

饮食诱导肥胖雌鼠棕色脂肪组织蛋白质组学分析

梁中昊¹, 庄向华^{1,2}, 黄珊¹, 韩晓琳¹, 华梦羽¹, 琚丽萍^{1,2}, 陈诗鸿^{1,2}

(1.山东大学第二医院内分泌代谢科, 山东 济南 250033; 2.山东大学第二医院肾脏多学科创新医学中心, 山东 济南 250033)

摘要: **目的** 探讨高脂饮食 (high-fat diet, HFD) 对雌性小鼠棕色脂肪蛋白组学的影响。 **方法** 构建高脂饮食诱导的肥胖雌鼠模型。对照组 (CON 组) 小鼠给予普通饮食, 实验组 (HFD 组) 小鼠给予高脂饮食, 均喂养 21 周, 每周记录小鼠体质量, 使用小动物体脂分析仪测量身体成分, 通过经腹葡萄糖耐量试验 (intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT) 和胰岛素耐量试验 (insulin tolerance test, ITT) 评估小鼠葡萄糖耐量和胰岛素耐量。处死小鼠后迅速收集棕色脂肪 (brown adipose tissue, BAT) 标本于液氮中, 后续进行液相色谱-串联质谱检测 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS) 及蛋白质组学数据分析 ($n=4$)。 **结果** 与 CON 组相比, HFD 组小鼠体质量增加, 体脂含量增加, 糖耐量和胰岛素耐量受损。蛋白质组学分析以差异倍数 (fold change, FC) >1.5 或 <0.67 , 且 $P < 0.05$ 为标准筛选差异蛋白, 聚类分析热图结果显示, HFD 小鼠 Ucp1 水平升高, 蛋白免疫印迹 (Western blotting, WB) 结果显示, HFD 小鼠棕色脂肪中 Ucp1 水平更高; 亚细胞定位分析表明线粒体是含有差异蛋白数目最多的细胞器; 基因本体 (gene ontology, GO) 功能和京都基因和基因组数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析显示: 与 CON 组相比, HFD 组下调蛋白主要与肌肉收缩有关, 涉及钙信号通路等, 而上调蛋白主要与脂质分解代谢有关, 涉及脂质氧化过程以及产热、氧化磷酸化等通路; 蛋白质相互作用分析提示网络中心蛋白主要与脂质合成、脂肪酸 β 氧化有关。 **结论** 肥胖状态下, 雌鼠 BAT 产热通路激活, 并伴有脂肪酸 β 氧化增强和脂肪合成减弱。

关键词: 饮食诱导肥胖; 棕色脂肪; 产热; 蛋白质组学

中图分类号: R589.2

文献标志码: A

Proteomic analysis of brown adipose tissue in diet-induced obese female mice

LIANG Zhonghao¹, ZHUANG Xianghua^{1,2}, HUANG Shan¹, HAN Xiaolin¹,

HUA Mengyu¹, JU Liping^{1,2}, CHEN Shihong^{1,2}

(1. Department of Endocrinology and Metabolism, The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, Shandong, China;

2. Multidisciplinary Innovation Center for Nephrology of the Second Hospital of Shandong University,

Jinan 250033, Shandong, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of high-fat diet (HFD) on the proteomics of brown adipose tissue (BAT) in female mice. **Methods** The obese mice models were established with HFD (HFD group). Mice in the control group were fed with normal diet, while those in the experimental group were fed with HFD. Both groups were fed for 21 weeks and body weight were detected weekly. Body composition was measured with small animal body composition analyzer. The glucose tolerance and insulin tolerance were measured with intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) and insulin tolerance test (ITT) respectively. After the mice were sacrificed, BAT was quickly collected into liquid nitrogen, and then 4 samples from either group were analyzed with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS) and proteomics. **Results** Compared with the control group, the HFD group had significantly increased body weight and fat content, but impaired glucose tolerance and insulin tolerance. Differential proteins were screened with $FC > 1.5$ or < 0.67 and $P < 0.05$. Cluster heatmap revealed an increased Ucp1 level in HFD mice, and Western blot-

收稿日期: 2024-01-22

基金项目: 国家自然科学基金 (81900774); 山东省自然科学基金联合基金 (ZR2021LSW016)

通信作者: 陈诗鸿。E-mail: chenshihong@sdu.edu.cn

琚丽萍。E-mail: 201862018079@email.sdu.edu.cn

ting further confirmed higher Ucp1 expression in HFD mice. Subcellular localization analysis indicated that mitochondria were the organelles containing the largest number of differential proteins. Gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses showed that the down-regulated proteins in the HFD group were mainly involved with muscle contraction and calcium signaling pathway, while the up-regulated proteins with lipid catabolism, lipid oxidation process, thermogenesis, oxidative phosphorylation and other pathways. Protein interaction analysis suggested that the central proteins of the network were associated with lipid synthesis and fatty acid β oxidation.

Conclusion The thermogenic pathway of BAT was enhanced in obese female mice, accompanied with increased oxidation of fatty acid β and decreased fat synthesis.

Key words: Diet-induced obesity; Brown adipose tissue; Thermogenesis; Proteomics

研究表明,肥胖是一种因能量摄入与能量消耗不平衡而导致脂肪积聚的疾病,可增加患 2 型糖尿病、心血管疾病和代谢综合征的风险^[1-4]。组织学上,脂肪组织主要有 3 种类型:白色脂肪组织(white adipose tissue, WAT),占脂肪量的 95% 以上;棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT),占脂肪量的 1% 到 2%,以及介于 WAT 和 BAT 之间的米色脂肪^[5]。WAT 以甘油三酯的形式储存多余的能量,而富含线粒体的 BAT 主要是以非寒颤产热的方式消耗能量,在调节能量平衡中发挥重要作用。在小鼠中,BAT 主要位于肩胛部,既往正电子发射断层扫描-计算机断层扫描(positron emission tomography, PET-CT)成像研究表明 BAT 也存在于成年人体中^[6-8]。BAT 的产热活性主要依赖于其特异性解偶联蛋白 1 (Ucp1),这是一种线粒体内膜蛋白,可通过解偶联氧化磷酸化将能量作为热量消散^[9]。近年来也有 Ucp1 非依赖性产热的相关报道,如 Ca^{2+} 循环产热作用和肌酸循环^[10-11]。既往研究表明,生理状态下雌鼠较雄鼠具有更高的产热活性,更强的线粒体呼吸和磷酸化能力^[12-15]。但在代谢应激状态下,雌鼠 BAT 的产热活性及相关作用机制尚不明确。本研究选择使用高脂饮食 (high-fat diet, HFD) 诱导的肥胖雌鼠进行蛋白组学研究,以期阐明肥胖状态下雌鼠棕色脂肪的作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

