

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫名稱：miR-302 減緩高濃度游離脂肪酸導致肝臟脂肪毒性之
* 分子機轉研究 *
* ***** ***** *

執行計畫學生：何筱莉
學生計畫編號：MOST 106-2813-C-040-037-B
研究期間：106年07月01日至107年02月28日止，計8個月
指導教授：林志立

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學研究所

中華民國 107年04月02日

miR-302 減緩高濃度游離脂肪酸導致肝臟脂肪毒性之分子機轉研究

一、摘要

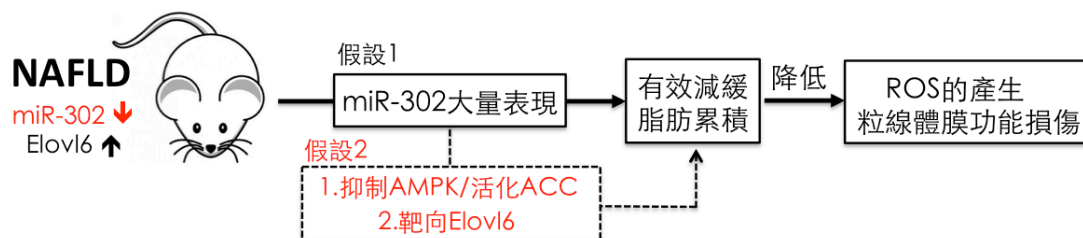
一般而言，脂肪肝可分為酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver disease)及非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)，若長期飲酒過量所導致的脂肪肝則稱之為酒精性脂肪肝；但若因藥物、肥胖、第二型糖尿病或高血脂症等因素所引起的脂肪肝則稱之為非酒精性脂肪肝。NAFLD 是最常見的一種脂肪肝，其主因是大量的游離脂肪酸(free fatty acid, FFA)進入血液後，再被運送到肝臟進行代謝，然而過多的脂肪酸累積在肝臟中會造成脂肪變性(steatosis)，並產生大量的活性氧分子(reactive oxygen species, ROS)以及造成粒線體膜電位(mitochondrial membrane potential)受損，進一步導致肝臟胰島素阻抗(insulin resistance)。若造成過度的發炎反應便會使 NAFLD 惡化至非酒精性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)，則成為不可逆的肝損傷現象，因此設法在初期阻止脂肪大量累積的機制對於防治 NAFLD 的惡化扮演著非常重要的角色。已知 NAFLD 的常見脂肪合成路徑主要是透過抑制 AMP 活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)來活化 acetyl CoA carboxylase (ACC)，再透過超長鏈脂肪酸延伸酶 6 (elongation of very long chain fatty acid protein 6, Elovl6)的參與合成 C16-18 的脂肪酸進一步形成更長鏈脂肪酸。近年來的研究發現，在餵食小鼠高脂飲食誘發 NAFLD 的動物模式中，Elovl6 明顯大量表現，以及其被認為在能量代謝和胰島素阻抗中扮演著重要作用；而在同樣的情況下也可以觀察到 microRNA 的表現量易有發生變化的情況，其中 miR-34a 可以影響脂質的代謝速率、miR-21 可以抑制 NF- κ B 途徑所誘發的發炎反應，而最特別的是 miR-302 有發生降低的現象。由於我們先前曾發現 miR-302 與細胞的重新編成(reprogramming)有關，且似乎能夠改變肝細胞的生理活性，減少細胞凋亡(Apoptosis)、氧化傷害(oxidative stress)和胰島素阻抗的現象，是故推論其在 NAFLD 中可能會扮演著保護性的角色，但詳細的機轉目前則尚不明瞭。因此在本計劃書中我們將著重探討 miR-302 在 NAFLD 中所扮演的角色，若其能夠有效減緩脂肪大量生合成的狀況，則能進而阻止疾病繼續惡化。由於已知人體中的主要脂肪酸由棕櫚酸(palmitic acid, PA)和油酸(Oleic acid, OA)組成，我們將利用 PA:OA=1:2 建立 FFA 誘導肝臟脂肪累積的模型，透過實驗的驗證大量表現 miR-302 是否能夠改善肝細胞脂肪累積及變性的狀況，並因而減緩氧化壓力傷害與粒線體膜電位受損的現象而達到對抗 NAFLD 的病程進展。

二、研究動機與研究問題

現代人由於生活壓力過大，生活型態不規律，加上受到西方飲食文化的影響，攝取過多高熱量、高脂肪的食物，導致罹患肥胖、高血脂及第二型糖尿病等代謝症候群的人口比率逐漸提高。許多研究都指出代謝症候群會提高非酒精性脂肪肝

