

高脂饮食条件下隔日禁食诱导小鼠白色脂肪组织氨基酸和糖代谢的规律性变化

王宁^{1,2,3} 李洋^{1,2,3△}

¹复旦大学基础医学院药理学系, ²代谢分子医学教育部重点实验室 上海 200032;

³复旦大学脑科学研究院脑功能与脑疾病全国重点实验室, 教育部脑科学前沿科学中心 上海 200032)

【摘要】 目的 探究高脂饮食(high-fat diet, HFD)条件下, 隔日禁食(every-other-day fasting, EODF)对小鼠腹沟股白色脂肪组织(inguinal white adipose tissue, iWAT)代谢谱的规律性变化并揭示差异代谢物及代谢通路, 从而为改善肥胖提供潜在的候选代谢物。**方法** 将8周龄的雄性C57BL/6J小鼠随机分为HFD自由进食组(AL组)和HFD结合EODF组。小鼠喂养8周后, 取iWAT进行代谢组学和转录组学检测并分析。**结果** EODF显著改善HFD诱导的小鼠肥胖。代谢组学显示iWAT中氨基酸、碳水化合物和有机酸占比76.03%, 且71种差异代谢物主要富集于氨基酸-tRNA合成、中性/芳香族氨基酸代谢及精脯氨酸代谢。基因本体(gene ontology, GO)分析与基因富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)表明EODF处理诱导的差异基因在氨基酸跨质膜输入通路和细胞核糖体组分显著富集。此外, EODF显著促进iWAT中的糖代谢, 影响糖酵解初始阶段, 抑制磷酸戊糖途径, 且增强三羧酸循环, 促进线粒体氧化磷酸化进程。**结论** EODF可改善小鼠肥胖并影响iWAT氨基酸和糖相关代谢通路, 提示其可能通过增强能量消耗来维持代谢稳态。

【关键词】 隔日禁食(EODF); 腹沟股白色脂肪组织(iWAT); 代谢组学; 差异代谢物; 氨基酸代谢; 糖代谢; 小鼠

【中图分类号】 R34 **【文献标志码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-8467.2026.01.002

Regular changes of amino acid and glucose metabolism in mouse white adipose tissue induced by every-other-day fasting under high-fat diet conditions

WANG Ning^{1,2,3}, LI Yang^{1,2,3△}

¹Department of Pharmacology, ²Key Laboratory of Metabolism and Molecular Medicine, Ministry of Education, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China; ³State Key Laboratory of Brain Function and Disorders, Ministry of Education Frontiers Center for Brain Science, Institutes of Brain Science, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the metabolic profiles changes of inguinal white adipose tissue (iWAT) in mice induced by every-other-day fasting (EODF) under a high-fat diet (HFD) conditions, and to identify differential metabolites and metabolic pathways to provide potential candidate metabolites for obesity intervention. **Methods** Eight-week-old male C57BL/6J mice were randomly assigned to either an ad libitum HFD feeding group (AL group) or an HFD with EODF group. After 8 weeks, iWAT was collected for metabolomic and transcriptomic analyses. **Results** EODF significantly alleviated HFD-

国家自然科学基金(92057103)

[△]Corresponding author E-mail: oceanyangli@fudan.edu.cn

网络首发时间:2026-01-05 09:56:59 网络首发地址:https://link.cnki.net/urlid/31.1885.R.20260104.1419.005

induced obesity in mice. Metabolomics analysis showed that amino acids, carbohydrates, and organic acids comprised 76.03% of the detected metabolites in iWAT. A total of 71 differential metabolites were identified, primarily enriched in aminoacyl-tRNA biosynthesis, neutral/aromatic amino acid metabolism, and arginine/proline metabolism. Gene ontology and gene set enrichment analysis enrichment analyses demonstrated that EODF treatment-induced differential genes were significantly enriched in amino acid import across plasma membrane and ribosome cellular components. In addition, EODF significantly promoted glucose metabolism in iWAT, influenced the initial phase of glycolysis, inhibited the pentose phosphate pathway, enhanced the tricarboxylic acid cycle, and promoted the mitochondrial oxidative phosphorylation. **Conclusion** EODF ameliorated obesity in mouse and remodeled amino acid and carbohydrate-related metabolic pathways in their iWAT, suggesting that it may maintain metabolic homeostasis by enhancing energy expenditure.

【Key words】 every-other-day fasting (EODF); inguinal white adipose tissue (iWAT); metabolomics; differential metabolites; amino acid metabolism; glucose metabolism; mouse

* This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (92057103).

人和小鼠体内均含有3类脂肪组织,分别是白色、米色、棕色。肥胖时,白色脂肪组织(white adipose tissue, WAT)中脂质过度堆积可致脂毒性,慢性炎症,内质网应激,进而引发胰岛素抵抗和代谢紊乱,加剧代谢性疾病^[1]。高脂饮食(high-fat diet, HFD)诱导的小鼠肥胖是这类疾病的常用研究模型。棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)和由腹股沟WAT(inguinal WAT, iWAT)棕色化产生的米色脂肪组织具有产热功能,促进能量消耗,是治疗肥胖及相关代谢病的有效靶标^[2]。同时,亲水性代谢物补充也可改善代谢紊乱^[3]。禁食通过减少氧化应激,减轻炎症并优化能量代谢发挥作用。哺乳动物中,间歇性禁食有效预防或减轻肥胖及相关代谢性疾病,常见方案有隔日禁食(every-other-day fasting, EODF)、5:2禁食和每日限制饮食^[4]。组学研究显示,禁食在肝脏和脂肪组织中调控多层次分子变化^[5]。EODF 2周的雄性小鼠iWAT和附睾WAT(epididymal WAT, eWAT)中线粒体蛋白水平上调,三羧酸循环与乙酰辅酶A合成路径增强,但eWAT中 β 3肾上腺素受体蛋白水平减少,抑制脂质水解^[5]。单细胞转录组学揭示禁食可诱导脂肪组织出现新的细胞亚型,有助于解析脂肪组织重塑机制^[6]。禁食还激活交感神经,促进肾上腺素分泌,作用于脂肪细胞 β -肾上腺素,能刺激脂肪细胞中的脂肪分解,激活蛋白激酶A,促进脂质水解。脂肪生成和分解途径的相对平衡对维持脂肪组织功能及全身代谢稳态至关重要。

研究表明,禁食可通过调节脂肪组织中的基因、蛋白、代谢物水平维持代谢稳态,并揭示HFD诱导肥胖时脂肪组织的脂质、氨基酸和糖代谢的变化。然而,关于禁食在HFD背景下对脂肪组织中氨基酸和糖类等极性代谢物丰度的系统性认识仍然不足。基于质谱的代谢组学可全面检测和鉴定糖、氨基酸、有机酸、胆汁酸和核苷酸等极性代谢物,并定量其在疾病进程中的动态变化,从而阐明能量稳态调控机制,深化对复杂代谢病的理解^[7]。本研究结合代谢组学和RNA测序,系统分析HFD条件下EODF对iWAT代谢物组成和代谢通路的影响,并鉴定显著差异代谢物和通路,以期探索改善肥胖的潜在靶标提供参考。

材料和方法

动物饲养与分组处理 动物研究按照复旦大学上海医学院动物伦理委员会批准方案实施(批准号:FE21166)。8周龄雄性C57BL/6J小鼠(上海南方模式生物)均饲养于环境温度为23℃的SPF级动物房,HFD(D12492,美国Research Diets)含有60%的脂肪。将雄性C57BL/6J小鼠随机分为HFD自由进食组(AL组)和HFD结合EODF组,持续8周。

HE染色 AL组和EODF组各取3只小鼠的iWAT进行HE染色,使用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,制作3 μ m切片,脱蜡水化后进行染色并用显微镜(Eclipse E100,日本Nikon公司)镜检,图像

