# 研究论文

# 脂肪组织RAP1B敲除缓解寒冷条件下肥胖 小鼠的脂肪积累

傅寅旭<sup>1</sup> 朱辉<sup>1</sup> 王鑫波<sup>1</sup> 胡萍乙<sup>2</sup> 方毓<sup>2</sup> 周怀彬<sup>1</sup> 吕建新<sup>1,2\*</sup> (<sup>1</sup>温州医科大学检验医学院、生命科学学院,温州 325035; <sup>2</sup>杭州医学院检验医学院、生物工程学院,杭州 310053)

摘要 该研究旨在探讨RAP1B在脂肪组织细胞代谢功能调节中的作用机制。围绕高脂饮食 喂养和冷刺激处理的脂肪组织特异性Rap1b敲除小鼠,结合RAP1B敲低的3T3-L1细胞模型,系统 分析RAP1B对白色脂肪组织线粒体功能的影响。通过对比脂肪组织特异性敲除Rap1b小鼠与对照 组小鼠在脂肪组织中的体质量、脂肪组织含量、脂质代谢相关指标和体温调节能力,评估RAP1B 在脂肪组织代谢中的作用,结果表明,RAP1B缺失的小鼠在HFD喂养下夜间体温显著升高,脂肪含量下降。3T3-L1细胞实验结果显示,RAP1B敲低不影响脂肪细胞分化和脂质积累,但显著提高了 线粒体的呼吸功能和ATP产量。进一步研究发现,RAP1B缺失显著提高了小鼠脂肪组织和3T3-L1 细胞的线粒体复合体含量,脂肪组织蛋白组学结果显示氧化磷酸化和产热途径富集。这些结果表明,RAP1B缺失后可能通过增强线粒体功能改善脂肪组织的代谢能力,进而影响体温调节和脂质储 存。该研究揭示了RAP1B在脂肪组织线粒体功能调节中的关键作用,并提出RAP1B缺失后可能通过增强线粒体功能调节中的关键作用,并提出RAP1B缺失后可能通 过增强线粒体功能和改变脂质代谢状态影响肥胖的发展。

关键词 RAP1B; 肥胖; 线粒体功能; 脂肪组织; 能量代谢; 代谢性疾病

# Knockout of RAP1B in Adipose Tissue Decreases Fat Accumulation in Obese Mice under Cold Conditions

FU Yinxu<sup>1</sup>, ZHU Hui<sup>1</sup>, WANG Xinbo<sup>1</sup>, HU Pingyi<sup>2</sup>, FANG Yu<sup>2</sup>, ZHOU Huaibin<sup>1</sup>, LÜ Jianxin<sup>1,2\*</sup> (<sup>1</sup>School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; <sup>2</sup>School of Laboratory Medicine and Bioengineering, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310053, China)

**Abstract** This study aims to explore the role of RAP1B in regulating metabolic functions in adipose tissue and its implications in obesity. Using adipose tissue-specific *Rap1b* knockout mice subjected to HFD (highfat diet) feeding and cold exposure, along with RAP1B knockdown 3T3-L1 cell models, the impact of RAP1B on mitochondrial function was systematically analyzed in white adipose tissue. By comparing *Rap1b* knockout mice with control mice, body weight, fat content, lipid metabolism indicators, and thermoregulation ability were assessed in adipose tissue. Results revealed that RAP1B-deficient mice exhibited significantly elevated nocturnal body temperature and reduced fat content under HFD conditions. In 3T3-L1 cells, RAP1B knockdown did not

\*通信作者。Tel: 0577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com

收稿日期: 2024-08-15 接受日期: 2024-10-08

浙江省自然科学基金(批准号: LY24H200002)和温州市基础性科研项目(批准号: Y2023090)资助的课题

Received: August 15, 2024 Accepted: October 8, 2024

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LY24H200002) and Basic Scientific Research Projects of Wenzhou (Grant No.Y2023090)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-577-86689805, E-mail: jxlu313@163.com

affect adipocyte differentiation or lipid accumulation but significantly enhanced mitochondrial respiratory function and ATP production. Further investigations showed that RAP1B deficiency markedly increased mitochondrial complex content in both mouse adipose tissue and 3T3-L1 cells. Proteomic analysis of adipose tissue indicated enrichment in oxidative phosphorylation and thermogenic pathways. These findings suggest that RAP1B may improve adipose tissue metabolic capacity by enhancing mitochondrial function, thereby influencing thermoregulation and lipid storage. This study highlights the critical role of RAP1B in regulating mitochondrial function in adipose tissue and proposes that RAP1B may impact the development of obesity by modulating mitochondrial activity and lipid metabolism.

**Keywords** RAP1B; obesity; mitochondrial function; adipose tissue; energy metabolism; metabolic diseases

肥胖是一种全球范围内日益严重的健康问题,已 被确认为多种代谢性疾病的主要危险因素,包括2型 糖尿病、心血管疾病和某些类型的癌症[1-2]。肥胖的 发生主要是由于能量摄入超过能量消耗,从而导致多 余的能量以脂肪的形式在脂肪组织中积累<sup>[3]</sup>。白色 脂肪组织在能量储存和全身代谢稳态的维持中起着 至关重要的作用,脂肪组织参与了葡萄糖和脂肪酸的 摄取<sup>[4-5]</sup>、UCP1依赖和非依赖性解偶联呼吸<sup>[6]</sup>、线粒 体生物合成及无效肌酸循环<sup>[7]</sup>和ATP依赖性钙离子 循环<sup>[8]</sup>。白色脂肪细胞的肥大和增生是导致体内脂 肪过度累积的原因, 白色脂肪细胞参与了糖脂代谢、 氧化应激和炎症等生理病理过程[9-10]。此外,脂肪组 织的代谢功能对能量平衡和体温稳定起着关键作用, 脂肪组织在应对寒冷环境或β-肾上腺素受体激动剂 刺激下具有极强的重塑性, 白色脂肪细胞可以转化 为米色脂肪细胞,以维持正常体温<sup>[11]</sup>,脂肪组织通过 非颤抖产热将储存的能量转化为热量,脂质代谢发 生动态调节,从而帮助机体在寒冷环境下维持体温, 成为肥胖和代谢疾病治疗干预的一个新思路[12-14]。

脂肪组织的线粒体在调节脂质代谢、能量消耗 以及脂肪细胞分化等过程中发挥重要作用<sup>[15-16]</sup>。研 究表明,线粒体功能的下调是肥胖及其相关代谢疾 病的重要驱动因素之一<sup>[17]</sup>,在线粒体功能受损的情 况下,脂肪酸的氧化和能量的产生受到影响,脂质合 成和脂滴构建也会受到干扰,从而影响脂肪细胞的 功能<sup>[18-19]</sup>,因此,深入理解脂肪组织中线粒体功能的 调控机制对于探索肥胖及其并发症的治疗策略具有 重要意义。