(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的發生，因此 NAFLD 現今被認為可能是代謝症候群惡化下所誘發的疾病。根據病理檢查，NAFLD 盛行率約 20%-30%，在肥胖及糖尿病人族群裡盛行率更高達 70%-90%。過去脂肪肝一直被認為是沒有傷害或傷害性不高的臨床表徵，但近年來卻逐漸證實肝臟脂肪變性會緩慢地演變成 NASH，甚至會惡化至不可逆的肝纖維化或肝硬化，因此在 NAFLD 初期降低脂肪酸持續累積至關重要。目前臨床上針對 NAFLD 的治療，除了飲食與體重的控制、運動之外，藥物治療則使用胰島素增敏劑、抗氧化劑、降血脂劑等，然而卻很少有藥物能同時解決脂肪累積和肝臟胰島素阻抗的問題，因此若能釐清 NAFLD 致病機轉中的調控因子，或許能夠提供一個新的治療方式。先前我們實驗室使用 TargetScan 線上資料庫進行 miR-302 靶向基因，發現 miR-302 靶向 Elovl6 基因的 3'-untranslated region (3'-UTR)，且近年來的研究發現在 NAFLD 動物模式中，可以觀察到超長鏈脂肪酸延伸酶 6 (elongation of very long chain fatty acid protein 6, Elovl6)表現量明顯增加，同時 miR-302 表現則明顯降低。已知 Elovl6 主要參與 C16-18 脂肪酸的合成，可以被認為是長鏈脂肪酸大量累積的源頭，然而 miR-302 調控脂質合成、氧化傷害和肝胰島素阻抗的現象仍舊不清楚，因此在本計劃書中，希望透過實驗來驗證以下假設：

1. miR-302 能夠以多元調控的方式有效減緩脂肪的累積，再進一步改善 ROS 的產生及粒線體膜功能損傷的狀況，降低氧化傷害。
2. 推測 miR-302 透過活化 AMPK 來抑制 ACC 減少脂肪生合成，同時靶向 Elovl6 基因降低長鏈脂肪酸的生成。



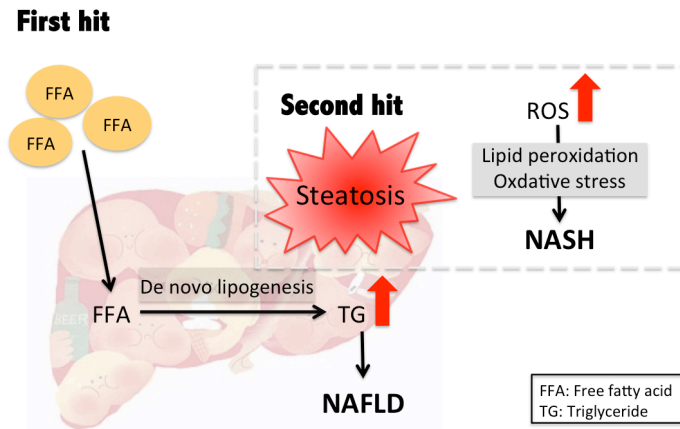
圖一、假設示意圖

三、文獻回顧與探討

(一) 非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)

脂肪肝的病理解釋為肝臟累積三酸甘油脂(triglyceride, TG)重量大於肝臟本身 5%以上，或肝組織切片超過 10%以上的肝細胞有脂防空泡堆積。NAFLD 現今被認為可能是代謝症候群惡化下所誘發的疾病，然而 NAFLD 的病理機制至今仍然不完全清楚。1988 年 Day 和 James 提出的“兩次衝擊假說(Two Hits Hypothesis)”為目前最早且最多人接受的致病機轉理論，被廣為接受且被沿用至今 (Day & James, 1988) (圖二)。此假說說明 NAFLD 受到第一次衝擊(First hit)主要是由肥胖、高血壓、高血脂或第二型糖尿病等代謝性疾病，釋放大量游離脂肪酸(free fatty acid, FFA)進入血液，使其運送到肝臟進行脂肪合成，肝臟脂肪異常合成導致脂肪過度堆積和脂肪變性，而形成脂肪肝。第二次衝擊(Second hit)為肝臟變性

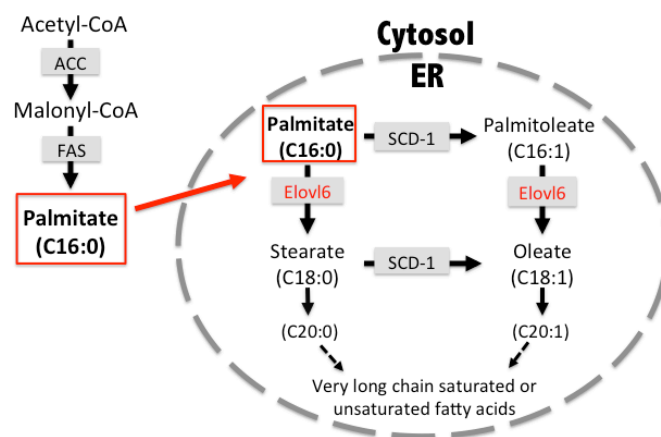
期間，產生大量活性氧分子(reactive oxygen species, ROS)，並且誘發細胞內的氧化壓力(oxidative stress)傷害和脂質過氧化作用(lipid peroxidation)，肝臟細胞外基質合成大於降解，造成更嚴重的肝發炎、肝纖維化甚至肝硬化。