采集。

代谢组学检测和数据分析 提取 AL 组和 EODF 组小鼠腹股沟皮下同侧 iWAT 约 100 mg 进行代谢组学检测(上海麦特绘谱生物),检测时提取 10 mg iWAT 中代谢物,其浓度标准化以 10 mg 组织重量归一化。超高效液相色谱-串联质谱生成的原始数据文件使用 TMBQ 软件处理,对每种代谢物进行峰整合,校准和定量。采用 iMAP (v1.0, metabolic-profile)平台进行包括 OPLS-DA,单变量分析和通路分析等的统计。OPLS-DA 分析了代谢物对模型分组的贡献(variable importance in projection, VIP)和代谢物的可靠度,差异代谢物的筛选定义为 VIP 值 >1 。单变量分析依据数据的正态性和方差齐性选取 t 检验或 Mann-Whitney U 检验对代谢物进行分析,满足 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 0$ 且 $P < 0.05$ 为组间差异代谢物。在通路富集分析气泡图中,标注 $P < 0.05$ 的通路名称。

RNA-seq 检测 取 AL 和 EODF 处理的小鼠 iWAT 样本约 50 mg 送样进行 RNA-seq 检测(上海凌恩生物科技)。构建测序文库的 RNA 选择高质量样本($D_{260/280} = 1.8 \sim 2.2$, $D_{260/230} \geq 2.0$, RNA integrity number ≥ 6.5 , 28S:18S ≥ 1.0 , $> 10 \mu\text{g}$)。取 1 μg 总 RNA,用 Illumina TruSeq 试剂盒经 oligo (dT)磁珠富集 mRNA 并片段化;经过 cDNA 合成、末端修复、加 Poly A、接头连接后,选取 200~300 bp 片段用于 PCR 扩增。TBS380 定量后,采用 Illumina NovaSeq 6000 进行 PE150 测序。

转录组数据分析 为鉴定 AL 组和 EODF 组样本之间的差异表达基因,使用每千个碱基的转录每百万映射读取的转录本数(transcripts per million, TPM)方法计算每个检测基因的表达水平。采用 R

统计包 edgeR 进行差异表达分析。差异表达基因筛选标准是 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 且 adjusted $P < 0.05$,其中 padj 为多重假设检验经过 Benjamini-Hochberg 方法校正后的 P 值。基因本体(gene ontology, GO)分析与基因富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)的筛选标准均为: $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

EODF 改善小鼠 HFD 诱导的肥胖 为探究 EODF 对小鼠白色脂肪组织中代谢分子及相关代谢通路的影响,我们构建了长期 EODF 的小鼠模型。8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 HFD-AL 组和 HFD 结合 EODF 组(表 1),持续 8 周。在不影响两组小鼠累积进食量的同时,与 AL 组相比, EODF 组小鼠的体质量、iWAT 和 eWAT 的重量均显著减少(表 1)。HE 染色显示, EODF 组 iWAT 的脂滴面积明显减小,说明脂质沉积减少(图 1)。考虑到 EODF 组小鼠体质量远低于 AL 组,若不再通过小鼠体质量对累积进食量进行校正,而直接计算两组小鼠每两日进食的绝对量,发现 EODF 组小鼠的进食量为 (3.32 ± 0.06) g,少于 AL 组的 (4.71 ± 0.09) g。结合多组学分析, EODF 组小鼠的代谢获益可能不仅由于整个造模期间食物摄取的绝对量减少,也包括小鼠机体应对 EODF 而做出整体的代谢稳态调整,如利用机体本身存储的物质进行分解代谢,从而维持机体代谢稳态和产能。这些调整包括糖脂分解代谢增强,自噬-溶酶体通路激活,差异代谢物氨基酸和糖类转运增强,差异代谢物相关代谢通路激活等。

表 1 AL 和 EODF 组小鼠体质量与脂肪组织重量分析

Tab 1 Body weight and adipose tissue weight analysis in mice after AL and EODF treatment

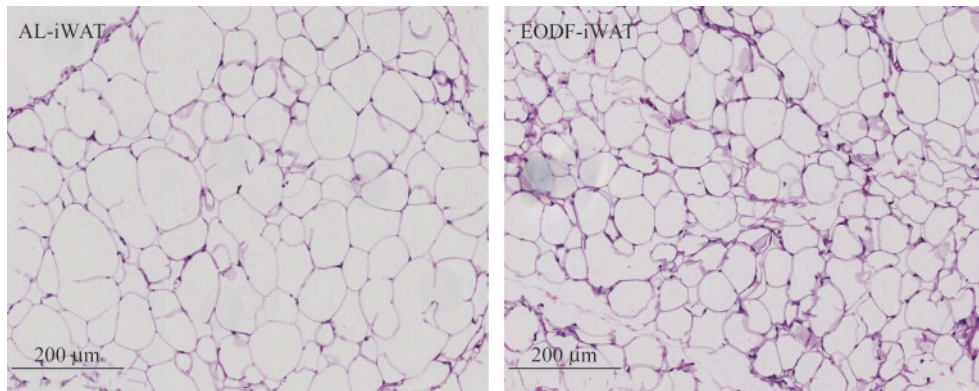
($\bar{x} \pm s$)

Observation item	AL group (n=8)	EODF group (n=8)	P	t
Body weight (g)	32.24 \pm 1.66	23.80 \pm 0.38	<0.01	4.945
iWAT (g)	1.53 \pm 0.16	0.35 \pm 0.02	<0.01	7.161
eWAT (g)	2.22 \pm 0.29	0.57 \pm 0.06	<0.01	5.546
Cumulative food intake (g/100 g body weight)	378.00 \pm 7.29	380.80 \pm 2.18	0.75	0.370

Eight-week-old male mice subjected to AL and EODF treatment were sacrificed after an overnight fast. The weight of body and adipose tissue were measured. Daily food intake was calculated by quantifying the weight of the remaining food and data were normalized to the body weight of the mice. Data were analyzed using unpaired two-tailed t tests with Graphpad Prism 9.5.

EODF 对 iWAT 中代谢小分子的整体组成与分布的影响 为探究 EODF 对 iWAT 中代谢分子的

整体组成和分布的影响,我们从 AL 组、EODF 组小鼠中分离 iWAT,进行基于质谱的代谢组学分析。



Representative HE staining of iWAT sections.