5 周龄 C57BL/6 雌性小鼠(北京唯尚立德生物科技有限公司)适应性喂养 1 周后,在满足实验动物 3R 原则和统计学的前提下,将小鼠随机分为 2 组,每组 8 只,分别为对照组(control, CON 组,北京科澳协力有限公司)和实验组(HFD 组,TP23520 中国南通特洛菲饲料科技有限公司)喂养 21 周,每周

记录小鼠体质量。本研究动物实验方案已获得山东大学第二医院伦理委员会批准(批准号: KYLL-2019[KJ]A-0035)。

1.1.2 主要试剂与仪器

小鼠体脂分析仪 minispec LF90(德国 Bruker 公司),组织研磨仪(杭州奥盛仪器有限公司),蛋白质定量试剂盒(bicinchoninic acid protein assay kit, BCA)购自美国 Bio-Rad 公司。Ucp1(解偶联蛋白 1)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号: 14670),Hsp90(热休克蛋白 90)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号:4877),蛋白裂解缓冲液(radio-immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA)购自上海碧云天生物技术有限公司。4D-label-free 蛋白质组学分析使用 timsTOF Pro 质谱仪和 Easy nLC 液相色谱仪。

1.2 方法

1.2.1 体脂分析

在小鼠 26 周龄时使用小鼠体脂分析仪(minispec LF90 德国 Bruker 公司)评估身体成分,测量脂肪和瘦体质量水平。

1.2.2 经腹葡萄糖耐量试验(intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT)

在小鼠 25 周龄行 IPGTT 实验。实验前更换垫料,小鼠正常饮水。隔夜禁食 12 h 后,给小鼠腹腔注射葡萄糖(2 g/kg),分别在 0、15、30、60、90、120 min 时检测血糖。

1.2.3 胰岛素耐量试验(insulin tolerance test, ITT)

在小鼠 26 周龄行 ITT 实验。实验前更换垫料,小鼠正常饮水。禁食 6 h 后,给小鼠腹腔注射胰岛素(0.5 U/kg),分别在 0、15、30、60、90、120 min 时检测血糖。

1.2.4 蛋白免疫印迹(Western blotting, WB)

称取适量棕色脂肪组织加入蛋白裂解缓冲液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂于组织研磨仪充分研磨样本,BCA 法测量蛋白浓度,电泳、转膜、封闭、显

影后分析棕色脂肪中 Ucp1 蛋白表达水平。

1.2.5 样本提取与分析

动物用戊巴比妥麻醉后经颈椎脱臼处死,迅速收集肩背部棕色脂肪组织,生理盐水冲洗血迹后放入液氮冷冻,随后储存于 -80°C 。采用SDT裂解法提蛋白,BCA法进行蛋白定量,之后FASP酶解法胰蛋白酶消化样品。每份样品采用纳升流速的HPLC液相系统 Easy nLC 进行分离。样品经色谱分离后用 timsTOF Pro 质谱仪进行质谱分析,具体操作方法参照文献[16-17]。采用亚细胞结构预测软件 CELLO 对差异蛋白质进行亚细胞定位分析,采用 Blast2Go(<http://www.blast2go.com/>) 软件对差异蛋白质进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能注释,通过京都基因和基因组数据库 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 对差异蛋白注释,蛋白-蛋白相互作用 (protein protein interaction, PPI) 网络由 CytoScape 软件绘制。

1.3 统计学处理

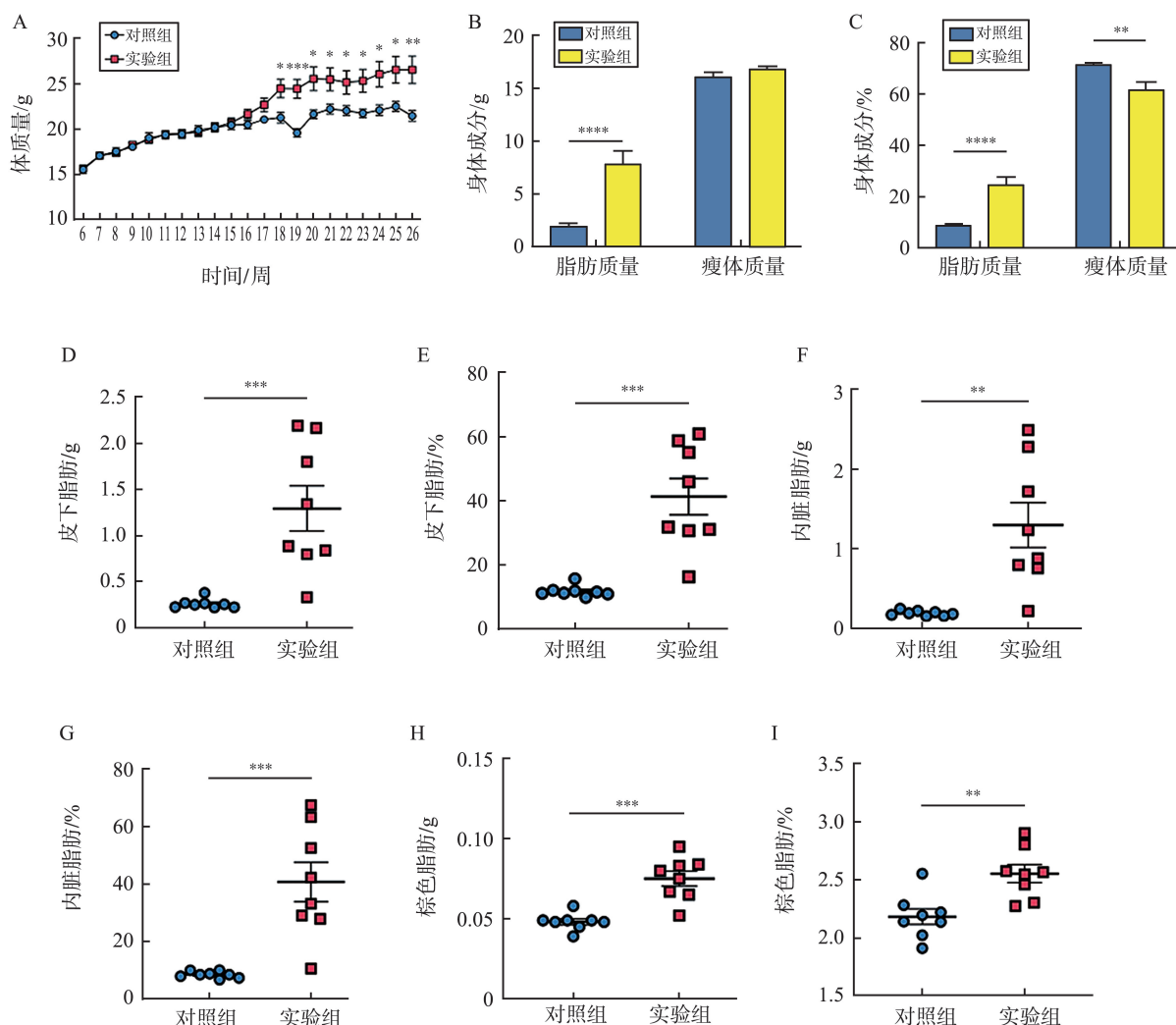
采用 GraphPad Prism 9.0 软件和 R 软件。两组

比较采用 t 检验,IPGTT 和 ITT 实验采用重复测量方差分析。蛋白组学以差异倍数 (FC) 上调 >1.5 倍或下调 <0.67 倍, $P<0.05$ 为标准筛选差异蛋白,蛋白质在 GO 分析或 KEGG 通路中的显著性水平通过 Fisher 精确检验进行评估, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HFD 导致小鼠肥胖、糖耐量和胰岛素耐受量受损