圖二、二次衝擊解說圖

(二) NAFLD 之脂肪合成機制

過多的 FFA 會造成肝臟細胞無法負荷而促進肝臟脂肪的合成作用(*de novo* lipogenesis)，減少脂肪酸的氧化作用(β oxidation)和極低密度脂蛋白的合成(Jung & Choi, 2014)，造成肝臟脂質代謝活性降低，卻也無法將多餘的脂肪送出肝臟，而使脂肪堆積在肝臟細胞中。肝細胞脂肪合成的分子機轉通常是透過 acetyl CoA carboxylase (ACC)的活性促進 acetyl CoA 轉變成 malonyl-CoA，而細胞再利用 malonyl-CoA 經 fatty acid synthase (FAS)作用產生 palmitate (C16:0)的脂肪酸，接著 palmitate (C16:0)會進入內質網(endoplasmic reticulum, ER) 與超長鏈脂肪酸延伸酶 6 (elongation of very long chain fatty acid protein 6, Elovl6)作用，合成 stearate (C18:0)，再透過 stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD-1)和 diacylglycerol (DAG)等一系列作用後，於肝細胞內合成三酸甘油脂和油滴的累積(Perry et al., 2011)(圖三)。目前有研究發現活化肝臟的 AMPK，同時抑制 ACC 的活性及脂肪生成轉錄因子(transcription factors)可減緩脂肪的生合成，但其關鍵的脂肪合成因子至今仍不完全清楚。



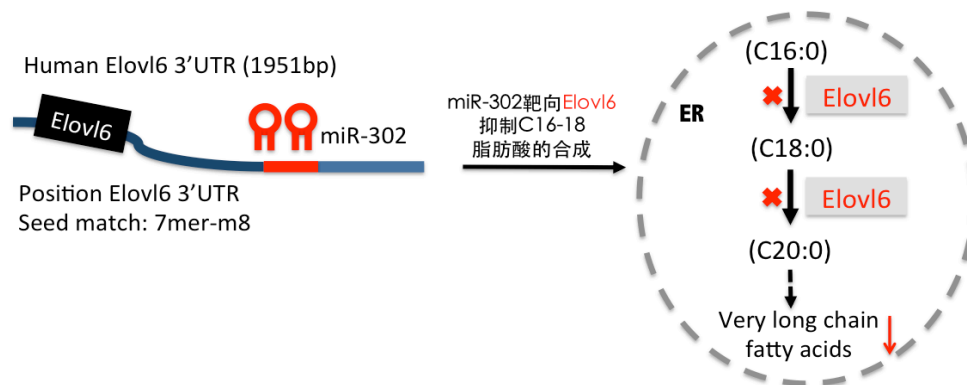
圖三、肝臟長鏈脂肪合成路徑

(三) Elovl6 在 NAFLD 中扮演的角色

Elovl 家族共 7 個成員，分別命名為 Elovl1 到 Elovl7，而 Elovl6 是此家族的第 6 個成員，位於染色體 4q25，全長 105 kb (Moon et al., 2001)，被認為在 NAFLD 中扮演著重要的角色(Kessler et al., 2014)。已知 Elovl6 廣泛分佈於細胞中的 ER，參與 C16 到 C18 飽和與不飽和脂肪酸的合成，而當長鏈脂肪酸的合成增加後，會結合 coenzyme A 形成 long-chain fatty acyl-coenzyme A (LCFA-CoA) 複合物，促進 DAG 和 sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) 的表達，增加蛋白激酶 C (protein kinase C) 的活性和抑制 insulin receptor substrate 1 (IRS-1) 和 IRS-2 的訊息傳遞，導致肝胰島素阻抗(insulin resistance)(Bruce & Febbraio, 2007)。因此，若為避免肝胰島素阻抗的情形發生，由圖三的脂肪合成路徑解說圖可以得知，Elovl6 為形成更長鏈脂肪酸的關鍵酵素，若能調控其表現量使之減少，或許便能因此減緩長鏈脂肪酸的累積，進而降低肝胰島素阻抗的發生率，對 NAFLD 疾病的改善應有一定的幫助。

(四) miR-302 與 NAFLD 的關係

miRNA 是一類長度為 19-25 nt 的內源非編碼小分子 RNA，廣泛存在各種生物體且透過 miRNA 的 3'-untranslated region (3'-UTR) 辨認配對後，使該目標 miRNA 的轉譯作用受到抑制。miRNAs 被認為廣泛地參與不同生物生理過程的調節，包括細胞生長、分化、代謝和細胞增殖等過程，特別是近年來也發現 miRNAs 在 NAFLD 的致病過程中扮演了多元調控的角色(Abente et al., 2015)。在這些 miRNAs 中，已知當間接給予已分化的細胞大量 miR-302 時，其會透過調控幹細胞相關蛋白的活性使之反轉成類似幹細胞活性的細胞，因此 miR-302 可以用來誘發誘導性多功能幹細胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)生成(Kelley et al., 2012)。而 NAFLD 發生時，由於大量的脂肪酸累積造成氧化壓力，進而使得細胞老化，此時若 miR-302 能夠提升細胞自我更新能力，則對控制疾病有一定的幫助。最近的研究發現長期餵食小鼠高脂飲食的時候，其巨噬細胞的 miR-302a 會被明顯壓抑並會干擾小鼠體內膽固醇的代謝平衡(Meiler et al., 2015)。在另一項研究中也發現發現餵食小鼠高脂飲食誘發 NAFLD 後，促進脂肪合成的 Elovl6 會過度表現，miR-302 表現量則明顯減少(Matsuzaka et al., 2012)。而先前本實驗室透過 TargetScan 線上資料庫發現 miR-302 靶向 Elovl6，因此在肥胖或代謝症候群的情況下，miR-302 扮演著影響脂肪生合成過程中非常關鍵的角色。

