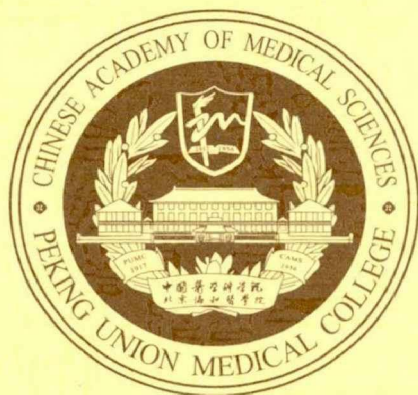


北京協和醫學院
中國醫藥科學院

博士研究生學位論文



北京協和醫學院研究生院

学校代码: 10023

学 号: B2017009014

学位论文编号: 0903

博 士 学 位 论 文

Trib1 调节棕色脂肪能量代谢的分子机制及小檗碱干预 作用研究

Molecular mechanism of *Trib1* regulating brown fat energy metabolism and the intervention effect of berberine

所 院: 药用植物研究所

姓 名: 张雪涟

指导教师: 孙晓波

学科专业: 生药学

研究方向: 脂肪代谢

完成日期: 2022 年 4 月

目 录

摘要	1
Abstract.....	4
英文缩略词	8
引言	11
第一章 调控 db/db 肥胖小鼠脂质代谢的基因及其在体内外脂肪细胞中的表达变化研究	19
第一节 脂质代谢障碍发展过程中的共同差异基因	19
1 实验材料	19
2 实验方法	20
2.1 db/db 小鼠心脏组织分离取材	20
2.2 db/db 小鼠心脏 RNA 提取	20
2.3 RNA-Sequencing 检测	20
2.4 统计学分析	21
3 实验结果	21
3.1 不同月龄 db/db 小鼠转录组共同差异基因	21
3.2 <i>Trib1</i> 在 db/db 小鼠心肌组织的变化	22
4 小结	22
第二节 <i>Trib1</i> 在 C57BL/6J 小鼠各组织的表达以及对棕色脂肪产热的作用研究	23
1 实验材料	23
2 实验方法	24
2.1 C57BL/6J 小鼠脂肪及其他组织分离取材	24
2.2 C57BL/6J 小鼠组织基因表达水平测定	24
2.3 肾上腺素配置与 C57BL/6J 小鼠分组	26
2.4 C57BL/6J 小鼠脂肪组织 HE 染色	27
2.5 Western blot 检测 TRIB1 和产热蛋白的表达	27
2.6 统计学分析	28
3 实验结果	28
3.1 <i>Trib1</i> 在 C57BL/6J 小鼠各组织器官中的表达水平	28
3.2 冷刺激和肾上腺素对正常 C57BL/6J 小鼠脂肪组织的影响	29
3.3 冷暴露和肾上腺素对 <i>Trib1</i> 和产热基因的影响	30

3.4 冷刺激和肾上腺素对 TRIB1 和产热蛋白的影响	30
4 小结	31
第三节 3T3-L1 脂肪前体细胞诱导分化对 <i>Trib1</i> 表达的影响	32
1 实验材料	32
2 实验方法	33
2.1 3T3-L1 脂肪细胞诱导分化及脂滴油红染色	33
2.2 RT-PCR 检测不同时间段 3T3-L1 细胞样本中 <i>Trib1</i> 的基因表达	33
2.3 统计学分析	34
3 实验结果	34
3.1 <i>Trib1</i> 在 3T3-L1 脂肪细胞不同分化阶段中的表达水平	34
4 小结	35
讨论	35
结论	37
参考文献	37
第二章 <i>Trib1</i> 敲除对小鼠棕色脂肪组织代谢功能的作用研究	41
第一节 <i>Trib1</i> 敲除小鼠的构建及繁育鉴定	41
1 实验材料	41
2 实验方法	42
2.1 <i>Trib1</i> 敲除小鼠的构建	42
2.2 PCR 鉴定小鼠基因型	43
3 实验结果	45
3.1 <i>Trib1</i> 敲除小鼠的鉴定	45
3.2 <i>Trib1</i> 敲除小鼠各基因型出生率及性别比例	45
4 小结	46
第二节 <i>Trib1</i> 敲除对小鼠体重、血脂和产热的影响	47
1 实验材料	47
2 实验方法	48
2.1 <i>Trib1</i> 敲除小鼠脂肪组织分离取材	48
2.2 体脂仪测定 <i>Trib1</i> 敲除小鼠体脂比率	48
2.3 <i>Trib1</i> 敲除小鼠脂肪和肝脏组织 HE 染色	48
2.4 <i>Trib1</i> 敲除小鼠肝脏组织油红染色	48
2.5 生化仪检测 <i>Trib1</i> 敲除小鼠血脂水平	48
2.6 ELISA 法检测 <i>Trib1</i> 敲除小鼠血清瘦素、胰岛素和脂联素水平	49
2.7 动物代谢分析系统检测 <i>Trib1</i> 敲除小鼠呼吸代谢水平	49

2.8 寒冷环境小鼠体温检测	49
2.9 统计学分析	49
3 实验结果	49
3.1 <i>Trib1</i> 敲除对小鼠体重、体脂和脏器系数的影响	49
3.2 <i>Trib1</i> 敲除对血脂和脂肪因子的影响	50
3.3 <i>Trib1</i> 敲除对小鼠肝脏组织的影响	51
3.4 <i>Trib1</i> 敲除对小鼠脂肪组织的影响	51
3.5 <i>Trib1</i> 敲除对小鼠呼吸代谢的影响	52
3.6 <i>Trib1</i> 敲除对小鼠在寒冷环境中适应性产热的影响	53
4 小结	53
第三节 肾上腺素处理对 <i>Trib1</i> 敲除小鼠棕色脂肪组织代谢水平的影响	54
1 实验材料	54
2 实验方法	55
2.1 肾上腺素配置与动物处理	55
2.2 <i>Trib1</i> 敲除小鼠脂肪组织分离取材及样本制备	55
2.3 体脂仪测定 <i>Trib1</i> 敲除小鼠体脂比率	55
2.4 <i>Trib1</i> 敲除小鼠脂肪和肝脏组织 HE 染色	55
2.5 <i>Trib1</i> 敲除小鼠肝脏组织油红染色	55
2.6 生化仪检测 <i>Trib1</i> 敲除小鼠血脂和肝损伤水平	55
2.7 动物代谢分析系统检测 <i>Trib1</i> 敲除小鼠呼吸代谢水平	55
2.8 寒冷环境小鼠体温检测	56
2.9 RT-PCR 检测 <i>Trib1</i> 和产热基因的表达	56
2.10 透射电镜观测 <i>Trib1</i> 敲除小鼠脂肪组织线粒体结构	56
2.11 统计学分析	56
3 实验结果	56
3.1 小鼠体重、体脂和脏器系数的影响	56
3.2 血脂和肝损伤水平的影响	57
3.3 小鼠肝脏组织的影响	57
3.4 小鼠脂肪组织的影响	58
3.5 小鼠呼吸代谢的影响	59
3.6 小鼠在寒冷环境中适应性产热的影响	59
3.7 小鼠产热基因的影响	60
3.8 小鼠 BAT 线粒体结构的影响	60
4 小结	61

讨论	61
结论	63
参考文献	64
第三章 <i>Trib1</i> 调控小鼠棕色脂肪组织能量代谢的分子机制研究	66
第一节 利用 RNA-Sequencing 探讨 <i>Trib1</i> 调控的关键分子	66
1 实验材料	66
2 实验方法	67
2.1 <i>Trib1</i> 敲除小鼠棕色脂肪组织分离取材及样本制备	67
2.2 <i>Trib1</i> 敲除小鼠棕色脂肪 RNA 提取及 RNA-Sequencing 检测	67
2.3 <i>Trib1</i> 原核表达质粒构建和 TRIB1-GST 蛋白表达	68
2.4 <i>Trib1</i> 敲除小鼠棕色脂肪 Pull Down 实验检测靶蛋白	70
2.5 统计学分析	71
3 实验结果	71
3.1 <i>Trib1</i> 敲除小鼠棕色脂肪组织表达谱及 KEGG 分析	71
3.2 <i>Trib1</i> 调节棕色脂肪组织的关键分子	72
4 小结	73
第二节 <i>Trib1</i> 敲除对棕色脂肪线粒体呼吸链的影响	74
1 实验材料	74
2 实验方法	75
2.1 <i>Trib1</i> 敲除小鼠棕色脂肪组织分离取材及样本制备	75
2.2 Western blot 检测线粒体呼吸链和动力学蛋白的表达	75
2.3 RT-PCR 检测线粒体呼吸链、动力学和脂质代谢基因的表达	75
2.4 线粒体复合物酶活性检测	76
2.5 棕色脂肪组织 ATP 水平检测	76
2.6 统计学分析	77
3 实验结果	77
3.1 <i>Trib1</i> 敲除对小鼠棕色脂肪线粒体呼吸链蛋白和基因的影响	77
3.2 <i>Trib1</i> 敲除对小鼠棕色脂肪 ATP 水平和呼吸链复合物III酶活性的影响	78
3.3 <i>Trib1</i> 敲除对小鼠棕色脂肪线粒体动力学蛋白和基因的影响	78
3.4 <i>Trib1</i> 敲除对小鼠棕色脂肪线粒体拷贝数和脂质代谢基因的影响	79
4 小结	80
第三节 过表达 <i>Trib1</i> 对 3T3-L1 细胞呼吸代谢水平的影响	81
1 实验材料	81
2 实验方法	81