RAP1B(RAS related protein 1B)是一种小G蛋白, 广泛参与细胞信号转导和代谢调控<sup>[20-21]</sup>。已有研究提示, RAP1B可能在调节线粒体功能方面发挥

作用,并在下丘脑、肾小管等肥胖相关的代谢异常 组织器官中发挥功能<sup>[22-25]</sup>,然而,RAP1B在脂肪组织 中的具体功能仍未得到充分揭示。基于此,本研究 旨在通过构建脂肪组织特异性敲除RAP1B小鼠模 型及3T3-L1 RAP1B敲低细胞模型,系统探讨RAP1B 在脂肪组织中的生理功能,尤其是其对线粒体功能、 脂质代谢及能量平衡的影响。我们希望通过本研究 揭示RAP1B在肥胖及其相关代谢疾病中的作用机 制,并探索其作为潜在治疗靶点的可行性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 脂肪特异性敲除Rap1b小鼠的构建

实验室前期通过LoxP-Cre系统在C57BL/6小 鼠品系中构建了Rap1b脂肪组织特异性敲除小鼠 (adipose-specific knockout, AKO)模型, 构建 AKO小 鼠模型所需的亲本 Rap1b<sup>flox/flox</sup>小鼠和 Adipoq-Cre工 具鼠购买自苏州赛业科技有限公司。Rap1b<sup>flox/flox</sup>小 鼠在Rap1b外显子5-6两侧分别添加LoxP序列,与 Adipoq-Cre工具鼠交配繁殖得到F1代小鼠,随后F1 代小鼠中的Rap1b<sup>flox/+</sup>;Adipoq-cre<sup>+/-</sup>小鼠与Rap1b<sup>flox/flox</sup> 小鼠繁殖得到F2代小鼠, F2代中Rap1b<sup>flox/flox</sup>;Adipoqcre+-小鼠即实验小鼠(后文标识为AKO小鼠),F2代 中Rap1bflox/flox;Adipoq-cre-/小鼠为对照小鼠(标识为 fl/fl小鼠)。随后提取4周龄小鼠鼠尾DNA利用LoxP 上下游引物(forward: 5'-TAA CAA GTG ACA AGG CAC AGG AAC-3', reverse: 5'-ATC CCA GAG GTA CAG CAT GAC AGA G-3'), 和 Adipoq-Cre上下游引 物(forward: 5'-GGA TGT GCC ATG TGA GTC TG-3', reverse: 5'-ACG GAC AGA AGC ATT TTC CA-3', 产 物大小为200 bp)进行基因型鉴定并配对。本研究所 涉及的动物实验均获得温州医科大学动物伦理委员

#### 会授权(批准号: xmsq2023-1021)。

#### 1.2 小鼠基础表型监测及组织样本获取

实验动物标准饮食喂养(standard diet, SD)饲料由温州医科大学实验动物中心提供,高脂饮食(high-fat diet, HFD)所用60%高脂饲料(D12492I, research diets)购自北京译成科技有限公司,8周龄的雄鼠按基因型分组后进行12周以上饮食干预。将小鼠置于12 h/12 h昼夜节律、湿度70%的小动物低温环境箱和 CLAMS代谢笼(上海达燊实业有限公司),分别监测室温(23°C)及冷刺激(6°C)下小鼠体质量变化及饮食饮水情况,用体温计检测小鼠肛温,Bruker体脂仪检测小鼠体脂成分。待解剖的小鼠提前12 h禁食,腹腔注射30 μL/g阿佛丁进行麻醉后取出各组织并称重,部分组织浸没于4%多聚甲醛中用于H&E染色,其余组织液氮速冻后存于-80°C冰箱中。

#### 1.3 H&E染色

脂肪组织放置于包埋盒中,经4%多聚甲醛于 4 °C固定24 h后依次在各级浓度乙醇中脱水,脱水 完成后进行透明化处理,在软蜡、硬蜡中浸润后进 行包埋,切片时固定于石蜡切片机上,切片厚度为 5~10 μm,而后经由脱蜡、复水、H&E染色,脱水封 片于显微镜M7000扫描观察<sup>[26]</sup>。

#### 1.4 血清生化检测

将小鼠麻醉后进行眼眶取血,颠倒5次后至少 放置30 min,室温3 000 r/min离心10 min,吸取血清 至EP管中-80 °C保存。总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、游离脂肪酸(nonesterified fatty acids, NEFA)和甘油(glycerol)检测时, 将试剂盒从4 °C取出复温,按照南京建成生物工程 研究所提供的试剂说明书分别在510 nm、500 nm等 不同波长下检测吸光度(D)值,计算含量。

#### 1.5 细胞模型构建及分化

基于 pLKO.1-puro载体构建靶向 *Rap1b*(NCBI reference sequence: NM\_024457) CDS段序列为 CCT ACG ATA GAA GAT TCT TAT的质粒,利用 质粒 DNA小提试剂盒(货号 DC 201-01)提取质粒与 P3000、Lipofectamine 3000混合转染至 293-FT工具 细胞产病毒,感染3T3-L1细胞后用4 µg/mL嘌呤霉素 处理,7天后验证模型,得到RAP1B敲低(knockdown, KD)和对照(control, Ctrl)细胞模型。3T3-L1通过一 系列试剂和培养基的处理被诱导分化为成熟的脂

肪细胞,主要试剂包括0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲 基黄嘌呤、1 μmol/L地塞米松、5 μg/mL胰岛素和 1 μmol/L罗格列酮。用0.1%明胶处理培养皿,接种 3T3-L1细胞培养至接触抑制状态,继续培养48 h后 依次加入分化培养基和维持培养基分别处理72 h, 完成分化<sup>[27-28]</sup>。

#### 1.6 细胞油红O

3T3-L1细胞分化后弃去培养基,PBS清洗细胞 后加入4%多聚甲醛室温固定10 min。然后加入新 鲜配制的油红O工作液,染色30 min后弃去染液,用 60%异丙醇洗去残余未染上的油红O染液,最后加入 PBS,于显微镜下观察拍照。