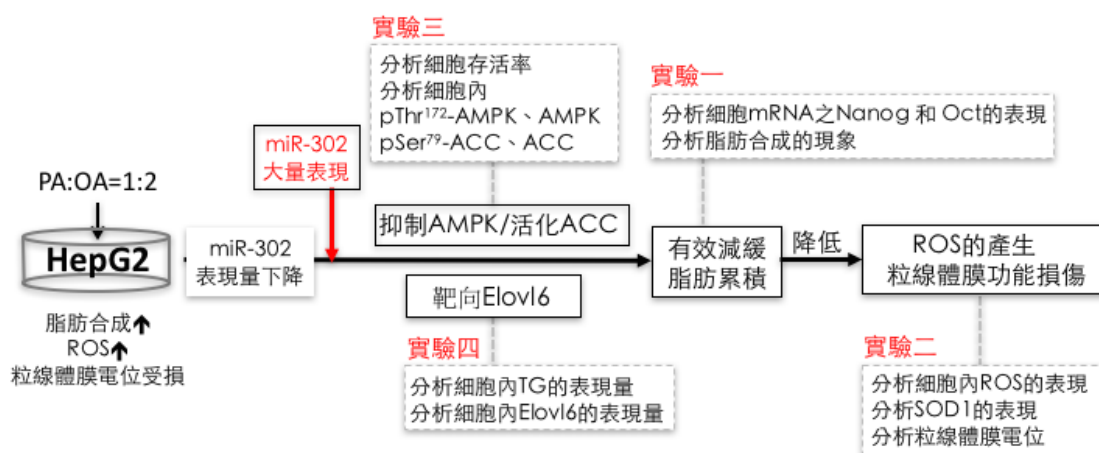


圖四、miR-302 靶向 Elovl6 抑制長鏈脂肪酸合成示意圖

四、研究方法及步驟

已知 NAFLD 之致病過程是由於血液中大量游離脂肪酸(free fatty acid, FFA) 被運送到肝臟進行代謝，過多的脂肪酸造成肝臟細胞無法負荷進而促進脂肪合成，而脂肪過度堆積會造成氧化傷害，其中包含產生大量 ROS 及造成粒線體膜電位受損；研究顯示 miR-302 似乎能夠改變肝細胞的生理活性，減少細胞凋亡、氧化傷害和減弱胰島素阻抗的現象，而同時在 NAFLD 的動物模式中，則可以明顯觀察到其表現量會降低，因此本計劃研究目標為：

1. 驗證 miR-302 是否能夠有效減緩肝臟脂肪的累積，且同時降低氧化壓力傷害。
2. 深入探討 miR-302 是否透過調控 AMPK/ACC 路徑減少脂肪的生合成，同時透過降低 Elov16 基因的表現量改善脂肪累積的狀況。



圖五、實驗設計流程

實驗設計與方法

1. 細胞株模式方面，選擇以人類的肝癌細胞株 HepG2 及小鼠 immortal cell line FL83B 作為實驗材料。由於人體中的主要脂肪酸由棕櫚酸(palmitic acid, PA) 和油酸(Oleic acid, OA)組成，使用 PA:OA=1:2 (PAOA)建立 FFA 誘導肝臟脂肪變性的模型。
2. 動物模式方面，選擇以 C57BL/6 小鼠 HFD 誘發 NAFLD 的模式，驗證肝臟組織其 miR-302 表現的變化量。

實驗一：分析透過 miR-302 大量表現是否能夠減緩 PAOA 在肝臟細胞株中誘導脂肪累積的狀況

在 miR-302 過量表現細胞株和未過量表現細胞株(HepG2、FL83B)中給予 PAOA 誘發脂肪堆積

1-1 使用 Lipofectamine™ 2000 Reagent 將 miR-302 plasmid 轉入 HepG2，miR-302 plasmid 具有表現紅色螢光的基因，使用螢光顯微鏡觀察。

1-2 待細胞在 10cm dish 生長至 80%時收集細胞內 RNA，使用 real time quantitative PCR analysis 分析細胞 miR-302 的表現。

1-3 使用 oil red O staining 染色分析細胞內脂肪合成的現象，在顯微鏡下觀察細胞內紅色脂肪滴，並量化數據。

- (1) 待細胞清洗過後，將 oil red O (0.7g oil red O 混在 85% propylene glycol) 加入培養皿內輕微搖晃 30 分鐘，再以 dd₂H₂O 小心清洗。此時脂肪細胞內的油滴會被染成紅色，在顯微鏡下觀察紀錄。
- (2) 使用 100% propylene glycol 將紅色染劑溶出，使用 ELISA reader 測定樣本吸光值，回推細胞存活率。