图1 AL组和EODF组小鼠iWAT的脂滴变化

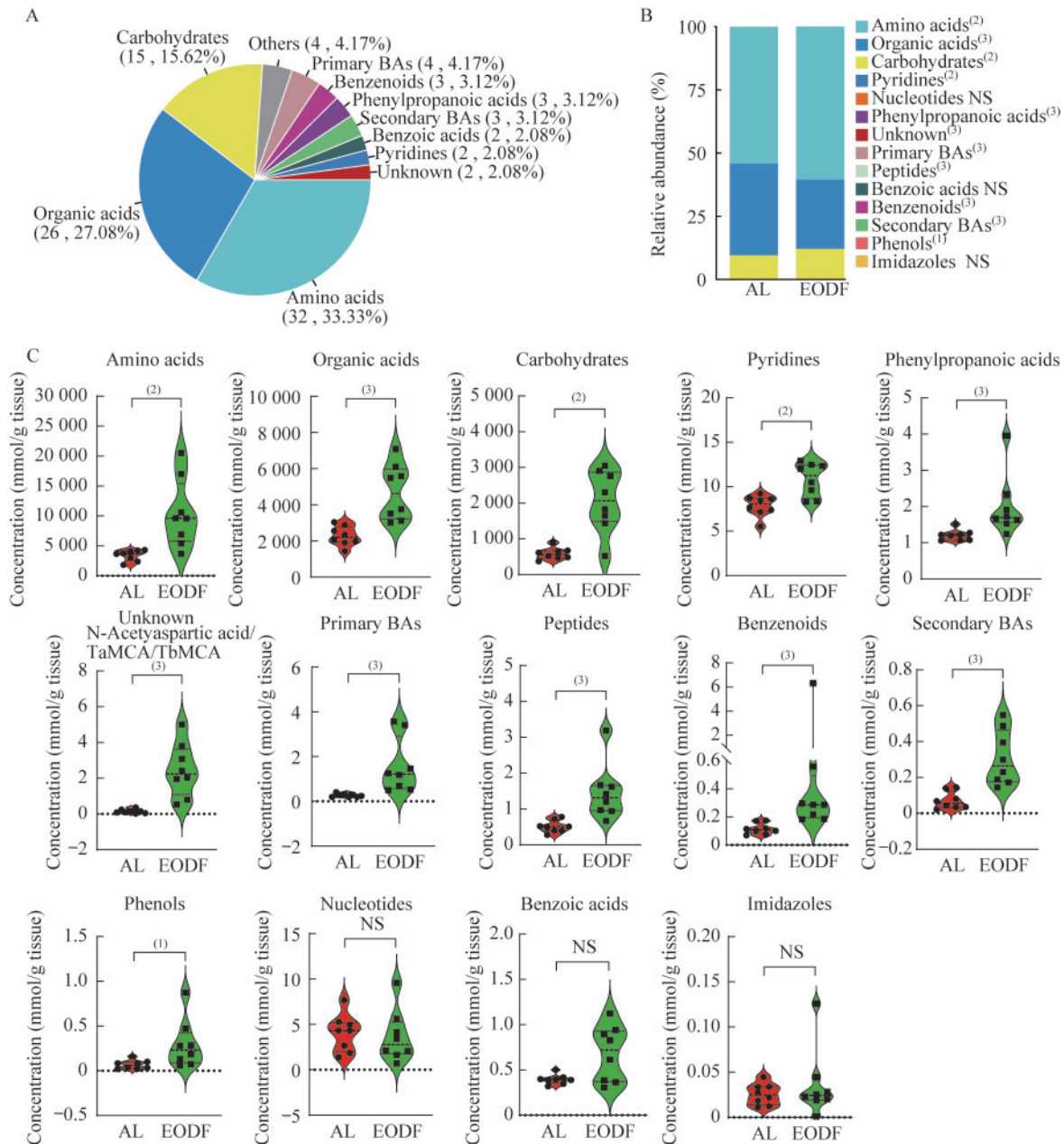
Fig 1 Changes of lipid droplets in mice iWAT between AL group and EODF group

本次组学分析主要检测到 96 个代谢分子,包括 32 个氨基酸类、26 个有机酸类、15 个碳水化合物类、4 个初级胆汁酸类、3 个苯环型化合物、3 个苯丙酸类化合物、3 个次级胆汁酸分子、2 个苯甲酸类化合物、2 个吡啶类化合物、N-乙酰天冬氨酸和牛磺- α/β -鼠胆酸、4 个其他类化合物(分别是属于多肽类化合物的甘胺脯氨酸、属于咪唑类化合物的咪唑丙酸、属于酚类化合物的高香草酸、属于核苷酸类化合物的单磷酸腺苷)(图 2A)。AL 组和 EODF 组中各类代谢物浓度水平的中位值的相对丰度如图 2B 所示,氨基酸、有机酸、碳水化合物、吡啶类分子、苯丙酸类分子、N-乙酰天冬氨酸和牛磺- α/β -鼠胆酸、初级胆汁酸、多肽类分子、苯环型化合物、次级胆汁酸、酚类化合物的水平在 EODF 组显著增加,而核苷酸类分子、苯甲酸类分子、咪唑类分子在两组之间的差异没有统计学意义(图 2C)。结果表明,iWAT 中氨基酸、有机酸及碳水化合物的占比高达 76.03%,且 EODF 组氨基酸、碳水化合物及有机酸的水平显著上调。

EODF 影响 iWAT 中的代谢标记物和通路 为进一步区分 AL 组和 EODF 组间的代谢谱差异,我们首先运用有监督的判别模型-正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal projection to latent structure-discriminant analysis, OPLS-DA)。多维 OPLS-DA 分析显示两组组间代谢谱差异显著,组内样本比较集中,EODF *vs.* AL: $R^2Y=0.942, Q^2Y=0.842$ (图 3A、3B)。对 OPLS-DA 进行 1 000 次随机置换检验,结果显示 $Q^2Y > 0.2, Q^2Y$ 拟合曲线在 Y 轴上的截距 < 0 ,表明该模型无过度拟合(图 3B)。基于 OPLS-DA 模型结果,我们筛选出 48 个代谢物对模型分组的贡

献 $VIP > 1$ 。其次,我们采用单维检验对代谢组学数据进行分析,筛选出 71 个差异代谢物,其中含 30 种氨基酸类、11 种糖类、17 种有机酸类,以及包含 5 种胆汁酸类、5 种苯环型化合物、1 种苯丙酸类、1 种吡啶类、和 1 种肽类化合物在内的 13 种其他类型的差异代谢物(图 3C)。分别将多维和单维分析得到的差异代谢物取交集获得潜在的生物标志物绘制热图,在 EODF 组上调代谢物 66 个、下调代谢物 5 个(图 3D、3E)。最后,将筛选获得差异代谢物进行小分子通路数据库分析(small molecule pathway database, SMPDB),发现氨基酸代谢相关通路被显著富集(图 3F)。结果显示,EODF 组小鼠 iWAT 中 71 个代谢分子的变化有统计学意义,并且富集到氨基酰-tRNA 合成,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸的新陈代谢,精氨酸和脯氨酸代谢,苯丙氨酸、酪氨酸/色氨酸合成代谢,以及三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环等。

EODF 影响 iWAT 中参与氨基酸代谢的生物标记物和代谢通路 禁食时,脂肪组织脂质水解,肝脏糖异生和糖原分解,骨骼肌蛋白质水解过程均增加,产生的游离脂肪酸、葡萄糖及氨基酸为组织提供能量,维持代谢稳态^[5,8]。代谢组学检测显示,EODF 引起 iWAT 中 30 个氨基酸及其衍生物分子的浓度显著增加(表 2)。为进一步探究 EODF 对 iWAT 中代谢物的影响,我们应用 RNA-seq 检测了 EODF 引起 iWAT 中基因程序的变化。对差异基因进行 GO 功能富集分析,发现 EODF 组在氨基酸跨质膜输入和芳香族氨基酸代谢过程中明显富集(图 4A)。GSEA 显示 EODF 促进 iWAT 中芳香族氨基酸的分解代谢,热图呈现调节该通路的核心基