2.1 <i>Trib1</i> 真核表达质粒构建和扩增	81
2.2 过表达 <i>Trib1</i> 的脂肪细胞 RNA 提取及 RNA-Sequencing 检测	82
2.3 3T3-L1 脂肪细胞诱导分化及脂滴油红染色	83
2.4 Mitotracker 线粒体染色检测脂肪细胞线粒体数目	83
2.5 Seahorse 能量代谢仪检测脂肪细胞呼吸代谢水平	83
2.6 统计学分析	84
3 实验结果	84
3.1 过表达 <i>Trib1</i> 对 3T3-L1 脂肪细胞脂滴形成的影响	84
3.2 过表达 <i>Trib1</i> 的脂肪细胞表达谱及 KEGG 分析	85
3.3 过表达 <i>Trib1</i> 对 3T3-L1 脂肪细胞线粒体数目的影响	86
3.4 过表达 <i>Trib1</i> 对 3T3-L1 脂肪细胞呼吸代谢水平的影响	87
4 小结	88
讨论	88
结论	90
参考文献	90
第四章 小檗碱调控棕色脂肪功能抑制肥胖的作用研究	93
第一节 小檗碱对肥胖小鼠体重、血脂和炎症的影响	94
1 实验材料	94
2 实验方法	95
2.1 ob/ob 小鼠分组和给药	95
2.2 ob/ob 小鼠胰岛素敏感性和葡萄糖耐量检测	95
2.3 体脂仪测定 ob/ob 小鼠体脂比率	95
2.4 ob/ob 小鼠组织分离取材及样本制备	95
2.5 ob/ob 小鼠脂肪和肝脏组织 HE 染色	95
2.6 ob/ob 小鼠肝脏组织油红染色	96
2.7 生化仪检测 ob/ob 小鼠血脂和肝损伤水平	96
2.8 ELISA 法检测 ob/ob 小鼠血清瘦素、胰岛素和脂联素水平	96
2.9 ELISA 法检测 ob/ob 小鼠血清炎症因子水平	96
2.10 统计学分析	96
3 实验结果	96
3.1 小檗碱对 ob/ob 小鼠体重、体脂和脏器系数的影响	96
3.2 小檗碱对 ob/ob 小鼠胰岛素敏感性和葡萄糖耐量的影响	97
3.3 小檗碱对 ob/ob 小鼠脂肪组织的影响	98
3.4 小檗碱对 ob/ob 小鼠肝脏组织的影响	99

3.5 小檗碱对 ob/ob 小鼠血脂和肝损伤水平的影响	99
3.6 小檗碱对 ob/ob 小鼠血清瘦素、胰岛素和脂联素的影响	100
3.7 小檗碱对 ob/ob 小鼠血清炎症因子的影响	101
4 小结	101
第二节 小檗碱对肥胖小鼠棕色脂肪组织能量代谢的影响	102
1 实验材料	102
2 实验方法	102
2.1 动物代谢分析系统检测 ob/ob 小鼠呼吸代谢水平	102
2.2 寒冷环境 ob/ob 小鼠体温检测	102
2.3 RT-PCR 检测目的基因的表达	103
2.4 Western blot 检测目的蛋白的表达	103
2.5 统计学分析	103
3 实验结果	103
3.1 小檗碱对 ob/ob 小鼠呼吸代谢的影响	103
3.2 小檗碱对 ob/ob 小鼠在寒冷环境中适应性产热的影响	104
3.3 小檗碱对 ob/ob 小鼠产热蛋白的影响	105
3.4 小檗碱对 ob/ob 小鼠脂肪代谢基因的影响	105
3.5 小檗碱对 ob/ob 小鼠 <i>Trib1</i> 和线粒体功能基因的影响	106
3.6 小檗碱对 ob/ob 小鼠 TRIB1 和线粒体功能蛋白的影响	106
4 小结	107
第三节 <i>Trib1</i> 敲低对小檗碱调控能量代谢的影响	108
1 实验材料	108
2 实验方法	108
2.1 敲低 <i>Trib1</i> 的 3T3-L1 脂肪细胞 Bodipy 染色	108
2.2 Seahorse 能量代谢仪检测敲低 <i>Trib1</i> 的脂肪细胞呼吸代谢水平	108
2.3 PCR 检测敲低 <i>Trib1</i> 的脂肪细胞脂肪合成分解基因的表达	109
2.4 统计学分析	109
3 实验结果	109
3.1 <i>Trib1</i> 敲低对小檗碱处理的脂肪细胞脂滴的影响	109
3.2 <i>Trib1</i> 敲低对小檗碱处理的脂肪细胞呼吸代谢水平的影响	110
3.3 <i>Trib1</i> 敲低对小檗碱处理的脂肪细胞脂肪合成分解的影响	110
4 小结	111
讨论	111
结论	112

参考文献	112
讨论	116
结语与展望	119
创新点	120
文献综述一	121
文献综述二	131
附录一	147
附录二	148
附录三	153
第一节 <i>Trib1</i> 敲除小鼠代谢表型	153
第二节 <i>Trib1</i> 杂合敲除小鼠代谢表型	156
作者简历及研究成果	160
致谢	162

摘要

研究背景

随着生活饮食结构的改变和遗传因素的作用,肥胖人群数量快速上升。由于机体摄入和消耗的能量长期失衡,过多的能量以甘油三酯的形式存储在白色脂肪细胞中,表现为肥胖。目前肥胖主要通过手术或奥利司他等药物进行治疗,以减少机体能量摄入。但这产生了许多与之相关的副作用,仍缺乏行之有效的方法。因此有研究者提出可以通过增加能量消耗的方法治疗肥胖。棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)是位于人体肩胛部位的有益脂肪,包含大量线粒体,其中高水平的解偶联蛋白会消耗甘油三酯和葡萄糖产生热量,因此调控棕色脂肪功能对于治疗肥胖具有重要意义。

Tribbles homolog 1 (*Trib1*) 属于 Tribbles 假激酶家族,在肿瘤发生和巨噬细胞极化中起关键作用。全基因组分析显示 *Trib1* 表达与血脂水平高度相关,但 *Trib1* 与脂肪组织代谢之间的关系尚不明确。

小檗碱是中药黄连(*Coptis chinensis* Franch.)中分离得到的异喹啉生物碱,现代药理研究发现小檗碱可以降低肥胖小鼠的体重和血脂,改善高血脂症造成的炎症反应和胰岛素抵抗,促进棕色脂肪激活提高能量消耗,是治疗肥胖的潜在药物。有研究发现小檗碱可以通过提高小鼠肝脏 LDLR 和 TRIB1 的蛋白表达,从而降低小鼠血清甘油三酯水平,但小檗碱在 BAT 能量代谢中的作用是否与 *Trib1* 有关仍需探究。

研究目的

本课题从体内外两方面探讨 *Trib1* 对棕色脂肪组织能量代谢的调控作用,并阐明小檗碱提高棕色脂肪代谢功能治疗肥胖的分子机制,为代谢性疾病的治疗提供科学依据。

研究方法

1. 对 1、6 和 12 月龄的 db/db 小鼠心肌组织进行 RNA-Sequencing,检测脂代谢障碍发展过程中的共同差异基因并进行靶点筛选。采用 RT-PCR 测定 *Trib1* 在 C57BL/6J 小鼠各组织器官和 3T3-L1 脂肪细胞不同分化阶段中的表达水平。C57BL/6J 小鼠腹腔注射给与 β_3 -肾上腺素受体激动剂(1 mg/kg),采用 HE 染色,Western blot 和 RT-PCR 检测小鼠 *Trib1* 和产热相关蛋白及基因表达水平。
2. 采用 CRISPR/Cas9 技术建立 *Trib1* 基因敲除小鼠进行繁育,对其基因型进行鉴定。采用体脂仪,组织 HE 染色,ELISA 和动物代谢分析系统等方法检测 *Trib1* 敲除对小鼠体重、血脂和产热的影响。*Trib1* 敲除小鼠腹腔注射给与 β_3 -肾上腺素

- 受体激动剂 (1 mg/kg), 采用体脂仪, 组织油红染色, 动物代谢分析系统和透射电镜等方法检测 *Trib1* 敲除对小鼠棕色脂肪组织代谢水平的影响。
3. 通过原核质粒构建 TRIB1-GST 融合蛋白进行蛋白质体外结合实验 (Pull down assay), 并对 *Trib1* 敲除小鼠和野生型小鼠棕色脂肪组织进行转录组测序 (RNA-Sequencing), 检测 *Trib1* 调控棕色脂肪功能的关键分子。采用 Western blot, RT-PCR, 线粒体复合物酶活性检测试剂盒和 ATP 水平检测试剂盒探究 *Trib1* 敲除对棕色脂肪线粒体呼吸链的影响。进一步通过真核质粒在 3T3-L1 脂肪细胞上过表达 *Trib1*, 采用 RNA-Sequencing, 细胞油红染色, Mitotracker 线粒体染色和 Seahorse 能量代谢仪验证 *Trib1* 调控棕色脂肪功能的靶点和机制。
 4. ob/ob 小鼠灌胃给与小檗碱 (100 mg/kg) 8 周后, 采用胰岛素耐量实验, 体脂仪, 组织油红染色和 ELISA 检测小檗碱对肥胖小鼠体重、血脂和炎症的影响。通过动物代谢分析系统, 寒冷环境体温测定, RT-PCR 和 Western blot 探究小檗碱对肥胖小鼠棕色脂肪产热的影响。进一步采用 siRNA 敲低 *Trib1*, 通过 RT-PCR, Western blot, Bodipy 染色和 Seahorse 能量代谢仪检测 *Trib1* 敲低对小檗碱调控能量代谢的影响。

研究结果

1. 体内实验表明, 在 db/db 小鼠心肌组织中, 随着小鼠脂质代谢障碍的进展 *Trib1* 表达显著下调。在 C57BL/6J 小鼠棕色脂肪中, *Trib1* 的基因表达水平显著高于其他组织。在冷刺激和 β_3 -肾上腺素受体激动剂提高棕色脂肪功能的模型中, *Trib1* 的表达水平显著上升。体外实验表明, 随着 3T3-L1 脂肪细胞的脂滴蓄积增多, *Trib1* 表达逐渐降低, 表明 *Trib1* 直接参与脂肪组织代谢。
2. 利用 *Trib1* 敲除小鼠对其表型进行测定, 结果显示 *Trib1* 敲除小鼠血脂水平显著上升, 棕色脂肪细胞脂滴增大和产热关键蛋白 UCP1 表达显著降低, 并伴随着瘦素和胰岛素抵抗, 提示 *Trib1* 对棕色脂肪代谢功能具有调节作用。进一步利用 β_3 -肾上腺素受体激动剂处理 *Trib1* 敲除小鼠, 结果显示 *Trib1* 敲除损害棕色脂肪的脂质代谢和产热功能, 使小鼠棕色脂肪线粒体肿胀, 线粒体膜结构破坏。
3. 在动物水平上, 通过 RNA-Sequencing 和 Pull Down 实验发现, *Trib1* 敲除通过影响电子呼吸链活性破坏了线粒体动力学稳态, 进而导致其结构损伤和脂肪代谢功能障碍。本研究在 3T3-L1 前脂肪细胞中过表达 *Trib1* 对其进行验证。体外实验结果表明 *Trib1* 的过表达提高细胞基础代谢水平, 而加入抑制剂后 *Trib1* 的作用被抑制。
4. 小檗碱 (100 mg/kg) 口服给与 ob/ob 自发性肥胖小鼠 8 周可以显著降低小鼠的