#### 1.7 蛋白免疫印迹(Western blot, WB)

收集细胞用 RIPA 裂解液冰上裂解,组织样本 剪取约50 mg在低温研磨仪中处理并裂解, 随后4 ℃ 离心取上清备用。蛋白浓度采用BCA法测定,经 由电泳、转膜、封闭等步骤,一抗4°C孵育过夜, 所用一抗稀释比例均为1:1 000, 有购自赛信通(上 海)生物试剂有限公司的抗-PPARγ抗体(2435S)、 抗-RAP1B抗体(2326S)、抗-VDAC抗体(4661S)、 抗-ACLY抗体(4332S)、抗-P-ACC抗体(3661S)、 抗-ACC抗体(3676T)、抗-FASN抗体(3180S)、 抗-SCD1抗体(2794S)、抗-ATGL抗体(2138S)、 抗-P-HSL抗体(4139S)、抗-HSL抗体(4107S)、 抗-FABP4抗体(2120S)、抗-TUBLIN抗体(9099S), 购自艾博抗(上海)贸易有限公司的抗-SDHA抗体 (ab14715)、抗-UQCRC2抗体(ab14745)、抗-MT-CYB抗体(ab219823)、抗-MT-CO1抗体(ab14705)、 抗-ATP5A抗体(ab14748)、抗-TOMM20抗体 (ab186734)、抗-ABCA1抗体(ab18180), 购自圣 克鲁斯生物技术(上海)有限公司的抗-β-ACTIN 抗体(sc-47778)、抗-GRIM19抗体(sc-365978)、 抗-TOMM70抗体(14528-1-AP)、抗-TOMM40抗 体(18409-1-AP)、抗-HSP60抗体(sc-376261),次日 放入稀释比例为1:2 000的辣根过氧化物标记的二 抗(HRP-linked), 室温孵育1~2h, ECL显色液进行 显色、曝光。

#### 1.8 非变性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳

利用洋地黄皂苷(#300410, Sigma公司)或十二 烷基-D-麦芽糖苷(A610424-0001, 生工生物工程股 份有限公司)对细胞和组织样本进行处理, 通过非变 性梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳对线粒体复合体蛋白 质进行检测,免疫印迹步骤同上,使用碱性磷酸酶标记的二抗(AP-linked)或辣根过氧化物标记的二抗(HRP-linked)进行孵育随后显色扫描。

### 1.9 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

利用 Trizol法(15596018CN, ThermoFisher Scientific公司)提取细胞和组织RNA,使用 Nanodrop 测取浓度后使用南京诺唯赞生物科技股份有限公 司转录试剂盒(R223-01)和SYBR试剂(Q311-03)按 说明书进行操作。使用基因组(DNA)小量抽提试剂 盒(D0063,上海碧云天生物技术有限公司)提取细胞 DNA,以DNA为模板进行实时荧光定量PCR检测线 粒体DNA(mitochondrial DNA,mtDNA)拷贝数。据 2<sup>-△△Ct</sup>相对定量方法计算基因的表达量,所用引物见 表1。

基因名称	引物序列(5′→3′)
Gene name	Sequence $(5' \rightarrow 3')$
Actin	F: CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC
	R: TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT
Rap1b	F: AAT TCA CAG CCA TGA GGG AC
	R: AAT GTC GAC TGT GCT GTG ATG
Ppary	F: CGC TGA TGC ACT GCC TAT GA
	R: AGA GGT CCA CAG AGC TGA TTC C
Fabp4	F: AAG GTG AAG AGC ATC ATA ACC CT
	R: TCA CGC CTT TCA TAA CAC ATT CC
Nd1	F: CGT CCC CAT TCT AAT CGC CA
	R: ATG GCG TCT GCA AAT GGT TG
Nd2	F: ATA GGG GCA TGA GGA GGA CT
	R: TGA GTA GAG TGA GGG ATG GGT T
Nd3	F: GCA TTC TGA CTC CCC CAA AT
	R: AAT GGT AGA CGT GCA GAG CTT
Nd4	F: CCC GAT GAG GGA ACC AAA CT
	R: TGA GGG CAA TTA GCA GTG GAA
Nd5	F: ATT CCA CCC CCT CAC GAC TA
	R: TGT CGT TTT GGG TGA GAG CA
Nd6	F: TGG TTT GGG AGA TTG GTT GAT G
	R: TAT TGC CGC TAC CCC AAT CC
Cyb	F: ACC TCA AAG CAA CGA AGC CTA
	R: TGG GTG TTC TAC TGG TTG GC
Col	F: TCG GAG CCC CAG ATA TAG CA
	R: TTT CCG GCT AGA GGT GGG TA
Co2	F: ACC GAG TCG TTC TGC CAA TA
	R: ATT TAG TCG GCC TGG GAT GG
Co3	F: GCC TTT TCA GCC CTC CTT CTA
	R: GGT GAG TAG GCC AAG GGT TA
Atp6	F: TGC CTC ATT CAT TAC CCC AAC A
	R: AGG CGT TTT GAG GAT GGG AA
Atp8	F: TGG CAC CTT CAC CAA AAT CAC
	R: TTG GGG TAA TGA ATG AGG CAA AT
mtDNA	F: CCT ATC ACC CTT GCC ATC AT
	R: GAG GCT GTT GCT TGT GTG AC
18s	F: TAG AGG GAC AAG TGG CGT TC
	R: CGC TGA GCC AGT CAG TGT

表1 引物序列 Table 1 Primer sequences

## **1.10** 三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP) 检测

细胞接种于6孔板中,待细胞融合度达70%~80% 收集细胞按照 Sigma公司ATP检测试剂盒(FLASC-1KT)说明书进行操作,充分裂解提取细胞ATP,于96 孔白板(#3922)中避光检测自发荧光,利用蛋白浓度 进行矫正。

#### 1.11 线粒体酶活

为了检测线粒体酶活性,首先准备所需的试剂, 按要求配制各试剂溶液并妥善保存<sup>[29]</sup>。实验前一天 更换培养基,使细胞状态达到最佳,实验开始时细胞 达70%~80%,胰酶(25200072, ThermoFisher Scientific 公司)于室温消化细胞1 min后1 800 r/min离心3 min, 通过 PBS重悬细胞沉淀进行液氮冻融以破碎细胞。 对于复合体I、II、III和IV以及柠檬酸合酶的活性测 定,分别建立不同的反应体系,在指定的波长和温度 条件下使用酶标仪进行检测<sup>[30]</sup>。

#### 1.12 细胞耗氧率检测

耗氧率(oxygen consumption rate, OCR)使用氧 电极系统Oxygraph-2k(北京华威中仪科技有限公 司)测定,为检测内源性耗氧率,首先在实验前一天 更换培养基,使细胞状态达到最佳,确保细胞密度 达70%~80%。对于内源性氧呼吸,胰酶于室温消化 细胞1 min后,收集细胞加入检测仓,读取基础氧呼 吸值。通过向检测仓中依次加入终浓度100 nmol/L 寡霉素(A606700-0005,生工生物工程股份有限公 司)、150 nmol/L碳酰氰-4-三氟甲氧基苯腙(C2920, Sigma公司)和15 nmol/L抗霉素A(#2247-50,维百 奥生物科技有限公司),分别测定ATP依赖的氧呼 吸值、线粒体最大呼吸容量和非线粒体呼吸值。