實驗二：分析透過 miR-302 大量表現是否能夠減緩 ROS 的產生及粒線體功能損傷的狀況

在 miR-302 過量表現細胞株和未過量表現細胞株(HepG2、FL83B)中給予 PAOA 誘發脂肪堆積

2-1 使用 DCFH-DA 染劑分析細胞內 ROS 的表現，以螢光顯微鏡觀察。

DCFH-DA 為一種螢光染劑，進入細胞膜後會產生水解作用，再進一步與 H₂O₂ 反應產生綠色螢光。

2-2 使用 JC-1 染劑分析粒線體膜電位去極化的功能。

當細胞未受損傷時，帶正電的 JC-1 染劑會進入粒線體聚集成多體，產生橘紅色螢光；當粒線體受到傷害時，染劑則會形成單體，形成綠色螢光。

2-3 使用 western blotting 分析消除 ROS 酵素脂 SOD1 的表現並量化數值，依據 β-actin 為參考值進行標準化。

- (1) 待實驗反應結束，使用蛋白質裂解液收集細胞蛋白儲存於-20°C 冰箱中，待隔日離心轉速為 12000×g，30 分鐘，4°C，收集上清液。
- (2) 將細胞蛋白定量 50μg，依據蛋白大小需求配置 8%-15%的 SDS page 來分離蛋白，之後再轉移 SDS page 到 polyvinylidene difluoride membranes (PVDF membrane)。
- (3) 使用一級抗體(1:1000)稀釋於 4°C 反應 24 小時，再使用 1X PBST 清洗一級抗體。
- (4) 使用二級抗體(1:10000)稀釋於室溫下反應 2 小時，再接著使用 1X PBST 清洗二級抗體。
- (5) 最後使用冷光呈色(chemiluminescence kits)，再使用底片與冷光反應即可得之蛋白變化。

實驗三：探討 miR-302 是否透過 AMPK/ACC 路徑減少脂質堆積

在 miR-302 過量表現細胞株和未過量表現細胞株(HepG2)中給予 PAOA 誘發脂肪堆積

3-1 使用 MTT assay 分析細胞存活率。

3-2 使用 western blotting 分析細胞內 pThr¹⁷²-AMPK、AMPK、pSer⁷⁹-ACC、ACC 的表現並量化數值，依據 β-actin 為參考值進行標準化。

實驗四：分析 miR-302 透過靶向 Elovl6 減緩脂肪堆積的現象

在 miR-302 過量表現細胞株和未過量表現細胞株(HepG2)中給予 PAOA 誘發脂肪堆積

4-1 使用 TargetScan http://www.targetscan.org/vert_71/ 進行 miR-302 靶向基因。

4-2 分析細胞內 TG 的表現量。

使用蛋白質裂解液收集細胞，離心轉速為 $12000\times g$ ，15 分鐘， $4^{\circ}C$ ，收集上清液，並與三酸甘油酯試劑混合，在 $37^{\circ}C$ 反應 5 分鐘，使用 ELISA reader 測定樣品波長 500nm 的吸光值，之後進行蛋白濃度校正，所得數值為每 μg 的蛋白中含有多少 μg 的三酸甘油酯。

4-3 使用 western blotting 分析細胞內 Elovl6 的表現並量化數值，依據 β -actin 為參考值進行標準化。

五、研究結果與討論

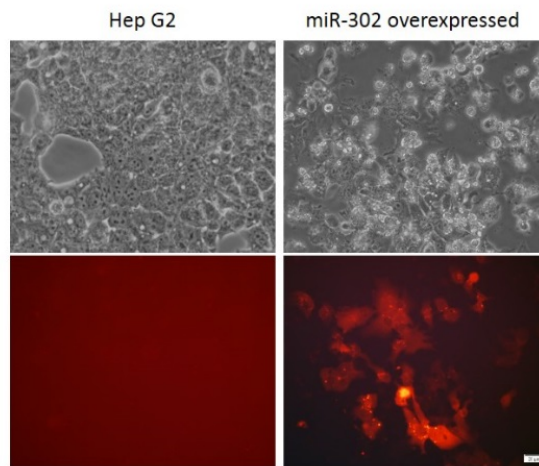


圖 1、使用 Lipofectamine™ 2000 Reagent 把 miR-302 plasmid 轉入肝癌細胞株之 HepG2，miR-302 plasmid 具有表現紅色螢光基因並且使用螢光顯微鏡觀察。

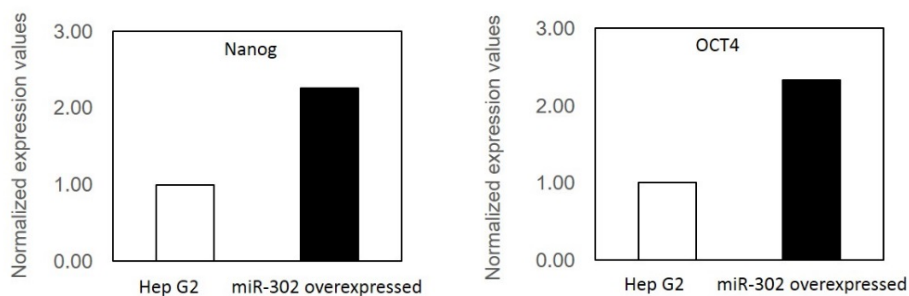


圖 2、在 miR-302 過量表現細胞株和 HepG2 細胞株，在 10 cm dish 種入 1×10^6 顆細胞等待細胞生長至 80%收集細胞內 RNA，使用 RT-PCR 分析幹細胞相關 mRNA 之 Nanog 和 Oct4 的表現。