体重和血脂水平，并提高 ob/ob 小鼠棕色脂肪中 *Trib1* 和线粒体呼吸链复合物I，II和III的表达水平，增加线粒体拷贝数和线粒体脂肪酸氧化相关基因的表达水平，提高了肥胖小鼠棕色脂肪的线粒体功能。在 3T3-L1 脂肪细胞中加入 siRNA 干扰 *Trib1* 的表达后，小檗碱减少脂滴和增加细胞呼吸代谢的能力受到抑制。

结论

Trib1 敲除可破坏小鼠棕色脂肪产热，并诱导高血脂和肥胖的发生。进一步证明 *Trib1* 敲除降低了线粒体呼吸链复合物酶活性，导致线粒体融合和分裂的失衡，随后导致线粒体结构损伤和脂质代谢功能障碍。体外过表达 *Trib1* 可以减少脂滴蓄积，增加线粒体数量，增强脂肪细胞的呼吸代谢水平。在脂肪细胞中加入 siRNA 干扰 *Trib1* 的表达后，小檗碱减少脂滴和增加细胞呼吸代谢的能力受到抑制。表明 *Trib1* 调节小鼠线粒体和棕色脂肪细胞的功能，有望成为治疗高脂血症、脂肪肝和肥胖等代谢疾病的新靶点。

关键词：肥胖；*Trib1*；棕色脂肪；小檗碱；能量代谢；电子传递链；线粒体动力学

Abstract

Background

Due to changes in lifestyle and diet and the role of genetic factors, the prevalence of obesity is increasing year by year. Due to the long-term imbalance of energy intake and consumption by the body, excess energy is stored in white fat cells in the form of triglycerides, which manifests as obesity. At present, obesity is mainly treated by surgery or drugs to reduce the body's energy intake. But this has many side effects associated with it, and proven methods are still lacking. Therefore, it has been proposed that obesity can be treated by increasing energy expenditure. Brown adipose tissue (BAT) is a beneficial fat located in the scapula of the human body, and contains a large number of mitochondria, in which high levels of uncoupling proteins consume triglycerides and glucose to generate heat, so regulating brown fat function is of great significance for the treatment of obesity. Significance.

Tribbles homolog 1 (*Trib1*) belongs to the Tribbles pseudokinase family and plays a key role in tumorigenesis and macrophage polarization. Genome-wide analysis showed that *Trib1* expression was highly correlated with blood lipid levels, but the relationship between *Trib1* and adipose tissue metabolism was unclear. Therefore, this project used CRISPR/Cas9 technology to establish *Trib1* knockout mice to explore the effect of *Trib1* on energy metabolism in brown adipose tissue.

Berberine is an isoquinoline alkaloid isolated from the traditional Chinese medicine *Coptis chinensis* Franch. Modern pharmacological studies have found that berberine can reduce the body weight and blood lipids of obese mice, and improve the inflammatory response and insulin resistance caused by hyperlipidemia. , promoting the browning of white fat and increasing energy expenditure, is a potential drug for the treatment of obesity. Some studies have found that berberine can reduce the serum triglyceride level in mice by increasing the protein expression of LDLR and TRIB1 in the liver of mice, but the effect of berberine on the energy metabolism of TRIB1 and BAT in obesity models is still unclear.

Aim

This project explored the regulatory effect of *Trib1* on energy metabolism in brown adipose tissue from both in vitro and in vivo, and clarifies the molecular mechanism of berberine to improve brown fat metabolism in the treatment of obesity, so as to provide a scientific basis for the treatment of metabolic diseases.

Methods

1. Perform RNA-Sequencing on myocardial tissue of db/db mice aged 1, 6 and 12 months to detect common differential genes in the development of dyslipidemia and conduct target screening. RT-PCR was used to determine the expression levels of *Trib1* in various tissues and organs of C57BL/6J mice and in different differentiation stages of 3T3-L1 adipocytes. C57BL/6J mice were intraperitoneally injected with β_3 -adrenoceptor agonist (1 mg/kg), and the expression levels of *Trib1* and thermogenesis-related proteins and genes were detected by HE staining, Western blot and RT-PCR.
2. Use CRISPR/Cas9 technology to establish *Trib1* knockout mice for breeding and identify their genotypes. Body fat meter, tissue HE staining, ELISA and animal metabolism analysis system were used to detect the effects of *Trib1* knockout on body weight, blood lipids and heat production in mice. *Trib1* knockout mice were intraperitoneally injected with β_3 -adrenoceptor agonist (1 mg/kg). Effects of brown adipose tissue metabolic levels.
3. The TRIB1-GST fusion protein was constructed by prokaryotic plasmids for protein binding *in vitro* (Pull down assay), and RNA-Sequencing was performed on the brown adipose tissue of *Trib1* knockout mice and wild-type mice to detect the key molecules that *Trib1* regulates brown fat function. Western blot, RT-PCR, mitochondrial complex enzyme activity detection kit and ATP level detection kit were used to explore the effect of *Trib1* knockout on brown fat mitochondrial respiratory chain. *Trib1* was further overexpressed on 3T3-L1 adipocytes by eukaryotic plasmids, and the targets and mechanisms of *Trib1* regulating brown fat function were verified by RNA-Sequencing, cell oil red staining, Mitotracker mitochondrial staining and Seahorse energy metabolism instrument.
4. After 8 weeks of oral administration of berberine (100 mg/kg) to ob/ob mice, the effect of berberine on body weight and blood lipids of obese mice was detected by insulin tolerance test, body fat meter, tissue oil red staining and ELISA. and inflammatory effects. The effects of berberine on brown fat thermogenesis in obese mice were investigated by animal metabolic analysis system, temperature measurement in cold environment, RT-PCR and Western blot. *Trib1* was further knocked down by siRNA, and the effect of *Trib1* knockdown on the regulation of energy metabolism by berberine was detected by RT-PCR, Western blot, Bodipy staining and Seahorse energy metabolism analyzer.

Results

1. *In vivo* experiments showed that in the myocardial tissue of db/db mice, the expression of *Trib1* was significantly down-regulated with the progress of lipid metabolism disorders in mice. The gene expression level of *Trib1* was significantly higher in brown fat of C57BL/6J mice than in other tissues. In a model in which cold stimulation and β_3 -adrenergic agonists enhanced brown fat function, the expression level of *Trib1* was significantly increased. *In vitro* experiments showed that with the increase of lipid droplet accumulation in 3T3-L1 adipocytes, the expression of *Trib1* gradually decreased, indicating that *Trib1* is directly involved in adipose tissue metabolism.
2. *Trib1* knockout mice were used to determine their phenotype. The results showed that *Trib1* knockout mice significantly increased blood lipid levels, increased lipid droplets in brown adipocytes, and significantly decreased the expression of the key protein UCP1, which was accompanied by leptin and insulin resistance, suggesting that *Trib1* has a regulatory effect on brown fat metabolism. *Trib1* knockout mice were further treated with β_3 -adrenoceptor agonists, and the results showed that *Trib1* knockout impairs the lipid metabolism and thermogenesis of brown fat, swells the brown fat mitochondria in mice, and destroys the mitochondrial membrane structure.
3. At the animal level, through RNA-Sequencing and Pull Down experiments, it was found that *Trib1* knockout disrupted mitochondrial dynamic homeostasis by affecting the activity of the electronic respiratory chain, resulting in structural damage and lipid metabolism dysfunction. In this study, *Trib1* was overexpressed in 3T3-L1 preadipocytes to validate it. The results of *in vitro* experiments showed that the overexpression of *Trib1* increased the basal metabolic level of cells, and the effect of *Trib1* was inhibited after adding the inhibitor.
4. Berberine treatment of ob/ob spontaneously obese mice for 8 weeks can reduce mouse body weight and blood lipid level, and increase the expression of *Trib1* and mitochondrial respiratory chain complexes I, II and III in brown fat of ob/ob mice increased mitochondrial copy number and expression levels of mitochondrial fatty acid oxidation-related genes, and enhanced mitochondrial function in brown fat in obese mice. The ability of berberine to reduce lipid droplets and increase cellular respiratory metabolism was inhibited after adding siRNA to interfere with the expression of *Trib1* in 3T3-L1 adipocytes. These findings suggest that berberine

inhibits obesity by increasing the expression of *Trib1* and promoting brown adipocyte metabolism.

Conclusions

Trib1 knockout disrupts brown fat thermogenesis and induces hyperlipidemia and obesity in mice. It was further demonstrated that *Trib1* knockdown reduced mitochondrial respiratory chain complex activity, resulting in an imbalance of mitochondrial fusion and fission, which subsequently led to mitochondrial structural damage and lipid metabolism dysfunction. Overexpression of *Trib1* in vitro can reduce lipid droplet accumulation, increase mitochondrial number, and enhance the level of respiratory metabolism in adipocytes. The ability of berberine to reduce lipid droplets and increase cellular respiratory metabolism was inhibited after adding siRNA to interfere with the expression of *Trib1* in adipocytes. It is shown that *Trib1* regulates the function of mitochondria and brown adipocytes in mice, and is expected to be a new target for the treatment of metabolic diseases such as hyperlipidemia, fatty liver and obesity.