HFD 小鼠的体质量显著高于 CON 小鼠 (图 1A)。体脂分析表明, HFD 组小鼠脂肪含量显著增加 (图 1B~C), 且皮下脂肪 (subcutaneous inguinal white adipose tissue, iWAT)、内脏脂肪 (epididymal white adipose tissue, eWAT)、棕色脂肪 (BAT) 含量显著增加 (图 1D~I)。IPGTT 和 ITT 实验表明, 肥胖小鼠的葡萄糖耐量和胰岛素耐量均明显受损 (图 1J~M)。见图 1。



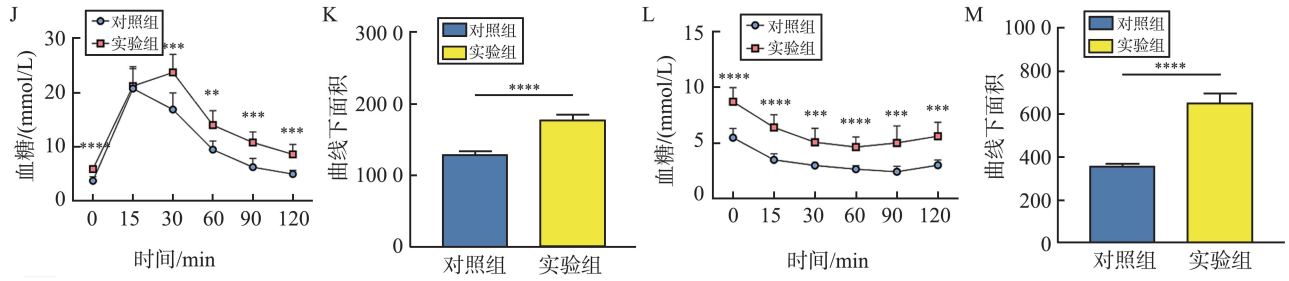


图1 HFD 导致小鼠肥胖、糖耐量和胰岛素耐受受损

A: 体质量变化; B: 脂肪和瘦体质量; C: 脂肪和瘦体质量百分比; D: 皮下脂肪质量; E: 皮下脂肪百分比; F: 内脏脂肪质量; G: 内脏脂肪百分比; H: 棕色脂肪质量; I: 棕色脂肪百分比; J: 经腹葡萄糖耐量曲线; K: 经腹葡萄糖耐量曲线下面积; L: 胰岛素耐受曲线; M: 胰岛素耐受曲线下面积 ($*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ vs 对照组)。

Figure 1 HFD induced obesity, impaired glucose tolerance and insulin tolerance in mice

A: The change of body weight; B: The composition of fat mass and lean mass; C: The percentage of fat mass and lean mass; D: The weight of subcutaneous inguinal white adipose tissue (iWAT); E: The percentage of subcutaneous inguinal white adipose tissue (iWAT); F: The weight of epididymal white adipose tissue (eWAT); G: The percentage of epididymal white adipose tissue (eWAT); H: The weight of brown adipose tissue (BAT); I: The percentage of brown adipose tissue (BAT); J: Curve of intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT); K: Area under curve of IPGTT; L: Curve of insulin tolerance test (ITT); M: Area under curve of ITT ($*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$ vs control groups).

2.2 蛋白质组学分析

2.2.1 差异蛋白定量统计、亚细胞定位、聚类分析

HFD 组与 CON 组发生明显变化的代表性蛋白见表 1。蛋白组学分析表明,在正常体质量小鼠 ($n=4$) 和肥胖小鼠 ($n=4$) 的棕色脂肪组织中共鉴定出 4 179 个蛋白,其中有 450 个差异蛋白,与 CON 组相比,HFD 组有 226 个蛋白上调,224 个蛋白下调 (图 2A)。层次聚类的结果如图 2B 所示。蛋白免

疫印迹的结果表明,Ucp1 在 HFD 组小鼠的棕色脂肪中水平升高,这与层次聚类的结果一致 (图 2C)。差异蛋白的亚细胞定位分析表明,有 146 个位于细胞质中,95 个位于质膜中,140 个位于细胞核中,97 个位于线粒体中,76 个位于细胞外,11 个位于溶酶体中,3 个位于过氧化物酶体中,3 个位于内质网中,3 个位于细胞骨架中,提示线粒体是差异蛋白数目最多的细胞器 (图 2D)。

表 1 HFD 组和 CON 组发生显著变化的代表性蛋白

Table 1 Representative proteins that were significantly different in HFD and control groups

| 蛋白 | 蛋白名称 | 基因名称 | 差异倍数 | P |
|--------|--|----------|-------|--------|
| Q8BVZ1 | Perilipin-5 | Plin5 | 3.968 | <0.001 |
| Q8BWN8 | Peroxisomal succinyl-coenzyme A thioesterase | Acot4 | 2.885 | <0.001 |
| P56198 | Cell death activator CIDE-3 | Cidec | 2.770 | <0.001 |
| Q922G0 | Solute carrier family 25 member 36 | Slc25a36 | 2.750 | 0.002 |
| Q9CQ91 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 3 | Ndufa3 | 2.692 | 0.019 |
| P00397 | Cytochrome c oxidase subunit 1 | Mtco1 | 2.597 | 0.012 |
| O35459 | Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial | Ech1 | 2.457 | <0.001 |
| O35678 | Monoglyceride lipase | Mgl1 | 2.135 | 7.096 |
| P12242 | Mitochondrial brown fat uncoupling protein 1 | Ucp1 | 2.076 | 2.988 |
| Q9QYR9 | Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial | Acot2 | 2.045 | 0.001 |
| Q9CPX8 | Cytochrome b-c1 complex subunit 10 | Uqcr11 | 1.997 | 0.023 |
| Q99J39 | Malonyl-CoA decarboxylase, mitochondrial | Mlycd | 1.973 | <0.001 |
| O70579 | Peroxisomal membrane protein PMP34 | Slc25a17 | 1.920 | <0.001 |
| P11930 | Acyl-coenzyme A diphosphatase NUDT19 | Nudt19 | 1.917 | 0.001 |
| Q9WV68 | Peroxisomal 2,4-dienoyl-CoA reductase [(3E)-enoyl-CoA-producing] | Decr2 | 1.852 | 0.004 |
| Q8R0Y8 | Mitochondrial coenzyme A transporter SLC25A42 | Slc25a42 | 1.845 | 3.165 |
| O35488 | Very long-chain acyl-CoA synthetase | Slc27a2 | 1.824 | <0.001 |
| P97742 | Carnitine O-palmitoyltransferase 1, liver isoform | Cpt1a | 1.824 | <0.001 |
| Q9DBM2 | Peroxisomal bifunctional enzyme | Ehhadh | 1.735 | 0.001 |
| Q61285 | ATP-binding cassette sub-family D member 2 | Abcd2 | 1.725 | <0.001 |
| P11404 | Fatty acid-binding protein, heart | Fabp3 | 1.716 | 0.002 |
| P03911 | NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4 | Mtnd4 | 1.668 | 0.002 |
| Q8VHQ9 | Acyl-coenzyme A thioesterase 11 | Acot11 | 1.636 | <0.001 |