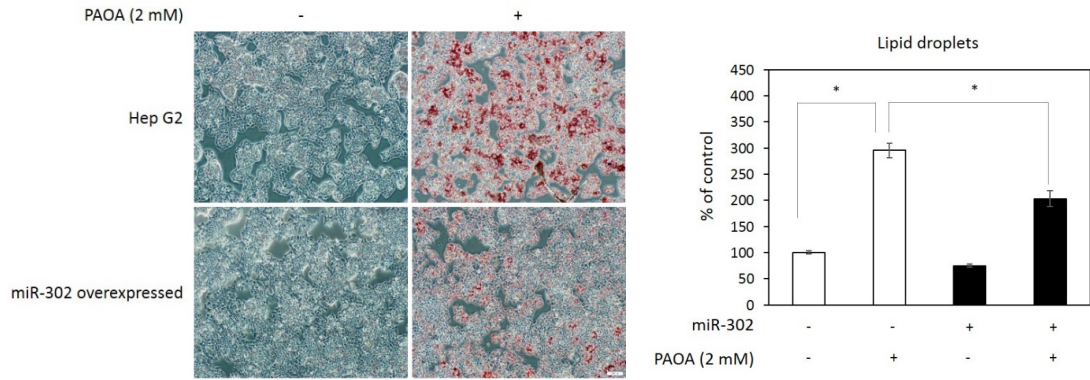


圖 3、在 miR-302 過量表現細胞株和 HepG2 細胞株分別給予 PAOA 2 mM 處理 24 小時後，使用 oil red O staining 染色分析細胞內脂肪合成的現象，同時量化分析細胞內脂肪合成的現象。

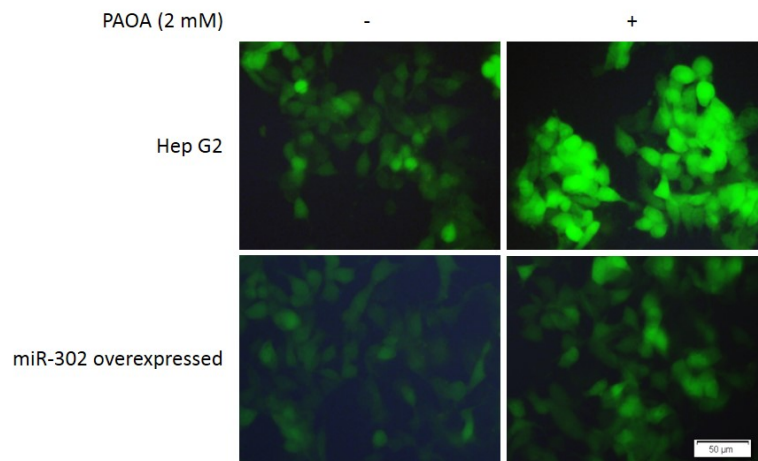


圖 4、在 miR-302 過量表現細胞株和 HepG2 細胞株分別給予 PAOA 2 mM 處理 24 小時後，使用 DCFH-DA 染劑分析細胞內 ROS 的表現，並且使用螢光顯微鏡觀察細胞內綠色螢光的表現。綠色螢光表示 ROS 的表現。

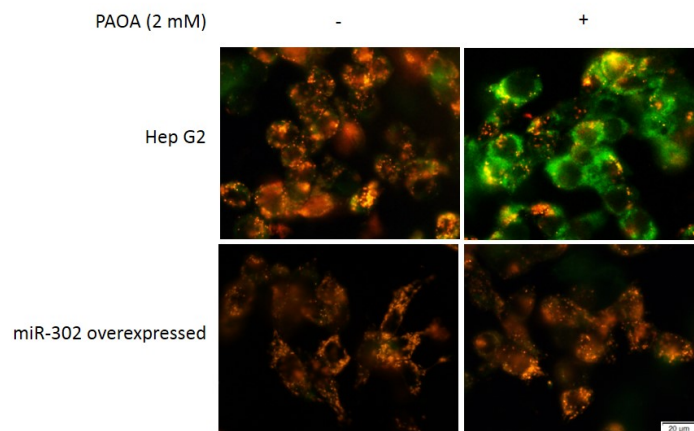


圖 5、在 miR-302 過量表現細胞株和 HepG2 細胞株分別給予 PAOA 2 mM 處理 24 小時後，使用 JC-1 染劑分析粒線體膜電位去極化的功能。

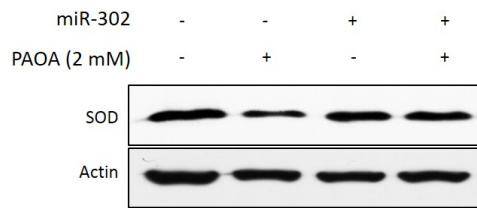


圖 6、在 miR-302 過量表現細胞株和 HepG2 細胞株分別給予 PAOA 2 mM 處理 24 小時後收集細胞內蛋白，使用 western blotting 分析消除 ROS 酵素脂 SOD1 的表現和量化數值，並且依據 β -actin 為參考值進行標準化，以 SK-N-MC 為對照組觀察目標蛋白的改變倍率。