Keywords: obesity; *Trib1*; brown fat; berberine; electron transport chain; mitochondrial dynamics

英文缩略词

缩略语	英文全称	中文名称
ACC	Acetyl-CoA carboxylase	乙酰辅酶 A 羧化酶
ACS	Acyl-CoA synthase	酰基辅酶 A 合酶
ALP	Alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
ALT	Alanine aminotransferase	丙氨酸氨基转移酶
AMP	Adenosine 5'-monophosphate	腺嘌呤核糖核苷酸
AMPK	AMP-activated protein kinase	AMP 依赖的蛋白激酶
AST	Aspartic acid transferase	天门冬氨酸氨基转移酶
ATGL	Adipose Triglyceride Lipase	脂肪甘油三酯水解酶
BAT	brown adipose tissue	棕色脂肪组织
BCAAs	branched-chain amino acids	支链氨基酸
C/EBP- α	CCAAT enhancer-binding protein alpha	CCAAT 增强子结合蛋白 α
ChREBP	carbohydrate response element binding protein	碳水化合物反应元件结合蛋白
COP1	constitutive photomorphogenesis protein 1	组成型光形态发生蛋白 1
CRP	C-reactive protein	C 反应蛋白
Ctbps	C-terminal binding proteins	C 末端结合蛋白
DEX	dexamethasone	地塞米松
DIO2	iodothyronine deiodinase II	碘甲腺原氨酸脱碘酶II
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	杜氏改良 Eagle 培养基
DRP1	dynamic related protein 1	动态相关蛋白 1
ECAR	extracellular acidification rate	细胞外酸化率
ERK	extracellular signal-regulated kinase	细胞外信号调节激酶
ETC	Electron transfer chain	电子呼吸链
eWAT	epididymal white adipose tissue	附睾白色脂肪组织
FAS	Fatty acid synthase	脂肪酸合酶
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清

FIS1	fusion protein 1	融合蛋白 1
FGF21	Fibroblast growth factor 21	成纤维细胞生长因子 21
GLP-1	glucagon-like peptide-1	胰高糖素样肽-1
GST	glutathione-S-transferase	谷胱甘肽-S-转移酶
HDL	high-density lipoprotein	高密度脂蛋白
HSL	hormone-sensitive lipase	激素敏感性甘油三酯脂肪酶
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine	3-异丁基-1-甲基黄嘌呤
IRS2	insulin receptor substrate 2	胰岛素受体底物 2
iWAT	inguinal white adipose tissue	腹股沟白色脂肪组织
LCAD	long-chain acetyl-CoA dehydrogenase	长链乙酰辅酶 A 脱氢酶
LDL	low-density lipoprotein	低密度脂蛋白
LPL	lipoprotein lipase	脂蛋白脂肪酶
MAPK	mitogen-activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶
MCAD	medium-chain acetyl-CoA dehydrogenase	中链乙酰辅酶 A 脱氢酶
MEK1	MAP kinase kinase 1	丝裂原活化蛋白激酶激酶 1
Mfn1	mitofusin 1	丝裂融合素 1
NPY	Neuropeptide Y	神经肽 Y
OCR	oxygen consumption rate	耗氧率
OPA1	optic atrophy 1	视神经萎缩 1
OXPHOS	Oxidative phosphorylation	氧化磷酸化
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲溶液
PTEN	phosphatase and tensin homolog	磷酸酶和张力蛋白同源物
PINK1	PTEN-induced kinase 1	PTEN 诱导的激酶 1
PPAR	Peroxisome proliferation-activated receptor	过氧化物酶体增殖物激活受体
PGC-1 α	PPAR γ coactivator-1 α	PPAR γ 共激活因子 1 α
PRDM16	Positive regulatory domain containing 16	PR 结构域蛋白 16
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction	实时聚合酶链反应

SCD	stearoyl-CoA desaturase	硬脂酰辅酶 A 去饱和酶
SREBP-1c	Sterol regulatory element binding protein-1c	甾醇调节元件结合蛋白 1c
T3	triiodothyronine	三碘甲状腺原氨酸
TC	total cholesterol	总胆固醇
TCA	Tricarboxylic acid cycle	三羧酸循环
TEM	transmission electron microscopy	透射电子显微镜
TG	triglyceride	甘油三酯
TNF- α	Tumour necrosis factor- α	肿瘤坏死因子 α
Trib1	Tribbles homolog 1	Tribbles 同系物 1
UCP1	uncoupling protein 1	解偶联蛋白 1
VLDL	very low density lipoprotein	极低密度脂蛋白
VCO ₂	carbon dioxide production	二氧化碳产生率
VO ₂	oxygen consumption	氧气消耗量

引言

由于生活饮食结构的改变和遗传因素的作用,肥胖人群数量逐年上升^[1]。当机体能量摄入长时间超过能量消耗时,过剩的营养物质会转化为甘油三酯储存在脂肪细胞中^[2]。这一过程伴随着脂肪干细胞的增殖分化和脂质储存增多带来的细胞肥大,最终导致脂肪组织增生。肥胖会提高心脑血管疾病、糖尿病和癌症等非传染性疾病的患病风险,严重危害人体健康。当脂肪组织扩增速度超出血管生成能力时,将导致细胞持续缺氧^[3]。缺氧诱导的细胞凋亡会募集巨噬细胞和其他免疫细胞浸润脂肪组织以清除坏死的脂肪细胞,产生炎症反应^[4,5]。通过免疫细胞浸润表达的炎性介质进一步在脂肪组织中诱导胰岛素抵抗,损害了脂肪组织的代谢功能^[6]。慢性炎症的持续将诱导组织纤维化反应,胶原蛋白和细胞外基质蛋白的沉积限制了脂肪细胞的肥大能力,致使脂肪组织脂质储存和代谢能力降低,加剧脂肪组织功能障碍^[7]。溢出的脂质进入机体循环,在其他组织中持续造成脂毒性和炎症,最终导致全身性代谢紊乱^[8]。

目前肥胖主要是通过手术或药物治疗,以减少机体能量摄入。但现在用于治疗肥胖的药物十分有限,目前美国 FDA 批准可长期控制体重的药物仅有 Orlistat (奥利司他)、Liraglutide (利拉鲁肽)、Lorcaserin (氯卡色林) 和 Qsymia (芬特明/托吡酯复方缓释片) 四种^[9]。其中 Orlistat 是肠道脂肪酶抑制剂,通过减少食物中脂肪的吸收到达减重的目的,长期使用会造成脂溶性维生素的缺乏^[10,11]。Liraglutide 为胰高糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 类似物,伴有低血糖和急性胰腺炎的风险,且单一的注射剂型不利于长期使用^[12]。Lorcaserin 作用于 5-HT_{2C} 受体为拟交感神经类药物,可以减少食欲,但其长期使用有潜在的心脏瓣膜病和癌症风险^[13,14]。Qsymia 为中枢神经类减肥药,伴有头痛、失眠、便秘和眩晕等副作用^[15,16]。回顾目前用于治疗肥胖的药物和手术等,多是从减少能量摄入的方面治疗肥胖,也产生了许多与之相关的副作用^[17]。因此增加能量消耗已成为治疗肥胖症的一种有效策略。

哺乳动物的脂肪主要有两种类型,即储能型的白色脂肪组织 (white adipose tissue, WAT) 和耗能的棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT) ^[18,19]。其中 WAT 将机体多余的能量转化为甘油三酸酯存储在细胞脂滴中,表现为单泡大脂滴,细胞器少。WAT 由于储存部位的不同,分为皮下白色脂肪组织 (inguinal white adipose tissue, iWAT) 和腹腔白色脂肪组织 (epididymal white adipose tissue, eWAT)。而 BAT 脂滴小而分散,表现为多泡小脂滴。BAT 包含大量线粒体,其中高水平的解偶联蛋白 1 (Uncoupling protein 1, UCP1) 会以非战栗性产热的方式消耗甘油三酯和葡萄糖产生热量^[20]。最近,在 WAT 中发现了第三种类型的脂肪细胞,称为米色脂肪细胞,

它与 BAT 相似, 具有高水平的 UCP1。但不同于白色和米色脂肪组织, 棕色脂肪来源于 Myf5⁺和 Pax7⁺的近轴中胚层祖细胞, 与骨骼肌细胞具有相同的来源^[21-23]。

线粒体是棕色脂肪的关键细胞器, 可以响应于外界环境和体内激素水平调节能量代谢, 是葡萄糖和脂质代谢的中心^[24, 25]。丙酮酸氧化、脂肪酸 β -氧化、三羧酸循环和氧化磷酸化, 都发生在线粒体中, 线粒体功能的正常对于维持棕色脂肪功能和机体代谢稳态都是必需的^[26, 27]。线粒体具有双层膜结构, 线粒体外膜和内膜由膜间隙隔开, 内膜向线粒体基质折褶形成嵴增加内膜生化反应的表面积。来自食物的葡萄糖和脂肪酸分别通过三羧酸循环 (Tricarboxylic acid cycle, TCA) 和脂肪酸 β -氧化在线粒体内被氧化脱电子, 由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 和黄素腺嘌呤二核苷酸 (Flavin adenine dinucleotide, FAD) 接受电子转化为 NADH 和 FADH₂。随后 NADH 和 FADH₂ 将电子传递给线粒体电子呼吸链 (Electron transfer chain, ETC), 经由内膜中线粒体复合物 I 到 V 传递。当电子沿着 ETC 传递时, 释放的自由能用于将复合物 I、III 和 IV 处的质子从线粒体基质泵送到膜间空间, 从而产生质子电化学梯度。质子在复合物 V (ATP 合酶) 处沿其浓度梯度扩散, 其中通过内膜的质子驱动释放的能量用于生成 ATP^[28, 29]。而棕色脂肪中高水平的 UCP1 具有跨线粒体膜破坏质子电化学梯度的能力, 从而使氧化磷酸化解偶联产生热量^[30]。线粒体是一个高度动态化的细胞器, 会随着不同的生理状态而发生改变。线粒体质量和功能的维持与线粒体动力学 (包括线粒体融合、分裂和自噬) 密切相关^[31]。研究发现, 在肥胖人群和肥胖小鼠模型的脂肪组织中表现出线粒体动力学失衡, 氧化磷酸化水平降低和线粒体脂质代谢功能障碍^[32]。