#### 1.13 蛋白组学分析

离体组织经由液氮速冻保存后,送至上海百趣 生物医学科技有限公司开展串联质谱标记(tandem mass tag, TMT)定量蛋白组学检测。质谱数据经过 生物信息学分析,匹配蛋白质数据库,识别并定量 样本中的蛋白质,以fl/fl小鼠脂肪组织蛋白含量为对 照,P值小于0.05,且变化倍数≤0.83或≥1.2为筛选标 准鉴定差异蛋白,利用京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数 据库进行通路分析。

#### 1.14 统计学分析

所有实验至少进行三次独立重复,利用Graph-

Pad Prism 9对所得结果数据进行统计学分析,表现为均数±标准误(mean±SEM),采用独立样本*t*检验进行统计学分析。ns:无统计学差异,\**P*<0.05,\*\**P*<0.01,\*\*\**P*<0.001。

#### 2 结果

#### 2.1 成功构建脂肪特异性敲除Rap1b小鼠模型

为了探究脂肪组织中RAP1B在肥胖发生 发展中所起的作用,我们分析了GEO数据库 (GSE203414)中SD和HFD喂养的小鼠的性腺脂肪 组织(gonadal white adipose tissue, gWAT)的RNA 测序结果,结果显示,来自HFD喂养小鼠的样本中 Rap1b mRNA表达水平显著增加(图1A)。GEO数据 库(GSE174475)中胰岛素抵抗人群的皮下脂肪组织 (subcutaneous white adipose tissue, sWAT)中Rap1b mRNA水平比胰岛素敏感性正常人群更高(图1B), 表明脂肪组织中的Rap1b表达与肥胖和胰岛素抵 抗成正相关。我们利用LoxP-Cre系统构建了AKO 小鼠及其对照 fl/fl小鼠 (图 1C), 根据鼠尾鉴定结果 可确定小鼠LoxP序列的成功插入,且只有AKO小 鼠表达Cre序列(图1D)。qRT-PCR和WB结果显示, 与fl/fl小鼠相比,AKO小鼠sWAT、腹膜后脂肪组 织(retroperitoneal white adipose tissue, rWAT)中 RAP1B表达量显著下降,gWAT的mRNA表达水平 无显著差异,但蛋白水平明显下降(图1E和图1F), 棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)、肝脏、 肌肉、肾脏、脾脏、心脏等组织中RAP1B表达水 平没有变化(图1G),表明脂肪组织特异性敲除小鼠 模型构建成功。

#### 2.2 HFD喂养下AKO小鼠体温增加

为了探究脂肪组织中RAP1B的敲除对机体肥 胖的影响,对fl/fl(n=6)和AKO(n=9)小鼠进行HFD喂 养,并监测每周体质量,发现HFD喂养后AKO小鼠 与fl/fl小鼠的体质量并无差异(图2A),并且各脂肪 组织器官的重量以及体脂成分也无差异(图2B和图 2C),RAP1B在脂肪组织的敲除不影响小鼠的饮食 饮水量(图2D和图2E)。我们进一步检测了HFD喂养 下小鼠血清中的TG、NEFA和TC的含量,发现AKO 小鼠与fl/fl小鼠之间的血清脂代谢相关指标无明显 差异(图2F~图2H),表明RAP1B的脂肪特异性敲除 可能不影响HFD诱导的肥胖表型。脂肪组织作为重 要的代谢器官,在调节机体温度平衡中起着重要的



A: Rap1b在SD和HFD喂养小鼠的gWAT中表达量,来自转录组测序数据库(GSE203414); B: Rap1b在胰岛素敏感(insulin-sensitive, IS)和胰岛素 抵抗(insulin-resistant, IR)人群sWAT中的表达量,来自转录组测序数据库(GSE174475); C: 脂肪组织特异性敲除Rap1b小鼠构建图; D: 鼠尾鉴定 PCR扩增产物电泳鉴定图; E: 小鼠脂肪组织Rap1b mRNA表达量; F: 小鼠脂肪组织RAP1B表达量, TUBULIN作为内参蛋白; G: 小鼠肝脏、肌肉、 肾脏、脾脏、心脏RAP1B表达量。ns: 无统计学差异, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.01。

A: *Rap1b* expression in gWAT of mice fed with SD and HFD, from GSE203414; B: *Rap1b* expression in sWAT of IS (insulin-sensitive) and IR (insulin-resistant) people, from GSE174475; C: construction diagram of adipose tissue-specific *Rap1b* knockout mice; D: identification diagram of fl/fl and AKO mice; E: *Rap1b* mRNA expression in mouse adipose tissue; F: RAP1B expression in mouse adipose tissue, TUBULIN as internal reference protein; G: RAP1B expression in mouse liver, muscle, kidney, spleen, and heart. ns: no statistical difference, \**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.001.

图1 成功构建脂肪特异性敲除*Rap1b*小鼠模型 Fig.1 A mouse model of fat-specific *Rap1b* knockout was successfully constructed

作用<sup>[31]</sup>,通过检测小鼠不同时间点的体温,我们发现AKO小鼠在夜间的体温相比fl/fl升高(图2I),提示 脂肪组织中的RAP1B缺失可能增强小鼠的机体产 热能力。

# 2.3 慢性冷刺激下HFD喂养AKO小鼠脂肪含量 下降,体温增加

脂肪组织中约有三分之一是成熟的脂肪细胞, 在白色脂肪组织区域除了分布有白色脂肪细胞外 还存在米色脂肪细胞,米色脂肪细胞和棕色脂肪细 胞都具有一定的非战栗产热能力,白色脂肪细胞在 寒冷环境及锻炼情况下可向米色脂肪细胞转化<sup>[32]</sup>。 为进一步探究在寒冷环境中RAP1B对小鼠的影响, 对HFD喂养15周的AKO和fl/fl小鼠进行为期一周的 慢性冷刺激,检测小鼠体质量无明显差异(图3A)。 通过检测小鼠脂肪成分发现,AKO小鼠gWAT质量 和体脂成分下降,瘦体质量有增加趋势(图3B和图 3C),且夜间的体温较fl/fl小鼠显著升高(图3D)。然 而,冷刺激下AKO小鼠血清中的TG、NEFA和甘 油(glycerol)的含量与fl/fl小鼠的水平无明显差异 (图3E~图3G)。随后,我们对小鼠的脂肪组织进行 H&E染色,与fl/fl小鼠相比,AKO小鼠的白色脂肪和 棕色脂肪组织没有显著的变化(图3H),表明可能存 在其他的脂肪细胞功能调控途径影响机体温度的 变化。