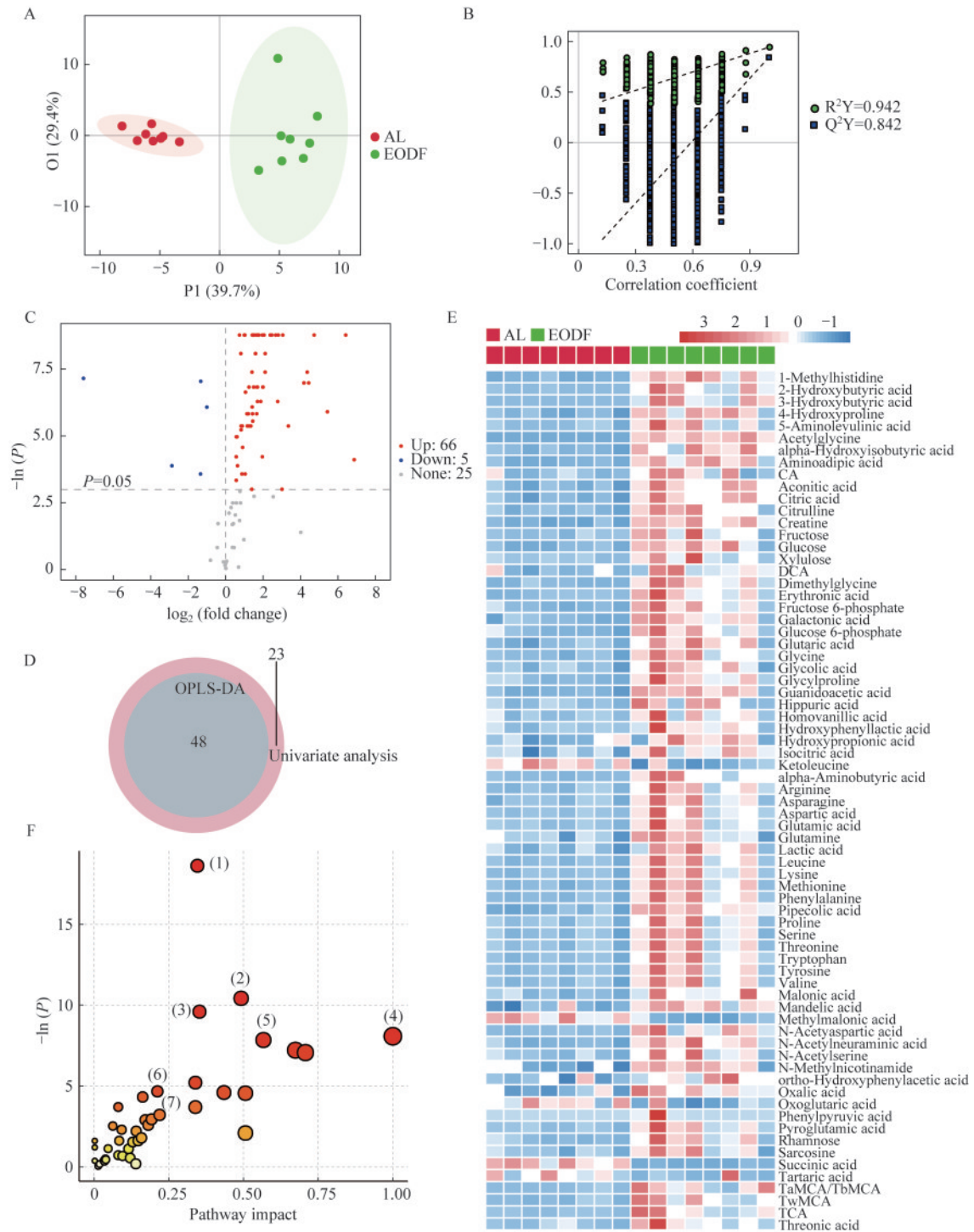
A: Proportion of identified metabolite classes in AL and EODF group; B: Relative abundance of each metabolite class in AL and EODF groups; C: Levels of each metabolite class in AL and EODF groups. BAs: Bile acids. In each group, $n=8$. ⁽¹⁾ $P<0.05$, ⁽²⁾ $P<0.01$, ⁽³⁾ $P<0.001$, NS: Not significant.

图2 EODF显著改变小鼠iWAT中代谢物的整体组成与分布

Fig 2 EODF significantly altered the overall composition and distribution of metabolite classes in iWAT of mice

因(图4B)。京都基因与基因组(kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路富集显示EODF诱导的差异基因主要集中于苯丙氨酸、酪氨酸等芳香族氨基酸代谢,甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸等中性氨基酸代谢,精脯氨酸代谢(图4C),与上述EODF诱导的差异代谢分子富集的氨基酸代谢通路一致(图3F)。

GO富集通路分析表明,EODF组富集的基因多数参与编码氨基酸质膜与细胞器膜转运体。哺乳动物细胞中,超过60种不同活性的转运蛋白负责氨基酸转运,分别是单向转运蛋白、同向协同转运蛋白及反向交换转运蛋白^[9]。编码属于单向转运蛋白的阳离子氨基酸转运体(cationic amino acids transporter, CAT)的 *Slc7a2*、*Slc7a3*在EODF组显



A: OPLS-DA score plot showing the differential clustering patterns of metabolites in iWAT between AL and EODF groups; B: Permutation test of the OPLS-DA analysis; C: Volcano plot of univariate statistical analysis; D: Venn diagram of differential metabolites identified by multi-dimensional and univariate statistical analyses; E: Potential biomarkers identified by multi-dimensional and univariate statistical analyses; F: Pathway analysis of EODF-enriched metabolites. (1): Aminoacyl-tRNA biosynthesis; (2): Glycine, serine and threonine metabolism; (3): Arginine and proline metabolism; (4): Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; (5): Alanine, aspartate and glutamate metabolism; (6): Citrate cycle; (7): Glyoxylate and dicarboxylate metabolism. CA: Cholic acid; DCA: Deoxycholic acid; α MCA/T β MCA: Tauro α / β -muricholate; T ω MCA: Tauro ω -muricholate; TCA: Taurocholic acid.

图3 EODF影响小鼠iWAT中代谢标记物和通路

Fig 3 EODF modulated differential metabolites and pathways in iWAT of mouse

表 2 AL组和EODF组小鼠iWAT中氨基酸类差异代谢分子

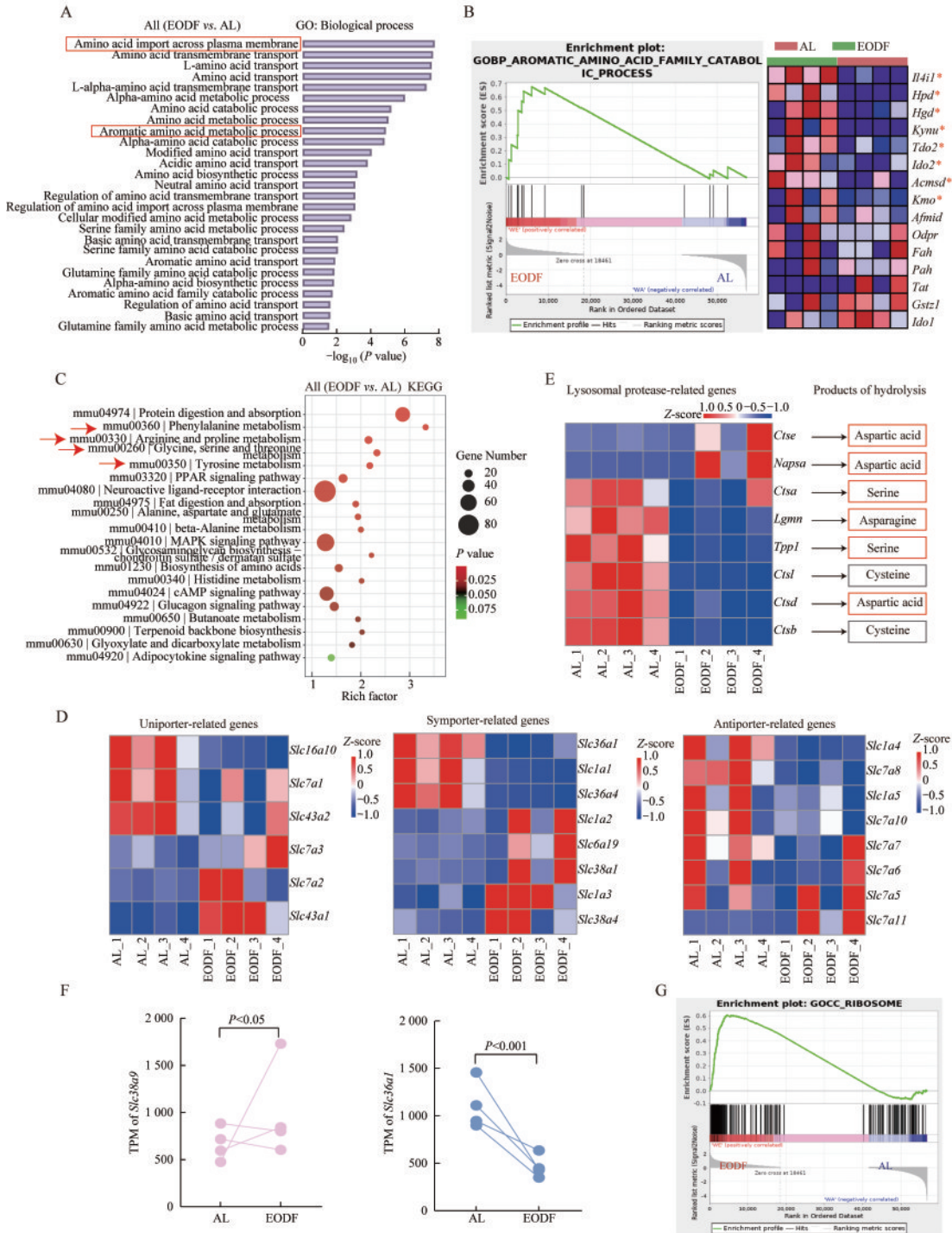
Tab 2 Differential metabolites belonging to amino acids class in iWAT of mouse between AL and EODF groups ($\bar{x} \pm s$)