尽管棕色和白色脂肪细胞的胚胎起源和生理功能存在差异, 但两种细胞类型都具有相似的转录级联反应, 可控制终末分化为成熟脂肪细胞^[33]。最新进展表明, 脂肪祖细胞分化为棕色、米色或白色脂肪细胞的倾向主要由转录因子、表观遗传学和 miRNA 控制^[34-36]。其中过氧化物酶体增殖物激活受体 α (Peroxisome proliferation-activated receptor alpha, PPAR- α)、PPAR γ 共激活因子 1 α (PPAR γ coactivator-1 α , PGC-1 α)、PR 结构域蛋白 16 (Positive regulatory domain containing 16, PRDM16)、miR-196a 和 miR-193b-365 都增强棕色脂肪生成, 提高产热基因的表达, 并促进线粒体生物发生和氧化产热^[23]。但目前这些靶点在药物的开发和利用上仍十分有限, 急需寻找新的药物开发靶点。

Tribbles 同源物 1 (Tribbles homolog 1, *Trib1*) 是 Tribbles 假激酶家族的成员, 最初在果蝇中胚层有丝分裂研究中被发现, 位于人类 8q24 染色体上, 与 MYC 原癌基因位于同一基因座^[37, 38]。8q24 基因座在几种癌症类型中被扩增, 它与多种癌症的关系已有报道^[39-41]。有研究提出 *Trib1* 参与急性髓性白血病、食管癌和甲状腺癌等多种癌症的发展^[42-44] (Figure 1A)。随后 Takashi Satoh 团队发现 *Trib1* 缺失导致骨髓和

脾脏等多种器官中 M2 型巨噬细胞显著减少^[45]。后续有研究发现 *Trib1* 在单核细胞、CD4⁺ 调节性 T 细胞和活化 T 细胞中显著高表达，对嗜酸性粒细胞、中性粒细胞功能具有明确的调节作用^[46] (Figure 1B)。另外，*Trib1* 也影响 IL-2、TNF- α 等炎症因子的表达^[47, 48]，在免疫和炎症中具有重要意义。除此之外，在不同国家人群的全基因组关联分析中发现，*Trib1* 与血脂水平密切相关^[49-52]。尽管 *Trib1* 在代谢性疾病中的生理作用并不明确，但 *Trib1* 在血脂和炎症中的研究引起了极大的关注。

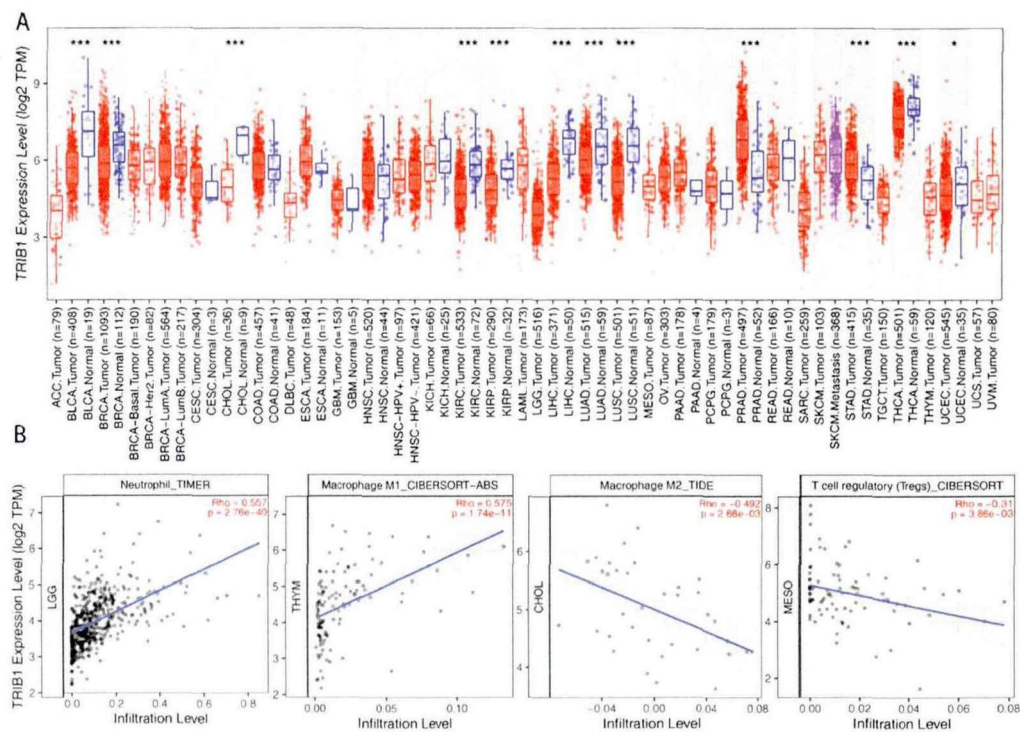


Figure 1 The role of *Trib1* in immunity and tumor. (A) Differential expression of TRIB1 between tumor tissue and adjacent normal tissue in all TCGA tumors. Distributions of gene expression levels are displayed using box plots. The statistical significance computed by the Wilcoxon test is annotated by the number of stars (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Users can identify genes that are up-regulated or down-regulated in the tumors compared to normal tissues for each cancer type, as displayed in gray columns when normal data are available. (B) Correlation of *Trib1* expression with levels of immune infiltration in different cancer types, scatter plot showing the relationship between estimated infiltration and gene expression. Data source <http://timer.comp-genomics.org/>.

小檗碱是中药黄连 (*Coptis chinensis* Franch.) 中分离得到的异喹啉类生物碱，最初用于治疗腹泻^[53]。随后有研究发现小檗碱可以通过调节肠道微生物组成和抑制 NF- κ B/MAPK 信号通路降低肥胖小鼠体内炎症水平^[54, 55]。研究发现小檗碱可以降低肥胖小鼠的体重和血脂水平，缓解高血脂症造成的脂毒性和胰岛素抵抗^[56, 57]。值得

注意的是,小檗碱可以调节 PGC-1 α , 促进白色脂肪组织棕色化, 提高脂肪组织能量代谢水平, 是治疗肥胖的潜在药物^[58,59]。重要的是, 有研究发现小檗碱可以通过提高小鼠肝脏 LDLR 和 TRIB1 的蛋白表达, 降低小鼠血清甘油三酯水平^[60]。但小檗碱在 BAT 能量代谢中的作用是否与 TRIB1 有关仍需探究。

综上, 本课题拟采用体内外模型, 探究 *Trib1* 调控棕色脂肪功能抑制肥胖的分子机制。利用 CRISPR/Cas9 技术建立 *Trib1* 基因敲除小鼠, 对其代谢表型进行测定, 探究 *Trib1* 对脂肪组织代谢的调节作用。进一步利用 β_3 -肾上腺素受体激动剂提高 *Trib1* 敲除小鼠棕色脂肪代谢功能, 探究 *Trib1* 敲除对小鼠棕色脂肪产热和能量代谢的作用。通过原核质粒构建 TRIB1-GST 融合蛋白进行 Pull down 实验, 并对 *Trib1* 敲除小鼠和野生型小鼠棕色脂肪组织进行 RNA-Sequencing, 检测 *Trib1* 调控棕色脂肪功能的关键分子。进一步通过真核质粒在 3T3-L1 脂肪细胞上过表达 *Trib1*, 对 *Trib1* 调控棕色脂肪功能进行验证。并通过 siRNA 敲低 *Trib1*, 在小檗碱处理的脂肪细胞上, 探究 *Trib1* 敲低对小檗碱调控能量代谢的影响。

参考文献

- [1] HRUBY A, MANSON J E, QI L, et al. Determinants and Consequences of Obesity [J]. Am J Public Health, 2016, 106(9): 1656-62.
- [2] FRIEDMAN J M, HALAAS J L. Leptin and the regulation of body weight in mammals [J]. Nature, 1998, 395(6704): 763-70.
- [3] VILLARET A, GALITZKY J, DECAUNES P, et al. Adipose tissue endothelial cells from obese human subjects: differences among depots in angiogenic, metabolic, and inflammatory gene expression and cellular senescence [J]. Diabetes, 2010, 59(11): 2755-63.
- [4] WAGNER M, SAMDAL STEINSKOG E S, WIIG H. Adipose tissue macrophages: the inflammatory link between obesity and cancer? [J]. Expert Opin Ther Targets, 2015, 19(4): 527-38.
- [5] BOUTENS L, HOOVELD G J, DHINGRA S, et al. Unique metabolic activation of adipose tissue macrophages in obesity promotes inflammatory responses [J]. Diabetologia, 2018, 61(4): 942-53.
- [6] OLEFSKY J M, GLASS C K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance [J]. Annu Rev Physiol, 2010, 72: 219-46.
- [7] TRAYHURN P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity [J]. Physiol Rev, 2013, 93(1): 1-21.
- [8] AHMED B, SULTANA R, GREENE M W. Adipose tissue and insulin resistance in

- obese [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111315.
- [9] NARAYANASWAMI V, DWOSKIN L P. Obesity: Current and potential pharmacotherapeutics and targets [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 170: 116-47.
- [10] HALPERN B, HALPERN A. Safety assessment of FDA-approved (orlistat and lorcaserin) anti-obesity medications [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2015, 14(2): 305-15.
- [11] FILIPPATOS T D, DERDEMEZIS C S, GAZI I F, et al. Orlistat-associated adverse effects and drug interactions: a critical review [J]. *Drug Saf*, 2008, 31(1): 53-65.
- [12] CENA H, CHIOVATO L, NAPPI R E. Obesity, Polycystic Ovary Syndrome, and Infertility: A New Avenue for GLP-1 Receptor Agonists [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105(8).
- [13] GREENWAY F L, SHANAHAN W, FAIN R, et al. Safety and tolerability review of lorcaserin in clinical trials [J]. *Clin Obes*, 2016, 6(5): 285-95.
- [14] Lorcaserin [M]. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD). 2012.
- [15] SIEBENHOFER A, JEITLER K, HORVATH K, et al. Long-term effects of weight-reducing drugs in people with hypertension [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 3: CD007654.
- [16] HALPERN B, MANCINI M C. Safety assessment of combination therapies in the treatment of obesity: focus on naltrexone/bupropion extended release and phentermine-topiramate extended release [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2017, 16(1): 27-39.
- [17] BRAY G A, FRUHBECK G, RYAN D H, et al. Management of obesity [J]. *Lancet*, 2016, 387(10031): 1947-56.
- [18] MONTANARI T, POSCIC N, COLITTI M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review [J]. *Obes Rev*, 2017, 18(5): 495-513.
- [19] WANG Q A, TAO C, GUPTA R K, et al. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration [J]. *Nat Med*, 2013, 19(10): 1338-44.
- [20] VIRTANEN K A, LIDELL M E, ORAVA J, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(15): 1518-25.
- [21] LEPPER C, FAN C M. Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells [J]. *Genesis*, 2010, 48(7): 424-36.
- [22] AN Y, WANG G, DIAO Y, et al. A Molecular Switch Regulating Cell Fate Choice between Muscle Progenitor Cells and Brown Adipocytes [J]. *Dev Cell*, 2017, 41(4): 382-91 e5.