# 2.4 3T3-L1细胞中敲低RAP1B不影响分化及脂质累积

为了深入探究 RAP1B可能影响机体产热的分 子途径,我们利用白色脂肪前体细胞3T3-L1构建了 RAP1B敲低(KD)细胞模型(图4A和图4B)。为了探 究 RAP1B是否参与白色脂肪细胞的分化过程,我们 检测了细胞分化过程中的 RAP1B和脂肪分化特征 因子 PPARγ的表达量,随着分化的进行, PPARγ的表 达量显著上升,而RAP1B的表达量没有显著的变化, 表明分化不影响 RAP1B的表达量(图4C)。随后,我 们分别对 Ctrl和 KD细胞进行分化实验, RAP1B KD 细胞的 Rap1b mRNA在分化进程中始终保持着低



A: HFD喂养下的小鼠体质量监测; B: HFD喂养下的小鼠各脂肪组织称重; C: 小鼠体成分分析; D: 小鼠每日的饮食量; E: 小鼠每日的饮水量; F: 血清甘油三酯含量; G: 血清游离脂肪酸含量; H: 血清总胆固醇含量; I: 体温监测。ns: 无统计学差异, \**P*<0.05。 A: weight monitoring of mice fed with HFD; B: weight of adipose tissues of mice fed with HFD; C: body composition analysis of mice; D: daily diet of

mice; E: daily water intake of mice; F: serum TG content; G: serum NEFA content; H: serum TC content; I: body temperature monitoring. ns: no statistical difference, \*P<0.05.

图2 HFD喂养下AKO小鼠体温增加 Fig.2 The body temperature of AKO mice increased under HFD feeding



A: 冷刺激及HFD喂养下小鼠体质量监测; B: 冷刺激及HFD喂养下的小鼠各脂肪组织称重; C: 冷刺激下小鼠体成分分析; D: 冷刺激下小鼠体温监测; E: 血清甘油三酯含量; F: 血清游离脂肪酸含量; G: 血清甘油含量; H: HFD喂养小鼠在冷刺激下各脂肪组织的H&E染色结果图。ns: 无统计学差异, \*P<0.05。

A: weight monitoring of mice under cold stimulation and HFD feeding; B: weighing of adipose tissues of mice under cold stimulation and HFD feeding; C: body composition analysis of mice under cold stimulation; D: body temperature monitoring of mice under cold stimulation; E: serum TG content; F: serum NEFA content; G: serum glycerol content; H: H&E staining results of various adipose tissues of HFD-fed mice under cold stimulation. ns: no statistical difference, \*P < 0.05.

#### 图3 慢性冷刺激下HFD喂养AKO小鼠脂肪含量下降,体温增加

Fig.3 The fat content of HFD-fed AKO mice decreased and the body temperature increased under chronic cold stimulation



A: Ctrl和KD细胞分化过程中*Rap1b*mRNA的表达; B: Ctrl和KD细胞的RAP1B蛋白水平,内参蛋白为β-actin; C: 3T3-L1 WT细胞分化过程中 PPARγ和RAP1B蛋白的表达; D: Ctrl和KD细胞的*Rap1b*mRNA水平; E、F: Ctrl和KD细胞分化过程中*Fabp4*(E)和*Ppary*(F)mRNA的表达; G: Ctrl和KD细胞分化过程中的 PPARγ蛋白水平; H: Ctrl和KD细胞分化过程中的油红O染色。ns: 无统计学差异, \*\**P*<0.01,\*\*\**P*<0.001,\*\*\*\**P*<0.0001。

A: *Rap1b* mRNA expression during differentiation of Ctrl and KD cells; B: RAP1B protein levels in Ctrl and KD cells, with  $\beta$ -Actin as the internal reference protein; C: expression of PPAR $\gamma$  and RAP1B proteins during differentiation of 3T3-L1 WT cells; D: *Rap1b* mRNA levels in Ctrl and KD cells; E,F: *Fabp4* (E) and *Ppar\gamma* (F) mRNA expression during differentiation of Ctrl and KD cells; G: expression of PPAR $\gamma$  proteins during differentiation of Ctrl and KD cells; G: expression of PPAR $\gamma$  proteins during differentiation in Ctrl and KD cells; H: oil red O staining during differentiation of Ctrl and KD cells. ns: no statistical difference, \*\*P<0.001,\*\*\*P<0.0001.



Fig.4 Knocking down RAP1B in 3T3-L1 cells did not affect the differentiation and lipid accumulation

表达(图4D),从而排除了分化过程中因RAP1B表 达的动态变化所致差异的可能性。与Ctrl组相比, RAP1B KD细胞的分化相关基因Fabp4、Ppary的表 达在分化至2~4天时无明显差异(图4E和图4F),分化 第8天Ppary的mRNA表达下降,但其蛋白水平无改 变(图4F和图4G),且分化过程中的油红O结果显示, RAP1B KD细胞的脂滴累积未受影响(图4H)。以上 结果表明,RAP1B的稳定敲低不影响脂肪前体细胞 的分化及脂质累积。

### 2.5 RAP1B KD细胞的线粒体代谢功能增强

线粒体参与脂质合成、甘油三酯的合成以及 脂肪的β氧化<sup>[33]</sup>,脂肪组织的结构重塑和能量平衡 均离不开线粒体功能的功能维持<sup>[15]</sup>。为了充分探究 RAP1B是否通过影响线粒体功能调控脂肪组织代谢 能力,首先检测了3T3-L1细胞分化后的线粒体呼吸 能力,发现与Ctrl细胞相比,RAP1B KD细胞的基础 耗氧率、氧化磷酸化的耗氧率和最大耗氧率均显 著提高(图5A),表明RAP1B的敲低可促进细胞的线 粒体呼吸能力。检测得到RAP1B KD细胞ATP含量 相较于Ctrl细胞明显增加(图5B),与线粒体呼吸能 力增强的现象相一致。综上,我们证明RAP1B敲低 可以提高线粒体氧化磷酸化水平,进而提高线粒体 耗氧率。而后检测了细胞复合体酶活性,结果显示 RAP1B敲低增强了细胞线粒体呼吸链复合体III的 酶活性(图5C), 且复合体III、IV的蛋白亚基含量也 显著增加(图5D)。由于线粒体内膜上的呼吸链复 合体还可以组装形成超级复合体,通过BN-PAGE 进一步检测了线粒体复合体单体及超级复合体的 含量,发现线粒体呼吸链复合体III、IV含量(图5E) 和超级复合体III2+IV的含量增加(图5F)。而反映线 粒体数目的蛋白表达量(图5G)和柠檬酸合酶活性 (图5H)无差异,说明RAP1B敲低不影响细胞的线粒 体数目。RAP1B KD细胞线粒体转录水平无差异, mtDNA拷贝数有增加的趋势,但无明显差异(图5I 和图 5J),综上表明 RAP1B 敲低后 3T3-L1 细胞的耗 氧量和复合体活性的提高并不是由线粒体数目的