续表

| 蛋白 | 蛋白名称 | 基因名称 | 差异倍数 | P |
|--------|--|----------|-------|--------|
| O88587 | Catechol O-methyltransferase | Comt | 1.604 | 0.017 |
| P51660 | Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 | Hsd17b4 | 1.601 | <0.001 |
| P03893 | NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2 | Mtnd2 | 1.585 | 0.007 |
| Q8BJ03 | Cytochrome c oxidase assembly protein COX15 homolog | Cox15 | 1.556 | 0.003 |
| P03899 | NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3 | Mtnd3 | 1.535 | 0.010 |
| P03921 | NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5 | Mtnd5 | 1.529 | 0.002 |
| P00848 | ATP synthase subunit a | Mtatp6 | 1.519 | 0.005 |
| Q9Z2Z6 | Mitochondrial carnitine/acylcarnitine carrier protein | Slc25a20 | 1.504 | <0.001 |
| Q5SWU9 | Acetyl-CoA carboxylase 1 | Acaca | 0.660 | 0.017 |
| P48453 | Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit beta isoform | Ppp3cb | 0.621 | 0.027 |
| Q02789 | Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1S | Cacna1s | 0.556 | 0.009 |
| Q9QXG4 | Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic | Acsc2 | 0.494 | <0.001 |
| Q91V92 | ATP-citrate synthase | Acly | 0.449 | 0.001 |
| P51830 | Adenylate cyclase type 9 | Adcy9 | 0.419 | 0.004 |
| P13516 | Acyl-CoA desaturase 1 | Scd1 | 0.407 | 0.002 |
| O09165 | Calsequestrin-1 | Casq1 | 0.356 | 0.027 |
| Q8R429 | Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 | Atp2a1 | 0.343 | 0.042 |
| P68181 | cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta | Prkacb | 0.218 | 0.007 |
| O09161 | Calsequestrin-2 | Casq2 | 0.184 | <0.001 |

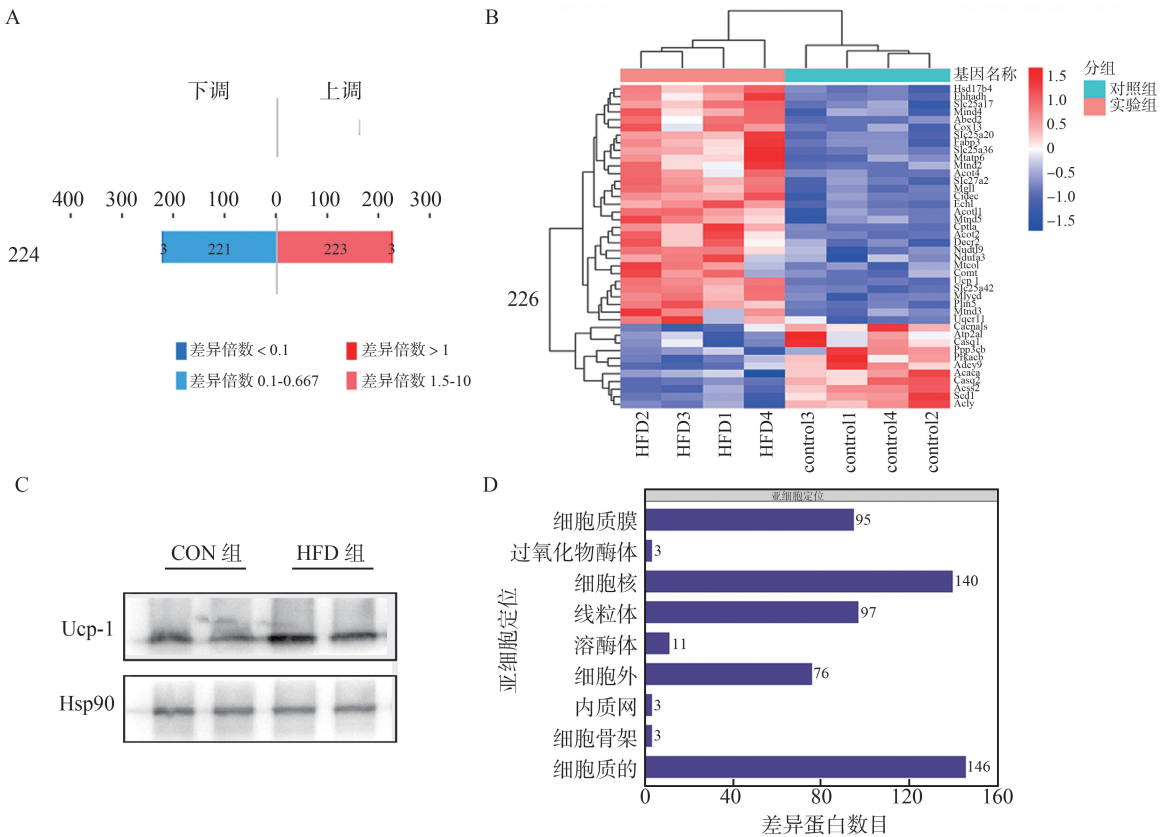


图2 差异蛋白定量分析、聚类分析、WB、亚细胞定位

A: 差异蛋白定量分析; B: 差异蛋白聚类分析; C: Ucp1 蛋白的表达; D: 差异蛋白亚细胞定位。

Figure 2 Differential protein quantitative analysis, subcellular localization, and cluster analysis

A: Quantitative analysis of differential proteins; B: Cluster analysis of differential proteins; C: The expression level of Ucp1; D: Subcellular localization of differential proteins.