Metabolite	AL group	EODF group	log ₂ (fold change)	P
Acetylglycine	0.33 ± 0.13	7.65 ± 1.98	4.70	<0.001
Aminoadipic acid	14.79 ± 4.97	68.76 ± 25.00	2.44	<0.001
Creatine	95.64 ± 41.14	454.40 ± 123.83	2.35	<0.001
Dimethylglycine	0.55 ± 0.25	3.45 ± 2.00	2.65	<0.001
Glycine (Gly)	288.03 ± 73.39	898.09 ± 452.61	1.39	<0.001
α-Aminobutyric acid	2.02 ± 0.29	8.93 ± 5.57	1.72	<0.001
Arginine (Arg)	152.03 ± 57.00	590.25 ± 351.25	1.71	<0.001
Glutamic acid (Glu)	104.65 ± 21.44	346.60 ± 255.56	1.45	<0.001
Lysine (Lys)	305.16 ± 100.71	1 307.59 ± 805.44	1.69	<0.001
Phenylalanine (Phe)	74.59 ± 22.61	345.86 ± 205.24	1.93	<0.001
Pipecolic acid	0.83 ± 0.24	2.44 ± 0.72	1.50	<0.001
Tryptophan (Trp)	18.47 ± 5.89	77.44 ± 49.69	1.74	<0.001
Pyroglutamic acid	111.47 ± 25.41	398.71 ± 285.35	1.62	<0.001
4-Hydroxyproline	1.17 ± 0.33	3.43 ± 1.11	1.56	<0.001
Aspartic acid (Asp)	122.45 ± 32.73	517.64 ± 393.59	1.57	<0.001
N-acetylaspartic acid	0.12 ± 0.09	1.87 ± 1.38	4.33	<0.001
1-Methylhistidine	0.23 ± 0.28	4.46 ± 1.96	4.41	<0.001
5-Aminolevulinic acid	1.63 ± 0.47	5.45 ± 3.66	1.64	<0.01
Citrulline	9.39 ± 2.10	24.26 ± 10.11	1.22	<0.01
Leucine (Leu)	208.01 ± 66.49	807.91 ± 472.97	1.67	<0.01
Valine (Val)	168.56 ± 46.70	530.72 ± 289.71	1.47	<0.01
Tyrosine (Tyr)	71.41 ± 23.23	266.36 ± 157.70	1.67	<0.01
Asparagine (Asn)	45.56 ± 17.42	157.52 ± 97.24	1.41	<0.01
Methionine (Met)	56.23 ± 16.41	210.20 ± 110.01	1.63	<0.01
Threonine (Thr)	120.66 ± 32.07	329.35 ± 187.48	1.18	<0.01
Proline (Pro)	126.00 ± 35.58	351.73 ± 226.56	1.13	<0.01
Serine (Ser)	394.11 ± 103.81	1 020.19 ± 508.18	1.21	<0.01
N-acetyls erine	5.67 ± 1.04	10.18 ± 4.86	0.58	<0.01
Glutamine (Gln)	406.30 ± 113.18	669.69 ± 276.35	0.54	<0.05
Sarcosine	10.70 ± 2.79	21.66 ± 11.69	0.84	<0.05

The concentration (nmol/g tissue), log₂ (fold change) and P value of potential biomarkers belonging to amino acids class were shown.

著上调,而CAT主要负责细胞对精氨酸、赖氨酸的摄取(图4D)。代谢组学检测到EODF组的精氨酸和赖氨酸的水平升高(表2)。编码属于同向协同转运蛋白的阴离子氨基酸转运体(anionic amino acids transporter, AAT)的*Slc1a3*、*Slc1a2*在EODF组显著上调,而*Slc1a1*显著下调;编码属于反向交换转运蛋白AAT的*Slc7a11*在EODF组显著上调,AAT主要负责细胞对天冬氨酸和谷氨酸的摄取;编码运输中性氨基酸的转运体的*Slc38a1*、*Slc38a4*、*Slc43a1*在EODF组显著上调,而*Slc36a4*、*Slc1a4*、

Slc7a8、*Slc16a10*、*Slc43a2*在EODF组显著下调(图4D)。*Slc38a1*、*Slc38a4*是编码运输谷氨酰胺的同向转运蛋白的基因。*Slc43a1*、*Slc43a2*编码的单向转运蛋白优先摄取亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸进入细胞^[10]。由*Slc1a4*编码的氨基酸转运体主要介导对丙氨酸、丝氨酸、半胱氨酸及苏氨酸的转运^[11]。编码转运多数中性氨基酸转运体的*Slc7a8*基因缺失可以预防饮食诱导的小鼠肥胖并减轻多器官的脂质累积,改善代谢^[12]。由*Slc43a2*编码的氨基酸单向转运蛋白介导支链氨基酸,甲硫氨酸及



A: GO-biological process (GO-BP) analysis of amino acids metabolism; B: GSEA plot and heatmap for the “GO-BP aromatic amino acid metabolic process” gene set. Red asterisks represent genes that are core enrichment for this metabolic process; C: KEGG pathway analysis of differential expression genes in iWAT; D: Heatmap showing genes (encoding plasma membrane amino acid transporters) whose expression were altered in EODF group; E: Heatmap showed genes (encoding lysosomal protease) whose expression were altered in EODF group, in which the substances pointed to by the arrows are hydrolysis products of the corresponding protein hydrolases; F: TPM analysis revealed changes in genes encoding lysosomal amino acid transporter-related genes in iWAT upon EODF treatment; G: GSEA plot for the “GO-cellular component (GO-CC) ribosome” gene set.

图4 EODF影响小鼠iWAT中参与氨基酸代谢的生物标记物和代谢通路

Fig 4 EODF modulated biomarkers and metabolic pathways involved in amino acid metabolism in iWAT of mouse

苯丙氨酸的扩散^[13]。溶酶体是单层膜结构的酸性细胞器,负责降解其中的蛋白、多糖、核酸和脂质;其产物经膜上转运体输出至胞质再利用,从而维持细胞内环境稳态。溶酶体中的水解酶有蛋白酶、脂肪酶、核酸酶、糖苷酶、磷酸酶等^[14],其中溶酶体蛋白酶包括组织蛋白酶、天冬酰胺内肽酶、天冬氨酸蛋白酶和三肽基肽酶(tripeptidyl-peptidase 1, TPP1)^[15]。我们发现 iWAT 中 *Ctsa*、*Ctsb*、*Ctsd*、*Ctsl*、*Lgmn*、*Tpp1* 在 EODF 组明显下调,而 *Ctse*、*Napsa* 则上调(图 4E)。另外,经由溶酶体蛋白酶降解的产物天冬氨酸、丝氨酸及天冬酰胺的浓度水平在 EODF 组显著提高(表 2,图 4E)。定位于溶酶体膜上的 SLC36A1、SLC38A9 负责将蛋白质水解产生的氨基酸转运到细胞质^[31]。其中,前者主要转运脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸,后者转运天冬酰胺及亮氨酸^[16]。EODF 引起 iWAT 中的 *Slc36a1*、*Slc38a9* 的基因水平明显改变(图 4F)。转录组数据表明 iWAT 响应 EODF 处理会引起众多编码氨基酸转运体的基因表达发生明显变化,导致氨基酸分子水平升高。