A: 3T3-L1细胞线粒体内源性氧呼吸检测; B: ATP含量检测; C: 线粒体呼吸链复合体酶活性; D: 线粒体复合体各蛋白亚基的含量, β-actin为内参 蛋白; E: 线粒体复合体单体的含量, TOMM70为内参蛋白; F: 线粒体超级复合体的含量; G: 线粒体数目相关蛋白的表达量; H: 线粒体柠檬酸合 酶的活性; I: 线粒体转录水平检测; J: 线粒体mtDNA拷贝数。ns: 无统计学差异, \*P<0.05,\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001,\*\*\*\*P<0.0001。 A: detection of endogenous oxygen respiration in mitochondria of 3T3-L1 cells; B: ATP content detection; C: enzyme activity of mitochondrial respiratory chain complex; D: content of each protein subunit of the mitochondrial complex, β-Actin is the internal reference protein; E: content of mitochondrial complex monomer, TOMM70 is the internal reference protein; F: content of mitochondrial supercomplexs; G: expression of proteins related to mitochondrial number; H: Activity of mitochondrial citrate synthase; I: detection of mitochondrial transcription level; J: mitochondrial mtDNA copy number. ns: no statistical difference, \*P<0.05,\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001.

#### 图5 RAP1B KD细胞的线粒体代谢功能增强

Fig.5 The mitochondrial metabolic function of RAP1B KD cells was enhanced

增加所致,而是由脂肪细胞的代谢能力的增强所致的。

# 2.6 慢性冷刺激下HFD喂养AKO小鼠脂肪组织的线粒体功能升高

随后我们在脂肪组织gWAT中同样检测了线粒

体呼吸链复合体蛋白亚基含量及复合体的含量,结果显示小鼠脂肪组织中*Rap1b*的敲除增加了复合体IV的含量(图6A),且发现复合体IV的含量有所增加(图6B),与细胞实验一致。gWAT的蛋白组学结果显示,氧化磷酸化和产热途径高度富集(图6C),推



A: 冷刺激及HFD喂养小鼠gWAT线粒体复合体各蛋白亚基的含量, VDAC为内参蛋白; B: 冷刺激及HFD喂养小鼠gWAT线粒体复合体的含量; C: gWAT差异表达蛋白的KEGG通路富集分析; D: 冷刺激及HFD喂养小鼠gWAT脂质合成分解相关蛋白表达量。

A: the content of each protein subunit of the mitochondrial complex of gWAT in cold-stimulated and HFD-fed mice, VDAC is the internal reference protein; B: the content of the mitochondrial complex of gWAT in cold-stimulated and HFD-fed mice; C: KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed proteins in gWAT; D: the expression of lipid synthesis and decomposition-related proteins in gWAT of cold-stimulated and HFD-fed mice.

图6 AKO小鼠脂肪组织线粒体复合体含量增加,脂质合成下降 Fig.6 Chronic cold stimulation increases mitochondrial function in adipose tissue of HFD-fed AKO mice

测AKO小鼠增强了gWAT的线粒体氧化磷酸化功能 和代谢功能,提高了寒冷环境中HFD喂养小鼠的体 温维持能力。此外,我们检测了gWAT的脂质合成 分解相关蛋白,结果显示与fl/fl小鼠相比,AKO小鼠 中ATP柠檬酸裂解酶(ATP-citrate lyase, ACLY)、乙 酰辅酶A羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)及 其磷酸化蛋白、脂肪酸合成酶(fatty acid synthase, FASN)等脂质合成相关蛋白的表达量均显著下降, 硬脂酰辅酶A去饱和酶1(stearoyl-CoA desaturase 1, SCD1)、脂肪甘油三酯脂肪酶(adipose triglyceride lipase, ATGL)等脂解蛋白未受影响(图6D),表明 gWAT的代谢功能的增强可能会降低体内额外的脂 肪储存需求,减少白色脂肪组织中的脂质合成,缓 解机体的脂肪过度累积,预防肥胖相关的代谢性疾 病。

## 3 讨论

肥胖是包括糖尿病和心血管疾病在内的多种 代谢疾病的主要风险因素,其根本原因在于能量摄 入与消耗之间的稳态失衡。白色脂肪组织在维持 全身能量稳态中起着关键作用<sup>[34]</sup>,肥胖相关代谢疾病的核心驱动因素之一是白色脂肪组织中线粒体功能的下调<sup>[35]</sup>,在线粒体调控脂肪组织的生成、脂滴的构建和脂质的利用过程中,线粒体起着至关重要的作用,研究表明,线粒体的数量、ATP含量以及*Ppargc-1β、Cyt c*等基因的表达水平与脂肪细胞的分化呈正相关<sup>[15-16]</sup>,近年来围绕脂肪组织线粒体功能的研究也不断开展<sup>[36]</sup>。RAP1家族的成员在能量代谢方面的调节作用不断被研究,有研究阐述了RAP1B对于线粒体功能具有调节作用<sup>[22-23]</sup>,基于这些研究,我们推测RAP1B可能参与白色脂肪组织的代谢调控,但具体机制仍待探究。

分析既往研究的数据表明, RAP1B的表达水平 在HFD喂养的小鼠gWAT中显著增加, 且在胰岛素抵 抗人群的sWAT中也表现出更高的表达水平, 这提示 RAP1B与肥胖和胰岛素抵抗呈正相关<sup>[37-38]</sup>。为了进 一步验证 RAP1B在脂肪组织中的作用, 我们构建了 脂肪组织特异性敲除*Rap1b*的小鼠模型, 并对其进行 了系统性分析。在HFD喂养下, 白色脂肪组织将会 摄取过量的能量, 导致线粒体活性氧增加、线粒体