- [23] PEIRCE V, CAROBBIO S, VIDAL-PUIG A. The different shades of fat [J]. *Nature*, 2014, 510(7503): 76-83.
- [24] JUNG S M, HUNG C M, HILDEBRAND S R, et al. Non-canonical mTORC2 Signaling Regulates Brown Adipocyte Lipid Catabolism through SIRT6-FoxO1 [J]. *Mol Cell*, 2019, 75(4): 807-22 e8.
- [25] LEIRIA L O, WANG C H, LYNES M D, et al. 12-Lipoxygenase Regulates Cold Adaptation and Glucose Metabolism by Producing the Omega-3 Lipid 12-HEPE from Brown Fat [J]. *Cell Metab*, 2019, 30(4): 768-83 e7.
- [26] WANG G, MEYER J G, CAI W, et al. Regulation of UCP1 and Mitochondrial Metabolism in Brown Adipose Tissue by Reversible Succinylation [J]. *Mol Cell*, 2019, 74(4): 844-57 e7.
- [27] DE-LIMA-JUNIOR J C, SOUZA G F, MOURA-ASSIS A, et al. Abnormal brown adipose tissue mitochondrial structure and function in IL10 deficiency [J]. *EBioMedicine*, 2019, 39: 436-47.
- [28] 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.
- [29] FERNIE A R, CARRARI F, SWEETLOVE L J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7(3): 254-61.
- [30] DOUETTE P, GERKENS P, NAVET R, et al. Uncoupling protein 1 affects the yeast mitoproteome and oxygen free radical production [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40(2): 303-15.
- [31] EISNER V, PICARD M, HAJNOCZKY G. Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(7): 755-65.
- [32] HASLAM D W, JAMES W P. Obesity [J]. *Lancet*, 2005, 366(9492): 1197-209.
- [33] BILLON N, DANI C. Developmental origins of the adipocyte lineage: new insights from genetics and genomics studies [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2012, 8(1): 55-66.
- [34] TANG Q Q, LANE M D. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte [J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 715-36.
- [35] CRISTANCHO A G, LAZAR M A. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(11): 722-34.
- [36] LI C J, CHENG P, LIANG M K, et al. MicroRNA-188 regulates age-related switch between osteoblast and adipocyte differentiation [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(4): 1509-22.

- [37] MATA J, CURADO S, EPHRUSSI A, et al. Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis [J]. *Cell*, 2000, 101(5): 511-22.
- [38] SEHER T C, LEPTIN M. Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation [J]. *Curr Biol*, 2000, 10(11): 623-9.
- [39] WILSON C, KANHERE A. 8q24.21 Locus: A Paradigm to Link Non-Coding RNAs, Genome Polymorphisms and Cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3).
- [40] POURYAZDANPARAST P, BRENNER A, HAGHIGHAT Z, et al. The role of 8q24 copy number gains and c-MYC expression in amelanotic cutaneous melanoma [J]. *Mod Pathol*, 2012, 25(9): 1221-6.
- [41] BOERMA E G, SIEBERT R, KLUIN P M, et al. Translocations involving 8q24 in Burkitt lymphoma and other malignant lymphomas: a historical review of cytogenetics in the light of today's knowledge [J]. *Leukemia*, 2009, 23(2): 225-34.
- [42] STORLAZZI C T, FIORETOS T, SURACE C, et al. MYC-containing double minutes in hematologic malignancies: evidence in favor of the episome model and exclusion of MYC as the target gene [J]. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(6): 933-42.
- [43] HUANG X P, RONG T H, WANG J Y, et al. Negative implication of C-MYC as an amplification target in esophageal cancer [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006, 165(1): 20-4.
- [44] PUSKAS L G, JUHASZ F, ZARVA A, et al. Gene profiling identifies genes specific for well-differentiated epithelial thyroid tumors [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2005, 51(2): 177-86.
- [45] SATOH T, KIDOYA H, NAITO H, et al. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages [J]. *Nature*, 2013, 495(7442): 524-8.
- [46] DUGAST E, KISS-TOTH E, DOCHERTY L, et al. Identification of tribbles-1 as a novel binding partner of Foxp3 in regulatory T cells [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(14): 10051-60.
- [47] LIU Y H, TAN K A, MORRISON I W, et al. Macrophage migration is controlled by Tribbles 1 through the interaction between C/EBPbeta and TNF-alpha [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2013, 155(1-2): 67-75.
- [48] MIYAJIMA C, ITOH Y, INOUE Y, et al. Positive Regulation of Interleukin-2 Expression by a Pseudokinase, Tribbles 1, in Activated T Cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38(8): 1126-33.
- [49] TAI E S, SIM X L, ONG T H, et al. Polymorphisms at newly identified lipid-

- associated loci are associated with blood lipids and cardiovascular disease in an Asian Malay population [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(3): 514-20.
- [50] NAKAYAMA K, BAYASGALAN T, YAMANAKA K, et al. Large scale replication analysis of loci associated with lipid concentrations in a Japanese population [J]. *J Med Genet*, 2009, 46(6): 370-4.
- [51] KATHIRESAN S, MELANDER O, GUIDUCCI C, et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(2): 189-97.
- [52] WILLER C J, SANNA S, JACKSON A U, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(2): 161-9.
- [53] YUE S J, LIU J, WANG W X, et al. Berberine treatment-emergent mild diarrhea associated with gut microbiota dysbiosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 116: 109002.
- [54] JEONG H W, HSU K C, LEE J W, et al. Berberine suppresses proinflammatory responses through AMPK activation in macrophages [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 296(4): E955-64.
- [55] ZHOU H, FENG L, XU F, et al. Berberine inhibits palmitate-induced NLRP3 inflammasome activation by triggering autophagy in macrophages: A new mechanism linking berberine to insulin resistance improvement [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 864-74.
- [56] BELWAL T, BISHT A, DEVKOTA H P, et al. Phytopharmacology and Clinical Updates of Berberis Species Against Diabetes and Other Metabolic Diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 41.
- [57] KONG W, WEI J, ABIDI P, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins [J]. *Nat Med*, 2004, 10(12): 1344-51.
- [58] WU L, XIA M, DUAN Y, et al. Berberine promotes the recruitment and activation of brown adipose tissue in mice and humans [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6): 468.
- [59] ZHANG Z, ZHANG H, LI B, et al. Berberine activates thermogenesis in white and brown adipose tissue [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5493.
- [60] SINGH A B, LIU J. Berberine decreases plasma triglyceride levels and upregulates hepatic TRIB1 in LDLR wild type mice and in LDLR deficient mice [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 15641.

第一章 调控 db/db 肥胖小鼠脂质代谢的基因及其在体内外脂肪细胞中的表达变化研究

世界卫生组织统计，自 1975 年至 2016 年，全球的肥胖患病率增加了两倍，而中国肥胖的人数已增至全球第一。肥胖会提高心脑血管疾病、糖尿病和癌症等非传染性疾病的患病风险^[1]。但目前肥胖治疗靶点的研究仍十分有限，急需寻找新的药物开发靶点。

db/db 自发性肥胖小鼠是瘦素受体缺失的基因突变小鼠，与普通小鼠相比，db/db 在 4 周龄表现出高血糖，高血脂和体重明显上升的代谢表征，是研究糖脂代谢的经典模型小鼠^[2]。脂肪酸代谢是小鼠心脏重要的能量来源，健康心脏大约 50%-70% 的能量由长链脂肪酸氧化产生的^[3,4]。在 db/db 肥胖小鼠模型中，低度炎症、促炎性脂肪因子释放和游离脂肪酸的持续升高会诱导心肌耗氧量增加和能量代谢受损^[5,6]。其中心肌脂肪代谢的改变，在肥胖小鼠心脏代谢功能障碍中起关键作用。

在本章中我们采用不同月龄的 db/db 自发性肥胖小鼠进行测序，筛选 db/db 肥胖小鼠脂代谢紊乱发展过程中的共同差异基因，并对差异基因在体内外脂肪细胞中的变化进行测定，为治疗肥胖等代谢性疾病筛选新的治疗靶点。

第一节 脂质代谢障碍发展过程中的共同差异基因

由于生活饮食结构的改变和环境因素的作用，肥胖和超重的人数快速上升。但目前干预肥胖的靶点和药物仍十分有限，急需寻找新的药物开发靶点。因此，我们对不同月龄的 db/db 自发性肥胖小鼠进行测序，用以筛选干预脂质代谢的新靶点。

1 实验材料

1.1 实验动物

4 周龄 db/db 小鼠（雄）购于江苏集萃药康生物科技有限公司，合格证号：201816182。所有动物实验程序均由中国医学科学院北京协和医学院动物伦理委员会批准（SLXD-20180706）。

1.2 实验试剂

名称	厂家	货号
TRIZOL	Thermo Scientific 公司	15596018
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司	80109218
三氯甲烷	国药集团化学试剂有限公司	10006818
DEPC 水	碧云天生物技术有限公司	R0022

1.3 实验仪器

名称	厂家	型号
超纯水仪	美国 Merck Millipore 公司	Advantage A10
电子天平	METTLER TOLEDO	AL104-IC
台式离心机	Eppendorf 公司	Centrifuge 5427 R
低温冰箱	青岛海尔股份有限公司	BCD-318WSL

2 实验方法

2.1 db/db 小鼠心脏组织分离取材

db/db 小鼠饲养于中国医学科学院动物房中，饲养在室温 22℃，适度 60%的环境。保证 12 h 的光暗循环且给与普通饲料和水。取第 1、6 和 12 月的 db/db 小鼠，禁食不禁水过夜，收集小鼠内眦血样，脱颈椎处死小鼠。酒精消毒小鼠，快速剪取小鼠心肌组织置于标记好的去酶管内，于液氮中快速冻存。