代谢组学的通路富集分析显示,HFD 条件下 EODF 介导的差异代谢物参与氨基酰-tRNA 合成通路(图 3F)。转录组测序分析表明 EODF 显著诱导氨基酸转运体相关基因的表达变化,并显著激活芳香族与中性氨基酸代谢及精脯氨酸代谢通路。GSEA 分析 EODF 促进细胞核糖体组分增加(图 4G)。上述结果表明,在 HFD 条件下,EODF 增加白色脂肪组织中氨基酸代谢物的水平并增强相关

代谢通路以支持机体代谢稳态和能量供应,进而保障 EODF 期间的机体稳态维持和存活。

EODF 影响 iWAT 中参与糖代谢的生物标记物及代谢通路 EODF 诱导 iWAT 中 11 个碳水化合物类的水平明显改变,其中,三羟丁酸、乙酰神经氨酸、果糖-6-磷酸位列前三(表 3)。差异代谢物通路富集分析显示糖酵解和磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway, PPP)被显著富集(表 3,图 5A)。在糖酵解和 PPP 中,代谢中间产物葡萄糖、葡萄糖-6-磷酸、果糖-6-磷酸水平在 EODF 组显著上调(表 3,图 5B)。己糖激酶(hexokinase, HK)通过催化葡萄糖磷酸化生成葡萄糖-6-磷酸,编码该酶的 *Hk1* 在 EODF 组下调。葡萄糖-6-磷酸是己糖激酶的经典产物性变构抑制剂,可直接抑制己糖激酶活性,从而形成负反馈环路,避免葡萄糖过度磷酸化和过度代谢^[17]。EODF 处理后,葡萄糖-6-磷酸丰度上升,进而可能通过负反馈调控 *Hk1* 基因表达下调。葡萄糖-6-磷酸在葡萄糖-6-磷酸异构酶(glucose phosphate isomerase, GPI)的催化作用下生成果糖-6-磷酸,编码该酶的 *Gpi1* 在 EODF 组显著上调(图 5B、5C),表明 EODF 主要影响糖酵解途径的初始阶段。氧化磷酸化相关基因在 EODF 组显著上调,证明 iWAT 能量代谢增强(图 5E)。此外,糖酵解产生的葡萄糖-6-磷酸进入 PPP。PPP 分为氧化和非氧化途径:氧化途径中,葡萄糖-6-磷酸分解为核酮糖-5-磷酸;非氧化途径中,核酮糖-5-磷酸异构化生成核糖-5-磷酸,木酮糖-5-磷酸及赤藓糖-4-磷酸,再经过一系列酶促反应最终生成果糖-6-磷酸和甘油醛-

表 3 AL 和 EODF 组 iWAT 中糖类差异代谢分子

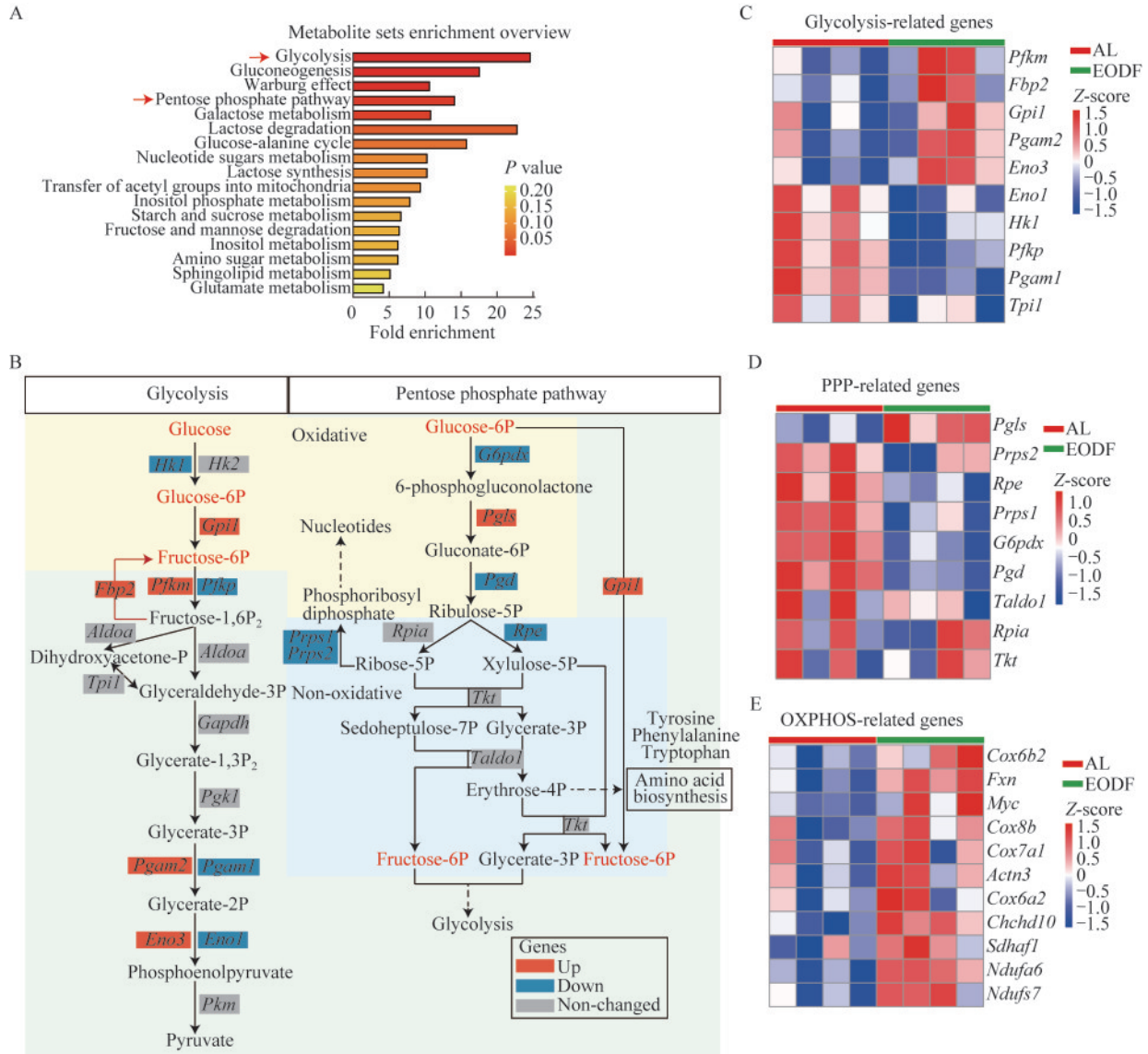
Tab 3 Differential metabolites belonging to carbohydrates class in iWAT of mouse between AL and EODF groups ($\bar{x} \pm s$)

Metabolite	AL group (nmol/g tissue)	EODF group (nmol/g tissue)	\log_2 (fold change)	<i>P</i>
Erythronic acid	2.26 ± 0.22	5.08 ± 2.44	1.00	<0.001
N-acetylneuraminic acid	2.51 ± 0.28	4.56 ± 1.24	0.71	<0.001
Fructose 6-phosphate	58.21 ± 35.21	254.28 ± 143.69	2.08	<0.001
Galactonic acid	1.35 ± 0.54	5.45 ± 2.56	1.95	<0.01
Glucose 6-phosphate	52.69 ± 28.38	198.62 ± 109.46	1.97	<0.01
Glucose	408.03 ± 123.63	1 478.48 ± 673.19	1.85	<0.01
Threonic acid	0.60 ± 0.62	3.44 ± 3.22	2.75	<0.01
Xylulose	2.76 ± 0.41	6.27 ± 4.18	0.80	<0.01
Rhamnose	0.42 ± 0.48	3.28 ± 2.63	3.32	<0.01
Fructose	8.22 ± 1.71	21.25 ± 13.79	0.88	<0.05
Tartaric acid	0.90 ± 0.63	0.46 ± 0.94	-2.89	<0.05

The concentration (nmol/g tissue), \log_2 (fold change) and *P* value of potential biomarkers belonging to carbohydrates class were shown.