2.2.2.2 差异蛋白 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

通过 GO 和 KEGG 富集分析比较 CON 组和 HFD 组 BAT 中差异蛋白的生物学特征以及代谢通

路变化,GO 功能注释主要分为生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cell component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 3 大类。对表达上调

的差异蛋白进行 GO 富集分析,发现在 BP 中,上调蛋白主要与细胞脂质代谢 (cellular lipid metabolic process)、脂质分解代谢 (lipid catabolic process)、脂质氧化 (lipid oxidation) 等有关;在 CC 中,上调蛋白与膜成分 (component of membrane)、过氧化物酶体 (peroxisome)、线粒体 (mitochondrion) 有关;在 MF 中主要与跨膜转运蛋白活性 (transporter activity) 有关 (图 3A)。基于 KEGG 富集分析,上调蛋白主要富集在过氧化物酶体 (peroxisome)、甘油脂代谢 (glycerolipid metabolism)、PPAR 信号通路 (PPAR signaling pathway)、氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation)、产热 (thermogenesis) 等通路 (图 3B), 这表明肥胖状态下雌鼠 BAT 中的脂肪酸 β 氧化和产热功能可能是增强的。接着,对表达下调的差异蛋白进行 GO 富集分析,发现:HFD 组中的下调蛋白在生物过程 (BP) 中主要与肌肉收缩相关,如横纹肌

收缩 (striated muscle contraction)、肌肉收缩 (muscle contraction)、骨骼肌收缩 (skeletal muscle contraction) 等;在 CC 中主要与肌浆网 (sarcoplasmic reticulum)、肌质 (sarcoplasm)、肌原纤维 (myofibril) 等肌肉结构相关;在分子功能 (MF) 中主要与磷酸化酶活性 (phosphorylase activity) 有关 (图 3C)。既往研究报道,棕色脂肪与骨骼肌具有相同的发育起源,均源自表达生肌因子 5 (Myf5) 的成肌前体细胞^[18-19],肌肉收缩相关通路的改变提示高脂饮食可能重塑了雌鼠棕色脂肪细胞的发育进程。基于 KEGG 富集分析,这些下调蛋白还与胰高血糖素信号通路 (glucagon signaling pathway)、钙信号通路 (calcium signaling pathway) 等通路相关 (图 3D)。这表明肥胖状态下雌鼠 BAT 中的胰高血糖素信号通路和钙信号通路可能是受损的。见图 3。

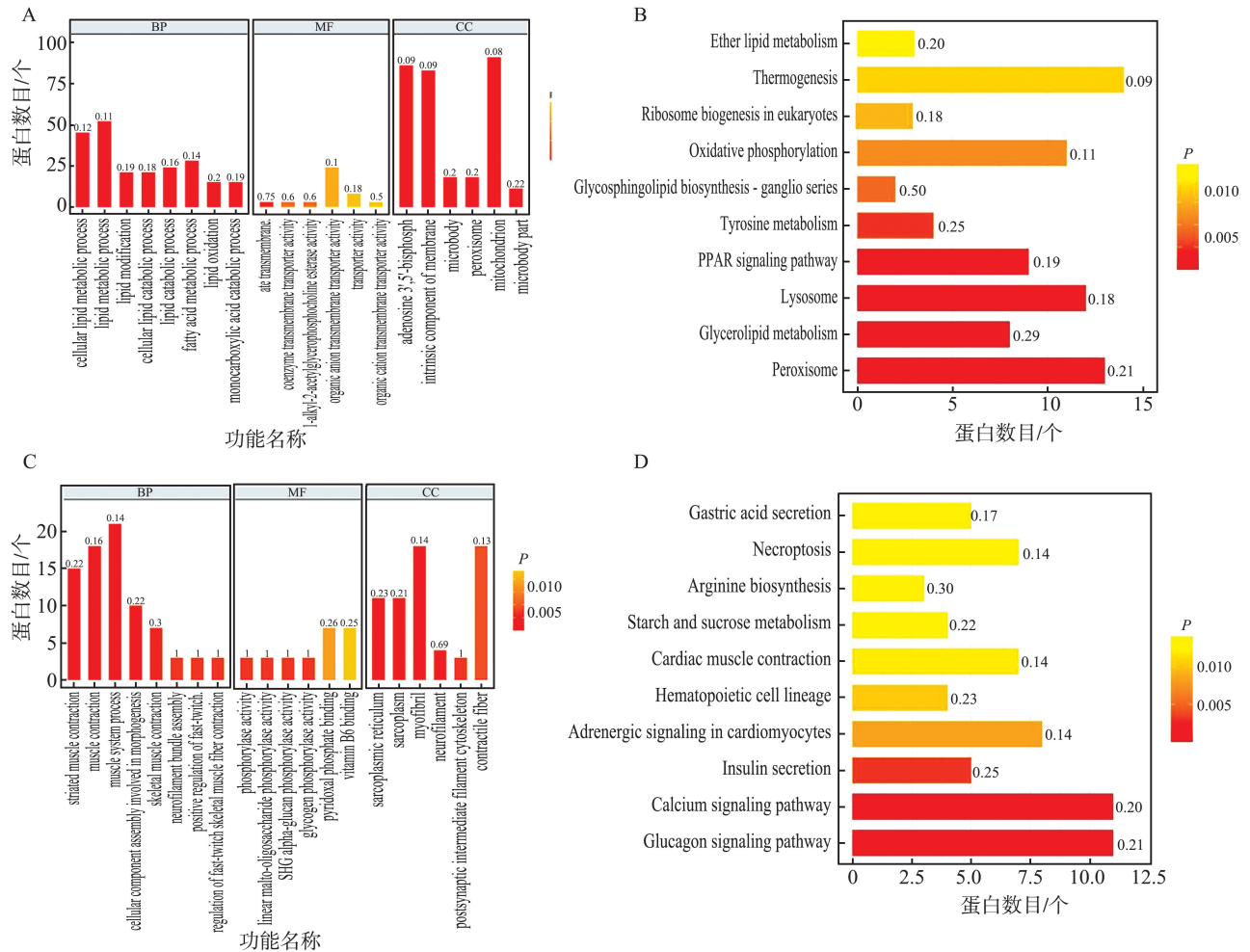


图 3 差异蛋白 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

A: 上调差异蛋白 GO 富集分析; B: 上调差异蛋白 KEGG 通路富集分析; C: 下调差异蛋白 GO 富集分析; D: 下调差异蛋白 KEGG 通路富集分析。

Figure 3 Differential protein GO enrichment and KEGG pathway enrichment

A: Up-regulated differential protein GO enrichment analysis; B: Enrichment analysis of upregulated differential protein KEGG pathway; C: Down-regulated differential protein GO enrichment analysis; D: Enrichment analysis of down-regulated differential protein KEGG pathway.