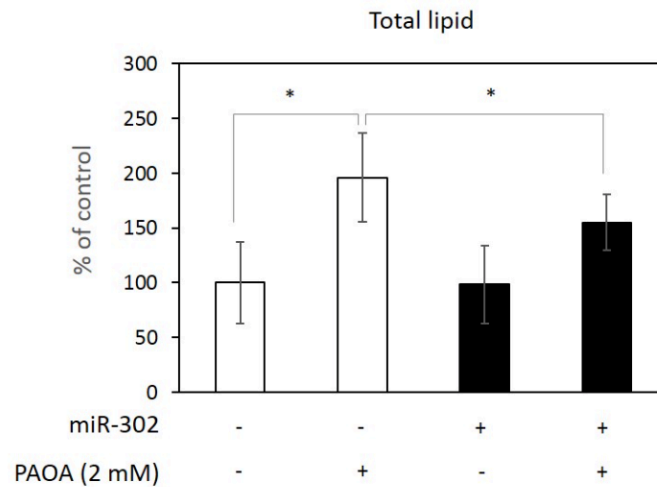


圖 7、在 miR-302 過量表現細胞株和 HepG2 細胞株分別給予 PAOA 2 mM 處理 24 小時後，使用 MTT assay 分析細胞存活率。

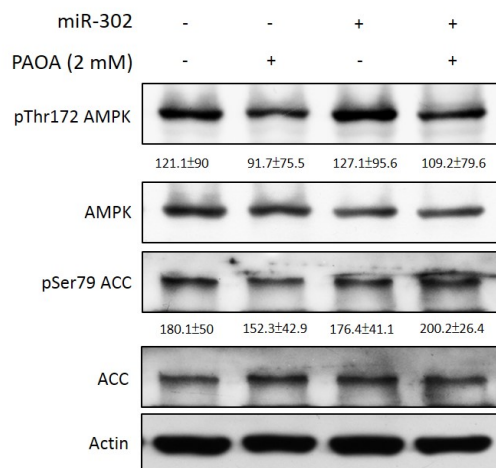


圖 8、在 miR-302 過量表現細胞株和 HepG2 細胞株分別給予 PAOA 2 mM 處理 24 小時後收集細胞內蛋白，使用 western blotting 分析細胞內 pThr¹⁷²-AMPK、AMPK、pSer⁷⁹-ACC 和 ACC 的表現及量化數值，並且依據 β -actin 為參考值進行標準化，以 SK-N-MC 為對照組觀察目標蛋白的改變倍率。

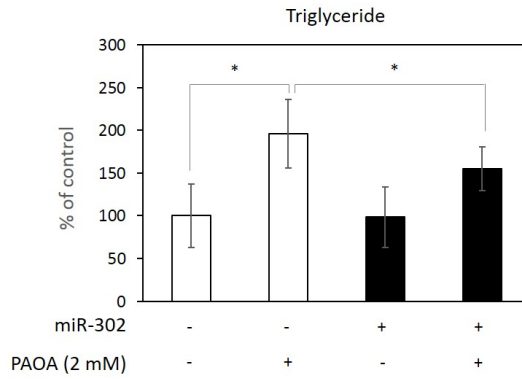


圖 9、在 miR-302 過量表現細胞株和 HepG2 細胞株分別給予 PAOA 2 mM 處理 24 小時後，分析細胞內 TG 的表現量。

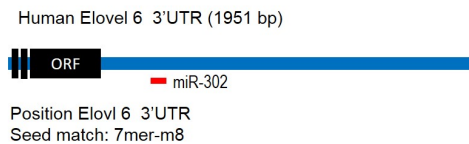


圖 10、使用 TargetScan 線上資料庫進行 miR-302 靶向基因，結果發現 miR-302 靶向 ELOVL6 基因 3'UTR。

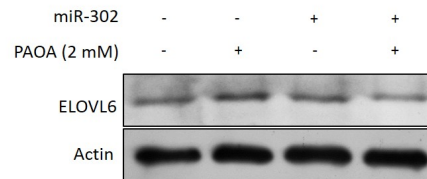


圖 11、在 miR-302 過量表現細胞株和 HepG2 細胞株分別給予 PAOA 2 mM 處理 24 小時後收集細胞內蛋白，使用 western blotting 分析細胞內 ELOVL6 表現及量化數值，並且依據 β -actin 為參考值進行標準化。

結果討論：

(一) 透過 miR-302 大量表現是否能夠減緩 PAOA 在肝臟細胞株中誘導脂肪累積

以上實驗結果中可以得知，在螢光顯微鏡觀察下可以看到確實透過 Lipofectamine™ 2000 Reagent 把 miR-302 plasmid 轉入肝癌細胞株之 HepG2 大量表現紅色螢光，同時透過 RT-PCR 分析幹細胞之相關 mRNA 的表現，幹細胞功能的主要調控因子 Nanog 和 Oct 表現量明顯增加，顯示 miR-302 確實能夠誘發 iPSCs 的生成。