生物合成、mtDNA含量、β氧化速率下降,而脂肪 合成分解、游离脂肪酸酯化及脂联素产生受损,并 在肝脏等其他组织器官中出现脂质异位累积[33,39], 脂肪组织中的相关蛋白可调控脂肪组织线粒体功 能,进而对抗肥胖和代谢功能障碍<sup>[40]</sup>,虽然AKO小鼠 的体质量与对照组无显著差异,但其体温却显著升 高,暗示RAP1B的缺失可能通过增强脂肪组织的产 热功能影响体温调节。文献指出,在寒冷环境下白 色脂肪细胞的米色化可增强胰岛素敏感性[41]、糖耐 量<sup>[42]</sup>,随着我们进一步的冷刺激实验表明,AKO小鼠 在寒冷环境下脂肪含量下降,体温维持能力增强,但 血清中的脂质代谢相关指标未见显著变化,这表明 RAP1B缺失可能通过其他机制调节脂肪组织的能量 代谢,未来可以进一步探讨RAP1B如何影响脂肪组 织的产热功能,以及这种作用是否与脂肪组织的代 谢状态有关,可能的机制包括脂肪细胞类型的转化 或代谢途径的改变。

通过对3T3-L1细胞的研究,我们发现RAP1B 敲低不影响脂肪细胞的分化及脂质累积, 这提示 RAP1B可能不直接参与脂肪细胞的分化过程,但却 显著增强了线粒体呼吸功能。线粒体负责细胞的呼 吸作用和产能过程,是细胞内重要的细胞器,参与脂 肪组织的生成、脂滴的构建以及脂质的利用过程[43]。 KD细胞中复合体III和IV的活性及其超级复合体的 组装量增加,猜测线粒体呼吸能力的增强可能是由 于RAP1B敲低后复合体I、II与复合体III、IV之间的 联系更为紧密,使得电子传递链中的电子转运效率 提高,但仍需进一步研究呼吸复合物的高阶结构组 装以证明该假设[44]。前期有研究发现腺苷酸激活蛋 白激酶(adenosine 5'-monophosphate activated protein kinase, AMPK)和乙酰辅酶A羧化酶涉及到的代谢途 径均会影响线粒体功能进而调节脂质代谢[45-46],这 提示敲低RAP1B改善脂质累积的机制可能与代谢通 路的改变有关。此外,在脂肪组织特异性Rap1b敲除 小鼠中,我们同样观察到线粒体复合体的含量增加, 脂质合成途径受到抑制,而氧化磷酸化和产热途径 则显著富集。近年来发现脂肪组织过氧化物酶体生 物合成因子Pex16<sup>[12]</sup>、血管生成因子VEGF-A<sup>[47]</sup>和 PR结构域蛋白16<sup>[48]</sup>也可能通过调节线粒体功能来 调节产热,这提示RAP1B的降低可能通过增强线粒 体功能提升脂肪细胞的代谢能力,这可能是在低温

环境下缓解脂质累积的机制之一。同时gWAT的代谢功能提升有助于减少额外的脂肪储存需求,这一发现支持了RAP1B在脂肪细胞代谢中的潜在作用, 未来的研究可以从分子结构水平深入分析RAP1B对 线粒体功能的调控机制。

总的来说,本研究揭示了RAP1B在脂肪组织中 的多重作用,包括其在肥胖中的潜在影响,以及初步 探索了RAP1B调控线粒体功能和脂质代谢调控能量 平衡的机制。表明了基于线粒体功能调控脂肪代谢 稳态有望对肥胖的发生发展进行干预,这为进一步 研究RAP1B作为肥胖及其相关代谢疾病的治疗靶点 提供了新的视角。

#### 参考文献 (References)

- HOFFMAN D J, POWELL T L, BARRETT E S, et al. Developmental origins of metabolic diseases [J]. Physiol Rev, 2021, 101(3): 739-95.
- [2] MANOHARAN M P, RAJA R, JAMIL A, et al. Obesity and coronary artery disease: an updated systematic review 2022 [J]. Cureus, 2022, 14(9): e29480.
- [3] HOLLSTEIN T, VINALES K, CHEN K Y, et al. Reduced brown adipose tissue activity during cold exposure is a metabolic feature of the human thrifty phenotype [J]. Metabolism, 2021, 117: 154709.
- [4] HIMMS-HAGEN J. Role of thermogenesis in the regulation of energy balance in relation to obesity [J]. Can J Physiol Pharmacol, 1989, 67(4): 394-401.
- [5] KAJIMURA S, SPIEGELMAN B M, SEALE P. Brown and beige fat: physiological roles beyond heat Generation [J]. Cell Metab, 2015, 22(4): 546-59.
- [6] LONG J Z, SVENSSON K J, BATEMAN L A, et al. The secreted enzyme PM20D1 regulates lipidated amino acid uncouplers of mitochondria [J]. Cell, 2016, 166(2): 424-35.
- [7] KAZAK L, CHOUCHANI E T, LU G Z, et al. Genetic depletion of adipocyte creatine metabolism inhibits diet-induced thermogenesis and drives obesity [J]. Cell Metab, 2017, 26(4): 693.
- [8] 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): 1454-65.
- [9] SCHEJA L, HEEREN J. Metabolic interplay between white, beige, brown adipocytes and the liver [J]. J Hepatol, 2016, 64(5): 1176-86.
- [10] 何永, 付绍婷, 王晓慧. MSTN对肥胖, 糖尿病发生发展的影响 和机制以及运动对MSTN的调控[J]. 中国细胞生物学学报(HE Y, FU S T, WANG X H. The roles and mechanisms of MSTN in the developments of obesity and diabetes mellitus and the regulation of exercise on MSTN [J]. Chin J Cell Biol), 2023, 45(3): 482-90.
- [11] SUN W, MODICA S, DONG H, et al. Plasticity and heterogeneity of thermogenic adipose tissue [J]. Nat Metab, 2021, 3(6): 751-

61.