3-磷酸,重新进入糖酵解途径^[18]。参与PPP相关的多数基因在EODF组下调,表明EODF对iWAT中的PPP有抑制作用(图5B、5D)。对EODF引起的糖类差异代谢物及差异基因的分析表明,在HFD条

件下,EODF抑制小鼠iWAT中PPP,影响糖酵解初始途径,促进线粒体氧化磷酸化,增强组织能量代谢,进而维持机体代谢稳态。



A: Pathway analysis of EODF-enriched carbohydrates; B: Glycolysis and pentose phosphate pathway (PPP) reactions, with indications of differential metabolites (labeled in red) and genes (rectangles) significantly regulated in iWAT by EODF treatment; C, D and E: Heatmap showed genes involved in glycolysis (C), PPP (D) and oxidative phosphorylation (OXPHOS) (E) whose expression was altered in the EODF group.

图5 EODF影响小鼠iWAT中参与糖代谢的生物标记物及代谢通路

Fig 5 EODF modulated biomarkers and metabolic pathways involved in glucose metabolism in iWAT of mouse

讨论

本研究结合质谱代谢组学和转录组学,解析HFD条件下EODF对WAT内氨基酸和糖代谢的

规律性重塑,并鉴定出具有特异变化的关键代谢物,进一步为揭示并阐明HFD条件下EODF对WAT代谢稳态调控及以肥胖为代表的代谢性疾病的改善提供了参考和思路。EODF显著改善HFD诱导的小鼠肥胖。现有研究主要聚焦于HFD或禁

食引起脂肪组织中脂质、氨基酸和糖类代谢产物的动态变化,以及关键代谢酶在基因与蛋白水平的表达调控,而对HFD条件下禁食诱导的脂肪组织代谢谱尚无全面深入的了解。为此,本研究主要检测并分析了HFD条件下EODF诱导小鼠iWAT中代谢小分子及相关代谢通路的变化。

本研究发现,EODF引起30种氨基酸及其衍生物在小鼠iWAT中明显上调。其中乙酰甘氨酸、氨基己二酸、肌酸、二甲基甘氨酸、甘氨酸位列前五。大规模代谢组学研究发现,血清或尿液中乙酰甘氨酸水平与成人脂肪量呈负相关;临床研究中,其在体脂率低者中更高,提示可能有“抗肥胖”作用^[19]。另一项间歇性禁食研究亦显示小鼠血清乙酰甘氨酸水平升高^[20]。动物实验发现补充乙酰甘氨酸可改善HFD小鼠体脂沉积,可能通过增强线粒体氧化或促进脂肪组织的能量消耗发挥作用^[19]。热量限制期间补充甘氨酸可加速全身脂肪分解并保护骨骼肌质量^[21]。精氨酸/肌酸代谢是米色脂肪的标志,肌酸促进米色脂肪细胞的线粒体呼吸及产热,其含量减少降低了人和小鼠BAT细胞的能量消耗^[22]。支链氨基酸在脂肪代谢中扮演重要角色,冷暴露促进人和小鼠BAT中线粒体对支链氨基酸的氧化利用并产热^[23]。本研究检测到小鼠iWAT在长期EODF处理后支链氨基酸亮氨酸和缬氨酸的丰度增加。同时焦谷氨酸、4-羟脯氨酸等衍生物水平也增加,可能作为新候选标记物改善代谢稳态。氨基酸差异代谢物的发现为更全面的理解机体在应对代谢紊乱条件下禁食引起代谢益处提供了候选代谢物。HFD条件下,iWAT响应EODF引起众多编码质膜,溶酶体膜氨基酸转运体的基因发生明显变化,芳香族与中性氨基酸代谢通路显著激活,细胞核糖体组分增加。EODF处理时机体蛋白质合成减弱,分解增强,产生氨基酸维持机体代谢稳态平衡。同时,氨基酰-tRNA和细胞核糖体组分通路富集。结合已发表研究^[5,24],提示在EODF促进蛋白质分解的前提下,部分蛋白的翻译依然存在。这些蛋白一般与蛋白质分解和氨基酸转运相关,从而更好地在间歇性禁食条件下增强蛋白质分解和后续氨基酸的利用。GCN2-ATF4信号通路在氨基酸饥饿时会被激活,促进编码氨基酸转运蛋白相关基因的表达,以帮助细胞分解蛋白质后的氨基酸转运^[24]。EODF处理后iWAT、eWAT和BAT的蛋白

质组发生显著变化,线粒体蛋白含量显著增加,有助于氨基酸转运及其相关的TCA循环产能^[5]。间歇性禁食可以激活TFEB、FOXO和Nrf2等转录因子,进而上调“自噬-溶酶体”等降解系统相关蛋白,增强细胞和机体的蛋白质分解。氨基酸代谢物增多表明iWAT中的蛋白质分解增加,产生氨基酸;其作为“构建模块(building blocks)”以维持机体代谢稳态。

EODF还诱导iWAT中糖类代谢物水平发生明显改变。iWAT中,EODF显著影响糖酵解初始阶段及抑制PPP,增强线粒体TCA循环,促进氧化磷酸化进程,进而维持机体在长期EODF状态下的代谢稳态。3-羟基丁酸是饥饿、HFD和长时间运动产生的内源性代谢物,具有重要的信号转导功能^[25]。本次组学检测到EODF促进3-羟基丁酸在iWAT中的水平升高。3-羟基丁酸通过增加细胞内乙酰辅酶A的水平及ATP/ADP的比例进而活化AMPK^[25-26],促进脂肪酸氧化,减轻肥胖^[27]。其衍生物3-羟基丁酸-苯丙胺酸,通过激活下丘脑和脑干中的特定神经元,发挥抑制食欲,减轻肥胖的作用^[28]。此外,iWAT中的糖类代谢物鼠李糖,N-乙酰神经氨酸的水平在EODF作用下显著上调。鼠李糖治疗通过增加产热基因表达,促进小鼠脂肪组织产热,进而防止HFD诱导的小鼠肥胖^[29]。N-乙酰神经氨酸具有改善大脑发育和认知能力,保护心血管系统,抗病毒、抗氧化活性等生理功能^[30]。

长期禁食可显著改变能量代谢,以适应能量减少并维持代谢稳态。脂肪酸、葡萄糖、氨基酸是细胞的主要能量来源。研究表明,禁食期间机体主要通过AMPK激活谷氨酰胺代谢、消耗肌肉中的氨基酸及利用脂肪水解产生的脂肪酸^[31]。脂肪细胞在禁食期间通过在线粒体和溶酶体之间传输营养物质来调控能量代谢,自噬发生后氨基酸从溶酶体中释放出来作为TCA循环底物发挥作用^[32]。在肥胖患者的WAT中检测到谷氨酰胺的水平显著低于正常人^[33]。本研究中,在HFD条件下EODF诱导的小鼠iWAT中多数氨基酸水平增加,可能反映了在能量供应受限的情况下,氨基酸作为能量来源和代谢中间体的重要性增加。禁食时,机体胰岛素水平降低,进而导致脂肪组织中葡萄糖的摄取和利用减少^[34]。脂肪组织葡萄糖代谢的早期反应尚未深入研究,脂肪细胞糖酵解的研究也较少。研究发现,

在饥饿期间,转录因子FOXK1和FOXK2通过诱导细胞进行有氧糖酵解,导致细胞代谢发生重编程,从而增加乳酸生成^[34]。本研究中,EODF在HFD背景下诱导iWAT中葡萄糖的水平增加,影响糖酵解初始阶段及抑制PPP,并且检测到EODF组有机酸乳酸的水平增加。本研究揭示EODF处理诱导乙酰甘氨酸、谷氨酰胺、3-羟基丁酸水平升高,并且在精脯氨酸代谢、氨基酰-tRNA合成、三羧酸循环通路富集。