2.2.3 蛋白互作网络分析

为进一步明确两组差异蛋白的功能,通过检索相互作用基因/蛋白质的搜索工具(search tool for the retrieval of interacting genes/proteins, STRING)数据库的蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络分析其相互作用关系。在蛋白互作网络中,与网络外周蛋白相比,网络中心蛋白发生变化时整个系统受到的扰动最大,在维持系统平衡和稳定中发挥关键作用。结果表明,网络中心蛋白主要与脂质形成密切相关,如酰基辅酶 A 去饱和酶 1 (Acly)、乙酰辅酶 A 合成酶(Acss2)、酰基辅酶 A 去饱和酶 1(Scd1)和乙酰辅酶 a 羧化酶(Acaca);同时也与

脂肪酸 β 氧化有关,如过氧化物异构体双功能酶(Ehhadh)、过氧化物异构体 2 型多功能酶(Hsd17b4)、2,4-二烯酰辅酶 A 还原酶 2(Decr2)、线粒体丙二酰辅酶 a 脱羧酶(Mlycd)和线粒体烯酰辅酶 A 水合酶 1(Ech1)等;此外,肉毒碱 o-棕榈酰基转移酶 1(Cpt1a)和脂肪酸结合蛋白 3(Fabp3)分别参与酰基肉碱和脂肪酸的转运,细胞死亡活化蛋白(Cidec)、线粒体棕色脂肪解偶联蛋白 1(Ucp1)与产热作用相关。提示高脂饮食主要影响了雌鼠棕色脂肪组织的脂质合成、脂肪酸 β 氧化以及产热等功能。见图 4。

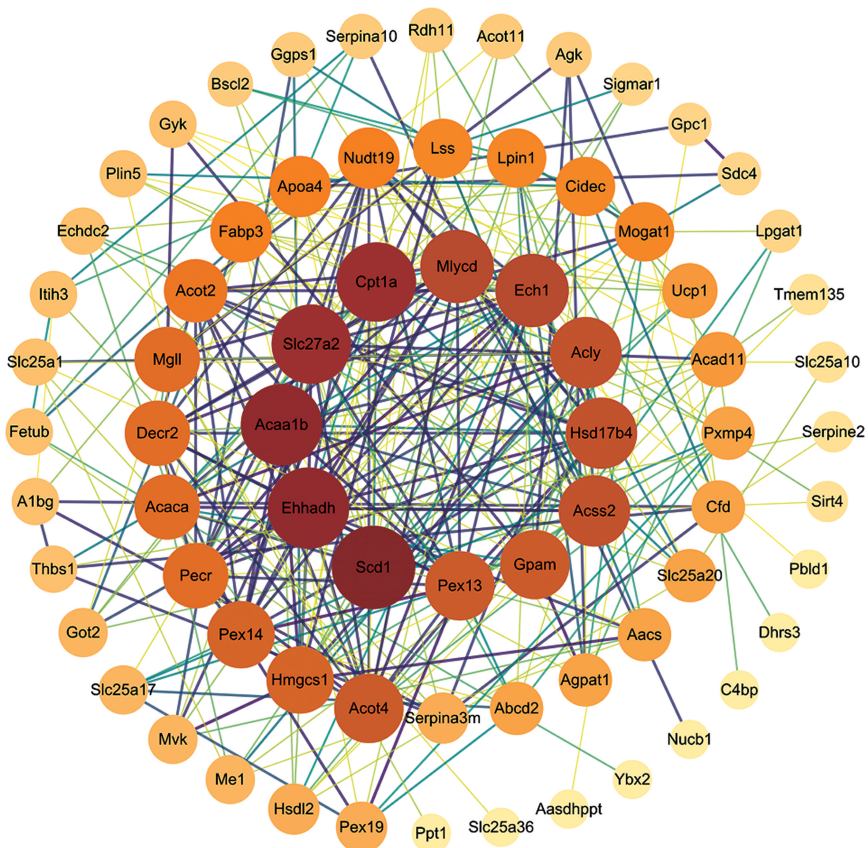


图 4 蛋白互作网络

Figure 4 Protein-protein interaction (PPI) network

3 讨论

本研究构建了高脂饮食诱导肥胖的雌鼠模型,表现为体质量和脂肪含量的增加,糖耐量和胰岛素耐量的受损以及棕色脂肪中 Ucp1 水平的升高;采用 4D-label-free 技术对 CON 组和 HFD 组雌鼠的棕色脂肪进行蛋白组学分析,并通过差异蛋白的鉴定、GO 功能和 KEGG 通路富集分析以及蛋白互作网络分析,全面评估了肥胖状态下雌鼠棕

色脂肪的功能和作用机制。

棕色脂肪细胞最典型的特征是具有丰富且代谢活跃的线粒体,线粒体通过三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA)、脂肪酸 β -氧化和电子传递链(electron transport chain, ETC)将来自葡萄糖和脂肪酸的化学能转化为三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)为机体提供能量^[20-21]。本研究亚细胞定位的结果表明线粒体是具有最多差异蛋白数目的细胞器,提示在肥胖状态下,雌鼠棕色脂肪组织中的线粒体稳态受到了显著冲击,其棕色

脂肪功能的改变可能与线粒体稳态密切相关。

既往关于棕色脂肪功能的研究多集中于雄鼠^[22-23],缺少对雌鼠的深入研究。Jingyi等^[22]对雄鼠棕色脂肪的转录组学研究表明,HFD干预4周后棕色脂肪中参与离子转运、线粒体生物生成、肌肉发育、Ca²⁺通道及其调节因子的基因显著下调,参与免疫反应、脂肪酸摄取(Fabp3)和棕色脂肪分化的基因显著上调,但是产热基因Ucp1及其相关调控基因并无明显变化。Kim等^[23]的研究表明,HFD干预20周可导致雄鼠BAT的氧化磷酸化过程受到抑制。与肥胖雄鼠的研究结果相似,本研究在肥胖雌鼠中也观察到钙信号通路和肌肉相关蛋白的显著下降,主要包括编码钙通道和调节钙离子流动的蛋白,如肌质/内质网钙ATP酶(Atp2a1)、肌钙集蛋白1(Casq1)、肌钙集蛋白2(Casq2)、蛋白磷酸酶3催化亚基β(Ppp3cb)、L-型电压依赖钙离子通道α1S亚基(Cacna1s);同时也发现脂肪酸摄取相关蛋白Fabp3水平的升高。但与肥胖雄鼠模型研究不同的是,本研究发现肥胖雌鼠的BAT中,产热、氧化磷酸化以及脂肪酸氧化相关蛋白的表达是上调的,包括产热相关基因Ucp1和Cidec,以及线粒体呼吸链氧化磷酸化相关酶细胞色素C氧化酶亚单位1(Mtco1)、ATP合酶α亚基(Mtstp6)、NADH-泛醌氧化还原酶链2(Mtnd2)、NADH-泛醌氧化还原酶链3(Mtnd3)、NADH-泛醌氧化还原酶链4(Mtnd4)、NADH-泛醌氧化还原酶链5(Mtnd5)、细胞色素c氧化酶15(Cox15)、细胞色素b-c1复合亚基10(Uqcrc11)、NADH脱氢酶[泛醌]1α亚复合亚基3(Ndufa3)。目前仅有一篇关于雌鼠BAT蛋白组学研究,但受限于双向凝胶电泳(2-DE)检测到的蛋白数目有限,该研究仅检测到一个线粒体呼吸链蛋白(即Uqcrc1)水平的升高^[24]。本研究采用4D-label-free技术,检测灵敏度和特异性相比传统的分析技术得到提升,可较为全面的评估HFD对雌鼠BAT线粒体氧化磷酸化相关蛋白的影响。