- [12] PARK H, HE A, TAN M, et al. Peroxisome-derived lipids regulate adipose thermogenesis by mediating cold-induced mitochondrial fission [J]. J Clin Invest, 2019, 129(2): 694-711.
- [13] SØBERG S, LÖFGREN J, PHILIPSEN F E, et al. Altered brown fat thermoregulation and enhanced cold-induced thermogenesis in young, healthy, winter-swimming men [J]. Cell Rep Med, 2021, 2(10): 100408.
- [14] BETZ M J, ENERBÄCK S. Targeting thermogenesis in brown fat and muscle to treat obesity and metabolic disease [J]. Nat Rev Endocrinol, 2018, 14(2): 77-87.
- [15] ZHU Q, AN Y A, SCHERER P E. Mitochondrial regulation and white adipose tissue homeostasis [J]. Trends Cell Biol, 2022, 32(4): 351-64.
- [16] JOFFIN N, PASCHOAL V A, GLINIAK C M, et al. Mitochondrial metabolism is a key regulator of the fibro-inflammatory and adipogenic stromal subpopulations in white adipose tissue [J]. Cell Stem Cell, 2021, 28(4): 702-17,e8.
- [17] LAVIE C J, ARENA R, ALPERT M A, et al. Management of cardiovascular diseases in patients with obesity [J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(1): 45-56.
- [18] WANG Y, TANG B, LONG L, et al. Improvement of obesityassociated disorders by a small-molecule drug targeting mitochondria of adipose tissue macrophages [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 102.
- [19] FENG J, LI L, OU Z, et al. IL-25 stimulates M2 macrophage polarization and thereby promotes mitochondrial respiratory capacity and lipolysis in adipose tissues against obesity [J]. Cell Mol Immunol, 2018, 15(5): 493-505.
- [20] SAHYOUN N, MCDONALD O B, FARRELL F, et al. Phosphorylation of a Ras-related GTP-binding protein, Rap-1b, by a neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase, CaM kinase Gr [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(7): 2643-7.
- [21] STEFANINI L, BERGMEIER W. RAP1-GTPase signaling and platelet function [J]. J Mol Med, 2016, 94(1): 13-9.
- [22] XIAO L, ZHU X, YANG S, et al. Rap1 ameliorates renal tubular injury in diabetic nephropathy [J]. Diabetes, 2014, 63(4): 1366-80.
- [23] SUN L, XIE P, WADA J, et al. Rap1b GTPase ameliorates glucose-induced mitochondrial dysfunction [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(12): 2293-301.
- [24] KANEKO K, XU P, CORDONIER E L, et al. Neuronal Rap1 regulates energy balance, glucose homeostasis, and leptin actions [J]. Cell Rep, 2016, 16(11): 3003-15.
- [25] KANEKO K, FU Y, LIN H Y, et al. Gut-derived GIP activates central Rap1 to impair neural leptin sensitivity during overnutrition [J]. J Clin Invest, 2019, 129(9): 3786-91.
- [26] DU M, LI X, XIAO F, et al. Serine active site containing protein 1 depletion alters lipid metabolism and protects against high fat diet-induced obesity in mice [J]. Metabolism, 2022, 134: 155244.
- [27] ZHAO Q, LUO T, GAO F, et al. GRP75 regulates mitochondrialsupercomplex turnover to modulate insulin sensitivity [J]. Diabetes, 2022, 71(2): 233-48.
- [28] LEE J E, SCHMIDT H, LAI B, et al. Transcriptional and epigenomic regulation of adipogenesis [J]. Mol Cell Biol, 2019, 39(11): e00601-18.

- [29] FANG H, XIE A, DU M, et al. SERAC1 is a component of the mitochondrial serine transporter complex required for the maintenance of mitochondrial DNA [J]. Sci Transl Med, 2022, 14(634): eabl6992.
- [30] FRAZIER A E, THORBURN D R. Biochemical analyses of the electron transport chain complexes by spectrophotometry [J]. Methods Mol Biol, 2012, 837: 49-62.
- [31] SHI M, HUANG X Y, REN X Y, et al. AIDA directly connects sympathetic innervation to adaptive thermogenesis by UCP1 [J]. Nat Cell Biol, 2021, 23(3): 268-77.
- [32] CHOUCHANI E T, KAJIMURA S. Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue [J]. Nat Metab, 2019, 1(2): 189-200.
- [33] BOUDINA S, GRAHAM T E. Mitochondrial function/dysfunction in white adipose tissue [J]. Exp Physiol, 2014, 99(9): 1168-78.
- [34] GONZÁLEZ-MUNIESA P, MÁRTINEZ-GONZÁLEZ M A, HU F B, et al. Obesity [J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17034.
- [35] HEINONEN S, JOKINEN R, RISSANEN A, et al. White adipose tissue mitochondrial metabolism in health and in obesity [J]. Obes Rev, 2020, 21(2): e12958.
- [36] 邓小杰, 王甜, 徐芬, 等. SIRT1介导间歇性禁食改善高脂饮食 诱导的肥胖小鼠脂肪组织线粒体功能和炎症状态[J]. 新医学 (DENG X J, WANG T, XU F, et al. SIRT1-mediated intermittent fasting improves adipose tissue mitochondrial function and inflammation in high-fat diet-induced obese mice [J]. J New Med), 2023, 54(4): 7.
- [37] EMONT M P, JACOBS C, ESSENE A L, et al. A single-cell atlas of human and mouse white adipose tissue [J]. Nature, 2022, 603(7903): 926-33.
- [38] MASSEY W J, VARADHARAJAN V, BANERJEE R, et al. MBOAT7-driven lysophosphatidylinositol acylation in adipocytes contributes to systemic glucose homeostasis [J]. J Lipid Res, 2023, 64(4): 100349.
- [39] KUSMINSKI C M, SCHERER P E. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue [J]. Trends Endocrinol Metab, 2012, 23(9): 435-43.
- [40] ZHOU Z, MOORE T M, DREW B G, et al. Estrogen receptor α controls metabolism in white and brown adipocytes by regulating Polg1 and mitochondrial remodeling [J]. Sci Transl Med, 2020, 12(555): eaax8096.
- [41] CHONDRONIKOLA M, VOLPI E, BØRSHEIM E, et al. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans [J]. Diabetes, 2014, 63(12): 4089-99.
- [42] KUSMINSKI C M, BICKEL P E, SCHERER P E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes [J]. Nat Rev Drug Discov, 2016, 15(9): 639-60.
- [43] BENADOR I Y, VELIOVA M, LIESA M, et al. Mitochondria bound to lipid droplets: where mitochondrial dynamics regulate lipid storage and utilization [J]. Cell Metab, 2019, 29(4): 827-35.
- [44] VERCELLINO I, SAZANOV L A. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022, 23(2): 141-61.
- [45] LIU H Y, CHANG C F, LU C C, et al. The role of mitochondrial metabolism, AMPK-SIRT mediated pathway, lncRNA and microRNA in osteoarthritis [J]. Biomedicines, 2022, 10(7): 1477.
- [46] LOVY A, AHUMADA-CASTRO U, BUSTOS G, et al. Concert-

ed action of AMPK and sirtuin-1 induces mitochondrial fragmentation upon inhibition of Ca<sup>2+</sup> transfer to mitochondria [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 378.

[47] MAHDAVIANI K, CHESS D, WU Y, et al. Autocrine effect of vascular endothelial growth factor-A is essential for mitochondrial function in brown adipocytes [J]. Metabolism, 2016, 65(1): 26-35.

[48] KISSIG M, ISHIBASHI J, HARMS M J, et al. PRDM16 represses the type I interferon response in adipocytes to promote mitochondrial and thermogenic programing [J]. EMBO J, 2017, 36(11): 1528-42.