本研究从代谢和转录水平确定了HFD条件下iWAT在EODF作用下诱导的代谢物和代谢通路的规律性变化。结果表明,EODF显著改变了iWAT中代谢分子的整体组成,促进氨基酸、糖类代谢物的整体水平上升,诱导氨基酸跨质膜输入通路及细胞中核糖体组分增加,显著激活氨基酰-tRNA合成,芳香族和中性氨基酸代谢,精脯氨酸代谢通路,影响糖酵解初始阶段及抑制PPP。本研究筛选出EODF介导的包括氨基酸类、糖类等71个差异代谢物,揭示了差异代谢物和代谢通路的变化,为探索改善肥胖的潜在靶标提供参考。但是本研究尚未对筛得的差异代谢物及其关联代谢通路进行功能验证。后续我们将遴选排名靠前的候选分子,先在独立批次样本中采用靶向代谢组学复核其变化;随后在HFD小鼠中开展膳食补充或药理干预(EODF联用),来系统研究差异代谢物在EODF应对肥胖代谢紊乱条件下的作用机制。

作者贡献声明 王宁 实验实施,数据采集、整理和分析,论文撰写。李洋 实验设计和指导,论文撰写和修订。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] SAKERS A, DE SIQUEIRA MK, SEALE P, *et al.* Adipose-tissue plasticity in health and disease [J]. *Cell*, 2022, 185(3): 419-446.
- [2] WOLFRUM C, GERHART-HINES Z. Fueling the fire of adipose thermogenesis [J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1229-1231.
- [3] LIU H, WANG P, XU F, *et al.* The hydrophilic metabolite UMP alleviates obesity traits through a HIF2 α -ACER2-ceramide signaling axis [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(21): e2309525.
- [4] MARKO DM, CONN MO, SCHERTZER JD. Intermittent fasting influences immunity and metabolism [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2024, 35(9): 821-833.
- [5] HARNEY D J, CIELESH M, CHU R, *et al.* Proteomics analysis of adipose depots after intermittent fasting reveals visceral fat preservation mechanisms [J]. *Cell Rep*, 2021, 34(9): 108804.
- [6] MANIYADATH B, ZHANG Q, GUPTA RK, *et al.* Adipose tissue at single-cell resolution [J]. *Cell Metab*, 2023, 35(3): 386-413.
- [7] BAUERMEISTER A, MANNOCHIO-RUSSO H, COSTA-LOTUFO LV, *et al.* Mass spectrometry-based metabolomics in microbiome investigations [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2022, 20(3): 143-160.
- [8] BORNSTEIN MR, NEINAST MD, ZENG X, *et al.* Comprehensive quantification of metabolic flux during acute cold stress in mice [J]. *Cell Metab*, 2023, 35(11): 2077-2092.e6.
- [9] GAUTHIER-COLES G, VENNITTI J, ZHANG Z, *et al.* Quantitative modelling of amino acid transport and homeostasis in mammalian cells [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5282.
- [10] BODOY S, FOTIADIS D, STOEGER C, *et al.* The small SLC43 family: facilitator system I amino acid transporters and the orphan EEG1 [J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(2-3): 638-645.
- [11] KAPLAN E, ZUBEDAT S, RADZISHEVSKY I, *et al.* ASCT1 (Slc1a4) transporter is a physiologic regulator of brain D-serine and neurodevelopment [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(38): 9628-9633.
- [12] PITERE RR, VAN HEERDEN MB, PEPPER MS, *et al.* Slc7a8 deletion is protective against diet-induced obesity and attenuates lipid accumulation in multiple organs [J]. *Biology (Basel)*, 2022, 11(2): 311.
- [13] GUETG A, MARIOTTA L, BOCK L, *et al.* Essential amino acid transporter Lat4 (Slc43a2) is required for mouse development [J]. *J Physiol*, 2015, 593(5): 1273-1289.
- [14] SETTEMBRE C, PERERA RM. Lysosomes as coordinators of cellular catabolism, metabolic signalling and organ physiology [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(3): 223-245.
- [15] MIZUNOE Y, KOBAYASHI M, TAGAWA R, *et al.* Association between lysosomal dysfunction and obesity-related pathology: a key knowledge to prevent metabolic syndrome [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(15): 3688.
- [16] HU M, ZHOU N, CAI W, *et al.* Lysosomal solute and

- water transport[J].*J Cell Biol*,2022,221(11):e202109133.
- [17] WILSON JE. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function[J].*J Exp Biol*,2003,206(Pt 12):2049-2057.
- [18] LY CH, LYNCH GS, RYALL JG. A metabolic roadmap for somatic stem cell fate [J].*Cell Metab*, 2020, 31 (6) : 1052-1067.
- [19] SU K J, CHEN X Y, GONG R, *et al.* Systematic metabolomic studies identified adult adiposity biomarkers with acetylglycine associated with fat loss *in vivo*[J].*Front Mol Biosci*,2023,10:1166333.
- [20] LI Z, CHEN S, YIN B, *et al.* Intermittent fasting regulates gut microbiota and serum metabolome profiles in middle-aged mice fed high-fat diet[J].*Nutr Metab (Lond)*, 2025, 22(1):16.
- [21] CALDOW MK, HAM DJ, GODEASSI DP, *et al.* Glycine supplementation during calorie restriction accelerates fat loss and protects against further muscle loss in obese mice [J].*Clin Nutr*,2016,35(5):1118-1126.
- [22] KAZAK L, CHOUCANI 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.
- [23] YONESHIRO T, WANG Q, TAJIMA K, *et al.* BCAA catabolism in brown fat controls energy homeostasis through SLC25A44[J].*Nature*,2019,572(7771):614-619.
- [24] LOXHA L, IBRAHIM NK, STASCHE AS, *et al.* GSK3 α regulates temporally dynamic changes in ribosomal proteins upon amino acid starvation in cancer cells[J].*Int J Mol Sci*, 2023,24(17):13260.
- [25] NEWMAN J C, VERDIN E. β -hydroxybutyrate: much more than a metabolite[J].*Diabetes Res Clin Pract*,2014, 106(2):173-181.
- [26] LAEGER T, PöHLAND R, METGES CC, *et al.* The ketone body β -hydroxybutyric acid influences agouti-related peptide expression via AMP-activated protein kinase in hypothalamic GT1-7 cells[J].*J Endocrinol*,2012,213(2):193-203.
- [27] DAY EA, FORD RJ, STEINBERG GR. AMPK as a therapeutic target for treating metabolic diseases[J].*Trends Endocrinol Metab*,2017,28(8):545-560.
- [28] MOYA-GARZON MD, WANG M, LI VL, *et al.* A β -hydroxybutyrate shunt pathway generates anti-obesity ketone metabolites[J].*Cell*,2025,188(1):175-186.e20.
- [29] LV S, HU T, ZHANG R, *et al.* Rhamnose displays an anti-obesity effect through stimulation of adipose dopamine receptors and thermogenesis [J].*Diabetes*, 2023, 72 (3) : 326-335.
- [30] ZHAO M, ZHU Y, WANG H, *et al.* Recent advances on N-acetylneuraminic acid: physiological roles, applications, and biosynthesis [J].*Synth Syst Biotechnol*, 2023, 8 (3) : 509-519.
- [31] LI M, WANG Y, WEI X, *et al.* AMPK targets PDZD8 to trigger carbon source shift from glucose to glutamine [J].*Cell Res*,2024,34(10):683-706.
- [32] JOUANDIN P, MARELJA Z, SHIH YH, *et al.* Lysosomal cystine mobilization shapes the response of TORC1 and tissue growth to fasting [J].*Science*, 2022, 375 (6582) : eabc4203.
- [33] PETRUS P, LECOUTRE S, DOLLET L, *et al.* Glutamine links obesity to inflammation in human white adipose tissue[J].*Cell Metab*,2020,31(2):375-390.e11.
- [34] 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.

(收稿日期:2024-09-12; 编辑:岳頔)