既往研究表明,经典的产热激活是通过交感神经系统(SNS)释放去甲肾上腺素(NA)发生的。其中,去甲肾上腺素是一种儿茶酚胺样神经递质,可激活细胞内腺苷酸环化酶(Adcy9)并升高环磷酸腺苷(cAMP)水平进而激活蛋白激酶A(Prkacb),进而导致脂肪分解并促进Ucp1的表达^[25]。本研究结果表明,与寒冷条件下主要依靠交感神经促进产热的机制不同,高脂饮食可导致

BAT交感神经损伤,并伴有AC、PKA蛋白水平的下降和使儿茶酚胺神经递质失活的儿茶酚O-甲基转移酶(Comt)水平相对升高。提示在肥胖雌鼠的BAT中,HFD干预可能通过其他途径激活Ucp1以激发产热效应,且其作用效力大于下调交感神经系统对Ucp1的抑制效应。同时也说明与雄鼠相比,雌鼠的棕色脂肪在应对高脂饮食中可能具有更强的抵抗力和活性。

同时,本研究还发现HFD组参与线粒体和过氧化物酶体脂肪酸β氧化过程的蛋白表达水平显著升高,如Fabp3、Hsd17b4、Decr2、Ech1、Mlycd、Ehhadh、Cpt1a、三磷酸腺苷结合盒转运蛋白2(Abcd2)、超长链酰基辅酶a合成酶(Slc27a2)、过氧化物酶体膜蛋白(Slc25a17)、线粒体辅酶a转运蛋白(Slc25a42)、溶质载体家族25成员36(Slc25a36)、酰基辅酶A二磷酸酶(Nudt19)、酰基辅酶A硫酯酶2(Acot2)、酰基辅酶A硫酯酶4(Acot4)、酰基辅酶A硫酯酶11(Acot11)、线粒体肉碱/酰基肉碱载体蛋白(Slc25a20)。其中Fabp3、Abcd2、Slc25a36、Cpt1a、Slc25a20、Slc25a17和Slc25a42属于线粒体和过氧化物酶体转运蛋白;Cpt1a是脂肪酸β氧化的关键限速酶,与Slc25a20一起,将肉碱和脂肪酸活化产物从细胞质运输到线粒体^[26-27];Fabp3编码脂肪酸结合蛋白,将脂肪酸运输到线粒体进行产热或运输到脂滴进行储存^[28];而且与脂质分解相关的围脂滴蛋白5(Plin5)、单甘油脂酶(Mgll)也显著上调,其中,Plin5是脂滴(LD)蛋白Perilipin家族的成员,增加小鼠BAT中Plin5的表达促进BAT中脂肪酸摄取、脂肪酸氧化和线粒体解偶联呼吸的增加^[29]。这表明,高脂饮食诱导的产热可能是由BAT增强的线粒体脂肪酸β氧化所驱动。此外,与轻度寒冷刺激会导致BAT中从头脂肪生成(de novo lipogenesis, DNL)基因上调不同^[30],结合蛋白相互作用网络分析,本研究发现HFD干预后,蛋白互作网络中心参与脂质合成的蛋白,如酰基辅酶A去饱和酶1(Acly)、乙酰辅酶A合成酶(Acss2)、酰基辅酶A去饱和酶1(Scd1),以及乙酰辅酶a羧化酶(Acaca)的表达均显著下降,表明肥胖状态下雌鼠BAT的脂肪合成受到抑制。而蛋白互作网络中心参与脂肪酸β氧化的蛋白[包括过氧化物异构体双功能酶(Ehhadh)、过氧化物异构体2型多功能酶(Hsd17b4)、2,4-二烯酰辅酶A还原酶2(Decr2)、线粒体丙二酰辅酶a脱羧酶(Mlycd)和线粒体烯酰辅酶A水合酶1(Ech1)、肉毒碱o-棕

桐酰基转移酶 1 (Cpt1a)、脂肪酸结合蛋白 3 (Fabp3)] 以及产热标志物 Ucp1 的表达水平均显著升高。进一步说明了高脂饮食可激活雌鼠 BAT 的脂肪酸 β 氧化和产热功能。提示在肥胖状态下,雌鼠 BAT 脂肪合成减弱,脂肪酸 β 氧化增强并伴有产热增加。

研究表明,尽管饮食干预上调了雄性大鼠 BAT 中产热相关蛋白的表达,但是不能防止其体质量的增加^[31]。另有研究也指出,饮食诱导的 Ucp1 表达上调并不能用于防止肥胖,只有同时实现 Ucp1 的持续激活,才有可能预防肥胖的发生^[32]。本研究在高脂饮食诱导肥胖的雌鼠 BAT 中发现产热相关蛋白水平升高,同时 HFD 组雌鼠出现体质量增加、脂肪含量升高。因此,单纯产热蛋白的表达升高可能不足以抵消能量摄入增加所导致的肥胖。本课题后续将在整体水平探讨肥胖雌鼠的能量代谢变化,以期进一步明确饮食诱导产热增加与其整体能量代谢水平的关系。因此,在以产热途径为靶点的肥胖相关药物研究中,不仅要关注 Ucp1 的总量,也要明确 Ucp1 是否被持续激活以及产热对整体能量代谢的影响。

综上所述,本研究通过构建 HFD 诱导的肥胖雌鼠模型,并对其 BAT 进行蛋白组学分析,发现在肥胖雌鼠的 BAT 中,参与产热、氧化磷酸化、脂质分解、脂肪酸 β 氧化相关的蛋白上调,且参与钙信号通路、肌肉结构、肌肉收缩、脂质合成相关的蛋白表达下调。提示肥胖雌鼠的 BAT 产热通路激活,并伴有脂肪酸 β 氧化增强和脂肪合成减弱。本研究系统评估了肥胖状态下雌鼠棕色脂肪的作用及相关机制,为全面阐明肥胖的病理生理学机制奠定了基础。

参考文献:

[1] GBD 2015 Obesity Collaborators. Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(1): 13-27.