在 miR-302 大量表現的細胞模式之下，首先使用 oil red O staining 染色分析細胞內脂肪合成現象，量化圖中可以明確看到在加入 PAOA 的 HepG2 細胞株和 miR-302 過量表現細胞株中有脂肪堆積的現象，表示 PAOA 確實

能夠誘發脂肪變性的模型，而 miR-302 過量表現細胞株相較之下則有減緩脂肪堆積的現象。

(二) 分析透過 miR-302 大量表現是否能夠減緩 ROS 的產生及粒線體功能損傷

實驗中使用了 DCFH-DA 染劑與 JC-1 染劑分別分析了細胞內 ROS 的表現與粒線體膜電位去極化的功能。圖中可以觀察到 HepG2 細胞株加入 PAOA 後明顯增加 ROS 的表現量，同時 PAOA 也導致粒線體功能損傷的現象，而 miR-302 過量表現細胞株相較之下則有減緩 ROS 的產生與保護粒線體功能的現象。

利用以上實驗條件收集細胞蛋白，使用 western blotting 分析消除 ROS 酵素脂 SOD1 的表現，圖中可以觀察到 HepG2 細胞株中的 SOD1 表現明顯減少，可以推論加入 PAOA 誘導脂肪堆積會間接影響到消除 ROS 酵素脂 SOD1，進而產生較多的 ROS。

(三) 探討 miR-302 是否透過 AMPK/ACC 路徑減少脂質堆積

使用 MTT assay 分析 HepG2 細胞株和 miR-302 過量表現細胞株之細胞存活率。量化圖中可以觀察到加入 PAOA 誘導堆積後細胞存活率明顯下降，而 miR-302 過量表現細胞株則有效提升了細胞存活率。

使用 western blotting 分析細胞內蛋白表現，HepG2 細胞株與 miR-302 過量表現細胞株在加入 PAOA 誘導堆積後，細胞內 pThr¹⁷²-AMPK、AMPK、pSer⁷⁹-ACC 和 ACC 的表現並無明顯差別，由此可推斷 miR-302 並非透過 AMPK/ACC 的常見脂肪合成路徑減少脂質堆積。

(四) 分析 miR-302 透過靶向 Elovl6 減緩脂肪堆積的現象

在 miR-302 過量表現細胞株和 HepG2 細胞株分別給予 PAOA 2 mM 處理 24 小時後，分析細胞內 TG 的表現量，在量化圖中可以觀察到 miR-302 過量表現確實能夠減少 PAOA 所誘導的脂肪堆積。

使用 TargetScan 線上資料庫進行 miR-302 靶向基因，結果發現 miR-302 靶向 Elovl6 基因 3'UTR，同時使用 western blotting 分析細胞內 Elovl6 蛋白表現，驗證了 miR-302 確實透過靶向 Elovl6 基因而減緩了 PAOA 所誘導的脂肪堆積。

六、 結論

本研究發現在肝臟脂肪變性的細胞模式中，miR-302 能夠減緩 PAOA 所誘發的氧化傷害和粒線體功能失調，進而減緩脂肪肝的形成。在過去研究證實，脂肪合成路徑主要透過抑制 AMPK 來活化 ACC 而增加細胞內脂肪合成，然而除了透過此常見路徑調控脂肪合成之外，也可以透過 miR-302 靶向 Elovl6 此重要調控超長鏈脂肪酸合成酶，進而減緩脂肪合成的發生。以上實驗結果，本研究推論 miR-302 在 NAFLD 疾病中扮演著影響脂肪持續累積的重要調控角色，

期望進一步找尋及篩選能夠誘發 miR-302 大量表現的天然物，期待能以營養保健的策略達到阻止疾病惡化的效果。

七、參考文獻

- Abente, E. J., Subramanian, M., Ramachandran, V., & Najafi-Shoushtari, S. H. (2015). MicroRNAs in obesity-associated disorders. *Arch Biochem Biophys*.
- Bruce, C. R. & Febbraio, M. A. (2007). It's what you do with the fat that matters! *Nat Med*, 13(10), 1137-1138.
- Day, C. P., & James, O. F. (1998). Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*, 114(4), 842-845.
- Jung, U. J., & Choi, M. S. (2014). Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int j Mol Sci*, 15(4):6184-6223.
- Kelley, K., & Lin, S. L. (2012). Induction of somatic cell reprogramming using the microRNA miR-302. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 111, 83-107.
- Kessler, S. M., Simon, Y., Gemperlein, K., Gianmoena, K., Cadenas, C., Zimmer, V., Kiemer, A. K. (2014). Fatty acid elongation in non-alcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci*, 15(4), 5762-5773
- Matsuzaka, T., Atsumi, A., Matsumori, R., Nie, T., Shinozaki, H., Suzuki-Kemuriyama, N., Shimano, H. (2012). Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 56(6), 2199-2208.
- Meiler, S., Baumer, Y., Toulmin, E., Seng, K., & Biosvert, W. A. (2015). MicroRNA 302a is a novel modulator of cholesterol homeostasis and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35(2), 323-331.
- Perry, R. J., Samuel, V. T., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2014). The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 510(7503), 84-91.