2.2 db/db 小鼠心脏 RNA 提取

称取冻存的动物组织添加 1 mL Trizol，将组织均匀研磨。添加 0.2 mL 氯仿，剧烈摇动 15 s，在室温下静置 5 min，并在 12000 rpm 和 4℃下离心 15 min。吸取上层透明水层并加入等量的异丙醇，倒置混合，在室温下静置 10 min，在 12000 rpm 和 4℃下离心 10 min。弃上清，用 75%的酒精洗涤沉淀两次并在 12000 rpm 和 4℃下离心 5 min。弃酒精溶液并完全挥干后，加入适量的去酶水溶解核酸沉淀。使用微量分光光度计测定核酸浓度后，确保 260/280 和 260/230 数值在 2.0±0.2 时，送样进行测序。

2.3 RNA-Sequencing 检测

测序由北京诺禾致源科技股份有限公司进行。样品检测合格后，构建通用的转录组文库，使用 Illumina HiSeq 平台进行双端测序。最后进行差异表达分析、主成

分分析、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 分析和蛋白质相互作用网络分析。

2.4 统计学分析

使用核酸序列的 GC 含量(GC content), Q20 和 Q30 评估测序数据质量。采用皮尔逊相关系数的平方 (R^2) 评价样品之间重复性和相关性, 在数据质量合格后进行差异表达基因的筛选。

3 实验结果

3.1 不同月龄 db/db 小鼠转录组共同差异基因

随着 db/db 小鼠体重快速增长, 其肩胛部位的棕色脂肪逐渐白化, 难以与膨大的白色脂肪组织分离。白色脂肪作为储能脂肪组织, 脂质代谢能力低。脂肪代谢是心脏主要的能量来源^[7,8], 在 db/db 小鼠模型中, 高血糖造成的细胞损伤和炎症促使心肌葡萄糖和脂质代谢受损^[9-11]。因此在查阅文献后, RNA-Sequencing 对 db/db 小鼠心肌组织进行测序, 筛选 db/db 肥胖小鼠糖脂代谢紊乱进展过程中的差异基因。

将 1、6 和 12 月龄的 db/db 小鼠心脏转录组数据与相同月龄的对照鼠相比, 分别富集 317、557 和 1661 个差异基因。表明在肥胖小鼠糖脂代谢紊乱进展过程中, 随着心肌重构加重、心脏功能下降, 异常基因增多。在 1、6 和 12 月龄的 db/db 小鼠心脏样本中有 40 个共同差异基因 (Figure 1-1A), 其中 5 个稳定上调, 32 个基因表达稳定下调 (见附录一)。

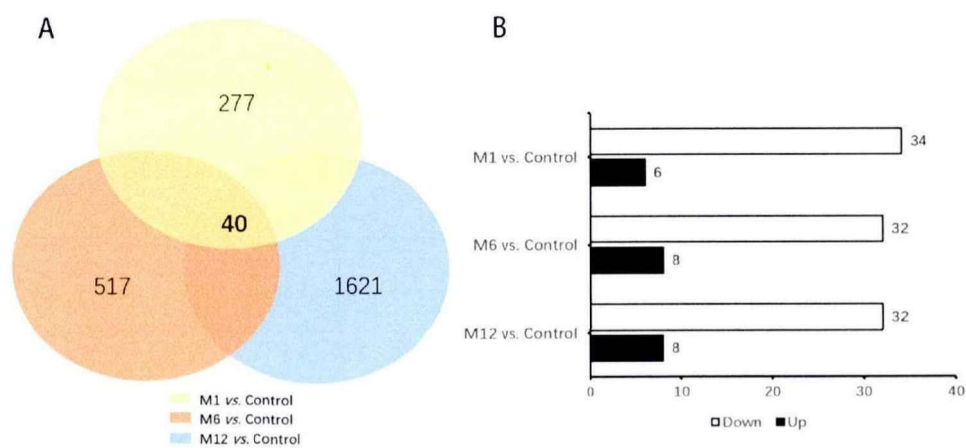


Figure 1-1 Transcriptome common differential genes of db/db mice of different months of age. (A) Venn diagram of the same differential genes between db/db mice and WT mice at different months of age. The overlapping part of the circle represents the same

differential genes between db/db mice of different months of age. (B) The number of the same differential genes up-regulated and down-regulated in the transcriptome of db/db mice of different months of age.

3.2 Trib1 在 db/db 小鼠心肌组织的变化

通过炎症、糖代谢和脂质代谢对不同月龄 db/db 小鼠转录组共同差异基因进行筛选，文献报道 *Trib1* 同时参与多种炎症反应和血脂水平调控^[12-17]。*Trib1* 在 db/db 小鼠 1、6 和 12 月龄中稳定下调（Figure 1-2），因此提示我们对 *Trib1* 在脂质代谢中的作用进行探究。

Trib1(Tribbles homolog 1, *Trib1*)是 Tribbles 假性蛋白激酶家族的一员。全基因组关联分析发现，*Trib1* 与循环血脂水平密切相关^[14]。进一步研究证实，*Trib1* 的敲除会促进脂质在肝细胞的蓄积，并提高血浆甘油三酯（Triglyceride, TG）水平，进而增加脂肪肝和冠状动脉疾病发生的风险^[18]。基于 *Trib1* 在肝脏脂质和循环血脂方面的研究，我们将利用 C57BL/6J 小鼠和 3T3-L1 脂肪前体细胞，测定 *Trib1* 的表达水平，并明确 *Trib1* 在脂肪分化和脂质代谢中的表达变化。

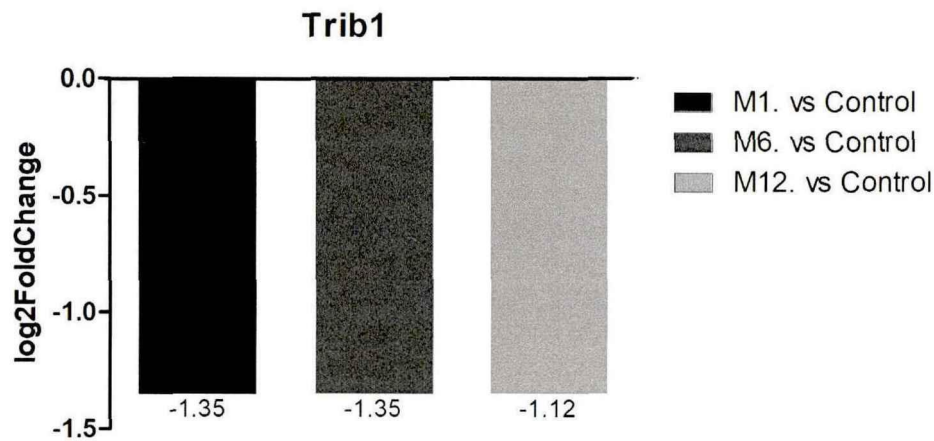


Figure 1-2 Expression levels of *Trib1* between db/db mice and WT mice at different months of age. *Trib1* expression levels in db/db mice at 1, 6 and 12 months of age compared to wild controls.

4 小结

本小节利用不同月龄的 db/db 自发性肥胖小鼠心肌样本进行测序，探究脂质代谢障碍发展过程中的共同差异基因。随后通过文献对 40 个共同差异基因进行筛选，发现 *Trib1* 同时参与多种炎症反应和血脂水平调控^[12-17]，在 db/db 小鼠 1、6 和 12 月龄中稳定下调，提示我们对 *Trib1* 在脂质代谢中的作用进行探究。

第二节 *Trib1* 在 C57BL/6J 小鼠各组织的表达以及对棕色脂肪产热的作用研究

在 db/db 肥胖小鼠不同月龄样本的共同差异基因中, *Trib1* 同时参与多种炎症反应和血脂水平调控^[12-17]。但 *Trib1* 在脂肪组织中的表达水平, 以及在不同种类的白色脂肪和棕色脂肪中的表达差异并不明确。因此我们通过 RT-PCR 测定 *Trib1* 在 C57BL/6J 小鼠各组织器官中的表达水平。

1 实验材料

1.1 实验动物与细胞

8 周龄 C57BL/6J 小鼠 (雄) 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号: 110011211107569245。所有动物实验程序均由中国医学科学院北京协和医学院动物伦理委员会批准 (SLXD-20180706)。

1.2 实验试剂

名称	厂家	货号
TRIZOL	Thermo Scientific 公司	15596018
PrimeScript™ RT Master Mix	宝日医生物技术有限公司	RR036A
TB Green® Premix Ex Taq™ II	宝日医生物技术有限公司	RR820A
肾上腺素受体激动剂	Sigma 公司	C5976
SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒	康为世纪生物科技有限公司	CW0022
电泳缓冲液	康为世纪生物科技有限公司	CW0045S
转膜缓冲液	康为世纪生物科技有限公司	CW0044
TBST	康为世纪生物科技有限公司	CW0043
eECL Western Blot Kit	康为世纪生物科技有限公司	CW0049S
蛋白酶抑制剂	康为世纪生物科技有限公司	CW2200S
蛋白磷酸酶抑制剂	康为世纪生物科技有限公司	CW2383S
抗 UCP1 抗体	Abcam 公司	ab10983
抗 PGC-1α 抗体	Abcam 公司	ab54481
抗 TRIB1 抗体	Santa Cruz 公司	sc-393536
抗 GAPDH 抗体	Abcam 公司	ab9485
HRP 鼠抗兔二抗	柏奥易杰科技有限公司	BE0107-100

1.3 实验仪器

名称	厂家	型号
微量分光光度计	Thermo Scientific 公司	Nanodrop 2000
PCR 仪	Eppendorf 公司	Mastercycler® X50
荧光定量 PCR 仪	Roche 公司	LightCycler96
台式离心机	Eppendorf 公司	Centrifuge 5427 R
纯水仪	Merck Millipore 公司	Advantage A10
垂直电泳仪	六一仪器厂	DYCZ-24DN
水平脱色摇床	六一仪器厂	WD-9405F
凝胶成像系统	Bio-RAD 公司	ChemiDOCTM XRS+
冰冻切片机	Leica 公司	CM1900
数字玻片图像扫描仪	Leica 公司	FS1000