[2] Lin X, Li H. Obesity: epidemiology, pathophysiology, and therapeutics [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 706978. doi: 10.3389/fendo.2021.706978.

[3] Martin SS, Aday AW, Almarzooq ZI, et al. 2024 Heart disease and stroke statistics: A Report of US and Global Data From the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2024. doi: 10.1161/CIR.0000000000001209.

[4] 张淑洁, 何云, 张思奇, 等. 肥胖高血压患者血压变异性的研究进展[J]. *中华高血压杂志*, 2020, 28(6):

580-586.

[5] Ronald CK, Guoxiao W, Kevin YL. Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(10): 3990-4000.

[6] Ong FJ, Ahmed BA, Oreskovich SM, et al. Recent advances in the detection of brown adipose tissue in adult humans: a review [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(10): 1039-1054.

[7] Jurado-Fasoli L, Sanchez-Delgado G, Alcantara JMA, et al. Adults with metabolically healthy overweight or obesity present more brown adipose tissue and higher thermogenesis than their metabolically unhealthy counterparts [J]. *EBioMedicine*, 2024, 100: 104948. doi: 10.1016/j.ebiom.2023.104968.

[8] Brahmabhatt P, Ataei F, Parent EE, et al. Atypically intense pharmacologically induced brown fat activation on FDG PET/CT [J]. *Clin Nucl Med*, 2023, 48(3): 233-236.

[9] Cani PD, Van Hul M. Gut microbiota in overweight and obesity: crosstalk with adipose tissue [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023. doi: 10.1038/s41575-023-00867-z.

[10] Ikeda K, Kang Q, Yoneshiro T, et al. UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis [J]. *Nat Med*, 2017, 23(12): 1454-1465.

[11] Kazak L, Chouchani ET, Jedrychowski MP, et al. A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat [J]. *Cell*, 2015, 163(3): 643-655.

[12] Gómez-García I, Trepiana J, Fernández-Quintela A, et al. Sexual dimorphism in brown adipose tissue activation and white adipose tissue browning [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8250. doi: 10.3390/ijms23158250.

[13] Patel S, Sparman NZR, Arneson D, et al. Mammary duct luminal epithelium controls adipocyte thermogenic programme [J]. *Nature*, 2023, 620(7972): 192-199.

[14] Mauvais-Jarvis F. Sex differences in energy metabolism: Natural selection, mechanisms and consequences [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2024, 20(1): 56-69.

[15] Maric I, Krieger JP, van der Velden P, et al. Sex and species differences in the development of diet-induced obesity and metabolic disturbances in rodents [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 828522. doi: 10.3389/fnut.2022.828522.

[16] Wang C, Jiang S, Cheng J, et al. Deciphering the difference of casein fraction in human milk associated with infant gender using quantitative proteomics [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 247: 125796. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125796.

- [17] 李雁儒, 李娟, 李培龙, 等. 胰腺癌不同进展期血清外泌体蛋白组学分析[J]. 山东大学学报(医学版), 2022, 60(10): 33-41.
LI Yanru, LI Juan, LI Peilong, et al. Proteomic analysis of serum exosomes in pancreatic cancer with different stages of progress [J]. Journal of Shandong University (Health Sciences), 2022, 60(10): 33-41.
- [18] Seale P, Bjork B, Yang W, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch[J]. Nature, 2008, 454(7207): 961-967.
- [19] Li F, Jing J, Movahed M, et al. Epigenetic interaction between UTX and DNMT1 regulates diet-induced myogenic remodeling in brown fat[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 6838. doi: 10.1038/s41467-021-27141-7.
- [20] Kyriazis ID, Vassi E, Alvanou M, et al. The impact of diet upon mitochondrial physiology[J]. Int J Mol Med, 2022, 50(5): 135.
- [21] Takeda Y, Harada Y, Yoshikawa T, et al. Mitochondrial energy metabolism in the regulation of thermogenic brown fats and human metabolic diseases[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(2): 1352. doi: 10.3390/ijms24021352.
- [22] Jingyi C, Qi Z, Lin L, et al. Global transcriptome analysis of brown adipose tissue of diet-induced obese mice [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): 1095. doi: 10.3390/ijms19041095.
- [23] Kim HS, Ryoo ZY, Choi SU, et al. Gene expression profiles reveal effect of a high-fat diet on the development of white and brown adipose tissues [J]. Gene, 2015, 565(1): 15-21.
- [24] Schmid GM, Converset V, Walter N, et al. Effect of high fat diet on the expression of proteins in muscle, adipose tissues, and liver of C57BL/6 mice [J]. Proteomics, 2004, 4(8): 2270-2282.
- [25] Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat[J]. Cell, 2014, 156(1-2): 20-44.
- [26] Schlaepfer IR, Joshi M. CPT1A-mediated fat oxidation, mechanisms, and therapeutic potential[J]. Endocrinology, 2020, 161(2): bqz046. doi: 10.1210/endo/bqz046.
- [27] Tonazzi A, Giangregorio N, Console L, et al. The mitochondrial carnitine acyl-carnitine carrier (SLC25A20): molecular mechanisms of transport, role in redox sensing and interaction with drugs[J]. Biomolecules, 2021, 11(4): 521. doi: 10.3390/biom11040521.
- [28] Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets[J]. Nat Rev Drug Discov, 2008, 7(6): 489-503.
- [29] Gallardo-Montejano VI, Yang C, Hahner L, et al. Perilipin 5 links mitochondrial uncoupled respiration in brown fat to healthy white fat remodeling and systemic glucose tolerance[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 3320. doi: 10.1038/s41467-021-23601-2.
- [30] Sanchez-Gurmaches J, Tang Y, Jespersen NZ, et al. Brown fat AKT2 is a cold-induced kinase that stimulates ChREBP-mediated de novo lipogenesis to optimize fuel storage and thermogenesis [J]. Cell Metab, 2018, 27(1): 195-209.e6.
- [31] Da Eira D, Jani S, Stefanovic M, et al. The ketogenic diet promotes triacylglycerol recycling in white adipose tissue and uncoupled fat oxidation in brown adipose tissue, but does not reduce adiposity in rats [J]. J Nutr Biochem, 2023, 120: 109412. doi: 10.1016/j.jnutbio.2023.109412.
- [32] von Essen G, Lindsund E, Maldonado EM, et al. Highly recruited brown adipose tissue does not in itself protect against obesity[J]. Mol Metab, 2023, 76: 101782. doi: 10.1016/j.molmet.2023.101782.

(编辑:刘霞)