6-Ctrl or pCMV6-Ybx3; E-G: Renilla/firefly luciferase activity ratio measured in HEK293 cells transfected with constructs containing either *Pgc-1 α* mRNA 3'UTR F1 (E), F2 (F), F3 (G) or their corresponding deletion mutants; H-I: Firefly/renewilla luciferase activity ratios in the pCMV6-Ctrl group and the pCMV6-Ybx3 group. * $P < 0.05$.

3 讨论

研究表明, 成年人体内存在 BAT 细胞, 激活 BAT 促进产热和能量消耗是一种对抗肥胖的有效策略^[10]。在 BAT 中, UCP1 将线粒体氧化磷酸化与

三磷酸腺苷的产生解偶联, 并将化学能以热量的形式耗散, 从而大大增加能量消耗。PGC-1 α 通过直接诱导 UCP1 表达来调节 BAT 介导的产热作用^[21]。冷暴露会增加 BAT 中 UCP1 的蛋白质水平, 并诱导产热以对抗寒冷^[22]。本研究进一步验证了上述结论, 与此同时, 发现与 25 $^{\circ}\text{C}$ 组相比, 冷刺激

导致 YBX3 的表达上调,与 PGC-1 α 、UCP1 的表达变化一致,这表明 YBX3 可能参与 BAT 的产热调控。接下来在细胞水平进一步进行了验证,当棕色脂肪细胞中的 YBX3 过表达或者沉默时,PGC-1 α 、UCP1 的表达随 YBX3 表达水平的变化产生对应的变化。在诱导为成熟棕色脂肪细胞后,YBX3 和 UCP1 和 PGC-1 α 的表达变化一致,这表明 YBX3 可能通过调控产热关键基因控制产热的表达。

寒冷刺激下在产热脂肪组织中 YBX1 表达增加,并促进诱导产热基因的表达^[17,23-24]。YBX2 在白色脂肪褐变和棕色脂肪生成的过程中表达上调,通过稳定 *Pgc-1 α* mRNA 在脂肪细胞产热过程中发挥调节作用^[18]。除了调节产热,YBX2 通过直接结合糖酵解基因的 5'UTR 来促进糖酵解基因的 mRNA 翻译,从而促进棕色脂肪细胞响应产热刺激进行糖酵解^[25]。本研究发现当棕色脂肪细胞缺失 YBX3 之后,无论是在基础呼吸还是最大呼吸的检测中,细胞 OCR 降低,导致棕色脂肪细胞线粒体呼吸异常。这预示着棕色脂肪细胞 YBX3 的表达被抑制会影响线粒体呼吸进而影响产热。接下来,给小鼠 BAT 多点原位注射 si-*Ybx3* 并置于 4℃ 环境中饲养后,小鼠 BAT 中 YBX3 的表达水平下调,进而 CO₂ 释放速率、O₂ 消耗速率、能量消耗速率均降低,产热基因的表达受到抑制,导致小鼠在寒冷环境下不能维持正常体温。这说明 BAT 中缺失 YBX3 会导致产热受损,降低对冷刺激的响应水平。

研究表明,YBX3 可以作为一种转录调节因子或者 RNA 结合蛋白,能够入核与 mRNA 特定靶点序列结合,调控 mRNA 的丰度,进而影响目的基因的表达^[17,19,23,25-27]。为了探究 YBX3 是否通过入核调控产热基因的表达,本研究提取了在 4℃ 和 25℃ 环境下饲养 7 d 的小鼠 BAT 中的胞质蛋白和核蛋白,结果表明 4℃ 可以促进 YBX3 入核,为调控产热基因的表达提供前提。

通过 RIP 检测发现 YBX3 参与调控能量代谢和产热。本研究表明 YBX3 可与 *Ucp1* 和 *Pgc-1 α* mRNA 特异性结合并且 YBX3 能够通过直接与 PGC-1 α 的 3'UTR 的 YRS 或者启动子区域结合,进而调控 PGC-1 α 的表达。YBX3 则是通过与 UCP1 的启动子区域结合完成对 UCP1 表达的调控。

综上所述,在小鼠 BAT 中缺失 YBX3 会导致产热受损、能量消耗降低、应对寒冷维持体温的能力降低。在机制上,本研究发现 YBX3 可以以转录因子或者 RNA 结合蛋白的身份通过与 PGC-1 α 、UCP1 的特定位点结合,调控它们的表达。YBX3 有望成

为治疗肥胖及相关代谢疾病的潜在靶点,同时也为具有冷休克结构域的蛋白质大家族在哺乳动物体内调控产热填充了新的内容和机制。

参考文献:

- [1] Rathmell JC. Obesity, immunity, and cancer[J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(12): 1160-1162.
- [2] Sun D, Zhang T, Su SY, et al. Body mass index drives changes in DNA methylation: a longitudinal study[J]. *Circ Res*, 2019, 125(9): 824-833.
- [3] Mahlaköiv T, Flamar AL, Johnston LK, et al. Stromal cells maintain immune cell homeostasis in adipose tissue via production of interleukin-33[J]. *Sci Immunol*, 2019, 4(35): eaax0416. doi:10.1126/sciimmunol.aax0416.
- [4] Kusminski CM, Bickel PE, Scherer PE. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(9): 639-660.
- [5] Wu T, Liu QH, Li YP, et al. Feeding-induced hepatokine, Manf, ameliorates diet-induced obesity by promoting adipose browning via p38 MAPK pathway[J]. *J Exp Med*, 2021, 218(6): e20201203. doi: 10.1084/jem.20201203.
- [6] 梁中昊, 庄向华, 黄珊, 等. 饮食诱导肥胖雌鼠棕色脂肪组织蛋白质组学分析[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2024, 62(2): 10-19.
LIANG Zhonghao, ZHUANG Xianghua, HUANG Shan, et al. Proteomic analysis of brown adipose tissue in diet-induced obese female mice[J]. *Journal of Shandong University(Health Sciences)*, 2024, 62(2): 10-19.
- [7] Li GL, Xie C, Lu SY, et al. Intermittent fasting promotes white adipose browning and decreases obesity by shaping the gut microbiota[J]. *Cell Metab*, 2017, 26(5): 801.
- [8] Morigny P, Boucher J, Arner P, et al. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2021, 17(5): 276-295.
- [9] Cheng H, Sebaa R, Malholtra N, et al. Naked mole-rat brown fat thermogenesis is diminished during hypoxia through a rapid decrease in UCP1[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6801.
- [10] Cohen P, Kajimura S. The cellular and functional complexity of thermogenic fat[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(6): 393-409.
- [11] Chen SZ, Liu XX, Peng C, et al. The phytochemical hyperforin triggers thermogenesis in adipose tissue via a Dlat-AMPK signaling axis to curb obesity[J]. *Cell Metab*, 2021, 33(3): 565-580.
- [12] Emmett MJ, Lim HW, Jager J, et al. Histone deacety-

- lase 3 prepares brown adipose tissue for acute thermogenic challenge[J]. *Nature*, 2017, 546(7659): 544-548.
- [13] Chaudhary A, Chaurasia PK, Kushwaha S, et al. Correlating multi-functional role of cold shock domain proteins with intrinsically disordered regions[J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 220: 743-753. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.08.100.
- [14] Lindquist JA, Mertens PR. Cold shock proteins: from cellular mechanisms to pathophysiology and disease[J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1): 63.
- [15] 杨明, 邓婷婷, 王雨洁, 等. YBX3 通过 MAPK 途径促进鼻咽癌增殖和生长的实验研究[J]. *实用癌症杂志*, 2022, 37(2): 175-180, 224.
YANG Ming, DENG Tingting, WANG Yujie, et al. YBX3 promotes the proliferation and tumor growth of nasopharyngeal carcinoma by MAPK pathway[J]. *The Practical Journal of Cancer*, 2022, 37(2): 175-180, 224.
- [16] 孙一鸣. 冷休克蛋白 YBX3 在结肠癌中调控恶性进展的效应与机制研究[D]. 重庆: 中国人民解放军陆军军医大学, 2023.
- [17] Wu RF, Cao ST, Li F, et al. RNA-binding protein YBX1 promotes brown adipogenesis and thermogenesis via PINK1/PRKN-mediated mitophagy[J]. *FASEB J*, 2022, 36(3): e22219. doi:10.1096/fj.202101810RR.
- [18] Xu D, Xu SH, Kyaw AMM, et al. RNA binding protein Ybx2 regulates RNA stability during cold-induced brown fat activation[J]. *Diabetes*, 2017, 66(12): 2987-3000.
- [19] Sun H, Li H, Yan J, et al. Loss of CLDN5 in podocytes deregulates WIF1 to activate WNT signaling and contributes to kidney disease[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1600.
- [20] Chowdhury TA, Kleene KC. Identification of potential regulatory elements in the 5' and 3' UTRs of 12 translationally regulated mRNAs in mammalian spermatids by comparative genomics[J]. *J Androl*, 2012, 33(2): 244-256.
- [21] Cho HT, Kim JH, Lee JH, et al. Effects of Panax ginseng extracts prepared at different steaming times on thermogenesis in rats[J]. *J Ginseng Res*, 2017, 41(3): 347-352.
- [22] Xue C, Lu HY, Liu Y, et al. Trans-ferulic acid-4- β -glucoside alleviates cold-induced oxidative stress and promotes cold tolerance[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): 2321.
- [23] WU R, FENG S, LI F, et al. Transcriptional and post-transcriptional control of autophagy and adipogenesis by YBX1[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(1): 29.
- [24] Rabiee A, Plucińska K, Isidor MS, et al. White adipose remodeling during browning in mice involves YBX1 to drive thermogenic commitment[J]. *Mol Metab*, 2021, 44: 101137. doi:10.1016/j.molmet.2020.101137.
- [25] 卢环宇. RNA 结合蛋白 QKI 在冷暴露激活脂肪产热代谢中的分子调控机制及功能研究[D]. 西安: 中国人民解放军空军军医大学, 2019.
- [26] Cooke A, Schwarzl T, Huppertz I, et al. The RNA-binding protein YBX3 controls amino acid levels by regulating SLC mRNA abundance[J]. *Cell Rep*, 2019, 27(11): 3097-3106.
- [27] Wei MT, Zhang YG, Yang XY, et al. Claudin-2 promotes colorectal cancer growth and metastasis by suppressing NDRG1 transcription[J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(12): e667. doi:10.1002/ctm2.667.

(编辑:房红娟)