2 实验方法

2.1 C57BL/6J 小鼠脂肪及其他组织分离取材

将 10 只 8 周龄的 C57BL/6J 小鼠饲养在室温 22℃，适度 60%的环境。保证 12 h 的光暗循环且给与普通饲料和干净的水。适应一周后，禁食一夜，收集小鼠内眦血样，脱颈椎处死小鼠。酒精消毒小鼠，快速剪取小鼠肩胛处的棕色脂肪组织（Brown adipose tissue, BAT）和腹股沟处的白色脂肪组织（Inguinal white adipose tissue, iWAT），分离腹腔中的白色脂肪组织（Epididymal white adipose tissue, eWAT）、肝脏、脾脏和肾脏，胸腔中的心脏、肺和胸腺以及脑组织。将样本置于标记好的去酶管内，于液氮中快速冻存。

2.2 C57BL/6J 小鼠组织基因表达水平测定

2.2.1 C57BL/6J 小鼠多器官组织总 RNA 提取

剪取冻存的动物组织添加 1 mL Trizol，将组织均匀研磨。添加 0.2 mL 氯仿，剧烈摇动 15 s，在室温下静置 5 min，并在 12000 rpm 和 4℃下离心 15 min。吸取上层透明水层并加入等量的异丙醇，倒置混合，在室温下静置 10 min，在 12000 rpm 和 4℃下离心 10 min。弃上清，用 75%的酒精洗涤沉淀两次并在 12000 rpm 和 4℃下离心 5 min。弃酒精溶液并完全挥干后，加入适量的去酶水溶解核酸沉淀。使用微量分

光光度计测定核酸浓度后，调整稀释各样品核酸溶液浓度为：400 ng/mL，进行反转录实验。在标记好的 0.2 mL 去酶管内，配置反转录溶液，反应体系如下：

Component	Volume (μL)
Sample RNA	2.5
5×PrimeScript RT Master	2
RNase-free H ₂ O	5.5
Total	10

将反应体系溶液混匀，置于 PCR 仪中，设定反应程序：37℃ 15 min，85℃ 5 s，4℃ 5 min，反转录为 cDNA 样本。待样品冷却完毕，加入 30 μL 去酶水混匀。

2.2.2 RT-PCR 检测各组织样本中的基因表达水平

将稀释混匀的 cDNA 样本在八连排管内配置反应溶液，反应体系如下：

Component	Volume (μL)
TB Green Premix Ex Taq II	6.25
cDNA	3
Primer	0.5
RNase-free H ₂ O	2.75
Total	12.5

将反应体系溶液混匀，置于荧光定量 PCR 仪中，设定反应程序，反应程序如下：

Program	Step	Cycle	Acq.Mode
Preincubation	95℃ for 30 s	1	None
	95℃ for 10 s		None
3 Step Amplification	55℃ for 30 s	45	None
	72℃ for 15 s		Single
Melting	95℃ for 10 s		None
	65℃ for 60 s	1	None
	97℃ for 1 s		Continuous

提前将用于反应的 Forward primer 和 Reverse primer 等比混合为 5×贮备液，引物序列如下：

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (3'-5')
Trib1	AGAACCCAGCTTAGACTGGA	AAAAGCGTATAGAGCATCA
	A	CCC

Ucp1	AGGCTTCCAGTACCATTAGG T	CTGAGTGAGGCAAAGCTGA TTT
Prdm16	CCAAGGCAAGGGCGAAGAA	AGTCTGGTGGGATTGGAATG T
Cidea	TGACATTCATGGGATTGCAG AC	GGCCAGTTGTGATGACTAAG AC
DiO2	AATTATGCCTCGGAGAAGAC CG	GGCAGTTGCCTAGTGAAAG GT
Cox5b	TTCAAGGTTACTTCGCGGAG T	CGGGACTTAGATTAGGGTCT TCC
Cox7a	GCTCTGGTCCGGTCTTTTAGC	GTACTGGGAGGTCATTGTCTG G
PPAR- γ	TCGCTGATGCACTGCCTATG	GAGAGGTCCACAGAGCTGA TT
Adipoq	TGTTCTCTTAATCCTGCCCA	CCAACCTGCACAAGTTCCCC TT
C/EBP- α	CAAGAACAGCAACGAGTAC CG	GTCAGTGGTCAACTCCAGCA C
Leptin	GAGACCCCTGTGTCTGGTTC	CTGCGTGTGTGAAATGTCAT TG
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTT G	TGTAGACCATGTAGTTGAG GTCA

2.3 肾上腺素配置与 C57BL/6J 小鼠分组

肾上腺素受体激动剂 (CL316243) 的配置: 使用生理盐水将 CL316243 配置为 5 mg/mL 的储备液, 避光-20℃冰箱保存。CL316243 工作液浓度为 1 mg/mL。

将 C57BL/6J 小鼠饲养在室温 22℃, 适度 60% 的环境。保证 12 h 的光暗循环且给与普通饲料和干净的水。适应一周后, 将小鼠随机分为三组:

- (1) C57BL/6J 组 (对照组);
- (2) C57BL/6J+冷暴露组 (4℃);
- (3) C57BL/6J+CL316243 组。

C57BL/6J 小鼠隔天腹腔注射 CL316243 (1 mg/kg) 或冷暴露 (室温 4℃) 14 天。禁食一夜, 收集小鼠内眦血样, 脱颈椎处死小鼠。酒精消毒小鼠, 快速剪取小鼠 BAT、iWAT 和 eWAT。将部分样本置于标记好的多聚甲醛固定液中, 其余样本置于标记

好的去酶管内，于液氮中快速冻存。

2.4 C57BL/6J 小鼠脂肪组织 HE 染色

脂肪组织在多聚甲醛中固定两天，组织冲洗后石蜡包埋切片。用二甲苯脱蜡，用不同梯度的乙醇和水清洗 5 min。切片在苏木素染料中浸泡 5 min 染色细胞核，用水冲洗，加入弱碱性水溶液 30-60 秒返蓝，然后用水冲洗切片 5-10 分钟。放入伊红染色 2-5 min 染色细胞质，用梯度乙醇洗脱，用二甲苯使其透明，中性树胶封片。用显微镜拍照观察脂肪组织的变化。

2.5 Western blot 检测 TRIB1 和产热蛋白的表达

2.5.1 蛋白提取

由于脂肪组织脂含量高，10mg 小鼠棕色脂肪组织加入 50 μ L 预冷的组织蛋白裂解混合液（蛋白裂解液：蛋白酶抑制剂：磷酸酶抑制剂 = 1000: 10: 10）。在冰水混合物下电动研磨棒研磨组织后，细胞超声破碎 2 min（功率：70%，超声 3 s，停 7 s）。随后 4℃ 条件下 12000 rpm 离心 30 min，避开上层脂质和底层组织，取蛋白上清。将 SDS-PAGE Loading Buffer 与蛋白样品按 1: 4 混匀，沸水浴煮 10 min，使蛋白变性，样品冷却后，-20℃ 保存。

2.5.2 配胶

根据目的蛋白分子量选择分离胶浓度，按试剂盒说明配置分离胶加入模具，室温静置 45 min 待分离胶凝固。配置浓缩胶缓慢加满模具，从一侧滑入梳子，插入浓缩胶，避免产生气泡。梳子底部与分离胶上部约有 1 cm 的距离，保证蛋白分离效果。室温静置 40 min 待浓缩胶凝固，用电泳液或水浸没保存。

2.5.3 电泳

将胶板卡入电泳槽中，向槽中灌满 1× 电泳液缓冲液（尽量使胶板形成的槽封闭不漏液，如调整后仍漏液，需要在电泳过程中及时补充）。拔出梳子后，缓慢加入样品和 Marker，连接仪器正负极，选择恒压模式启动仪器。溴酚蓝指示带移动至玻璃板底部时，停止电泳。

2.5.4 转膜

取出电泳结束的胶板，在转膜缓冲液（10× 转膜液: 甲醇: 双蒸水 = 1: 2: 7）中将凝胶取出，按照阴极黑色夹面-海绵-滤纸-凝胶-NC 膜-滤纸-海绵-阳极红色夹面顺序放

置。检查凝胶面与 NC 膜接触面无气泡后，将包有蛋白凝胶的夹子置于转膜槽中。将转膜槽置于冰水混合物中，连接仪器正负极，选择恒流 300 毫安模式启动仪器，转膜 50 min。

2.5.5 封闭

在 100 mL 的 1×TBST 缓冲液中加入 5 g 脱脂奶粉，混匀配置封闭液。取出转膜完毕的 NC 膜，置于封闭液中。在水平摇床上，室温封闭 2 小时。

2.5.6 抗体孵育

根据说明书用牛奶封闭液稀释配置一抗。按照 Marker 指示的蛋白分子量进行目的蛋白条带裁剪，并将条带置于对应的一抗中，4℃孵育过夜。孵育完毕取出蛋白条带，TBST 洗涤 3 次，每次 15 min。按比例稀释配置二抗，将蛋白条带放入一抗对应种属的二抗中，室温孵育 1.5 小时。孵育完毕取出蛋白条带，TBST 洗涤 3 次，每次 15 min。

2.5.7 显色

取出 TBST 中的蛋白条带，将配置好的化学发光检测工作液滴在 NC 膜上，避光孵育 5 min。将条带置于凝胶成像仪器内进行蛋白曝光和拍摄。

2.6 统计学分析

使用软件 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析，实验数据均采用 mean ± SD 表示。数据进行方差齐性检验，在两组间，采用双尾 T 检验（Two-tailed Student's t-test）；多组间采用单因素方差分析（One-Way ANOVA），在组间差异有统计学意义后采用 Turkey 进行两两比较，当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 *Trib1* 在 C57BL/6J 小鼠各组织器官中的表达水平

通过 RT-PCR 测定 *Trib1* 在普通 8 周龄 C57BL/6J 小鼠各组织器官中的表达水平。结果显示 *Trib1* 在心脏、脾脏和脂肪等多组织中广泛表达。与 iWAT 相比，*Trib1* 在脾脏、肾脏、胸腺和脑中表达较低，在脂肪组织中表达较高，其中 *Trib1* 在 BAT 的表达显著高于其他组织。

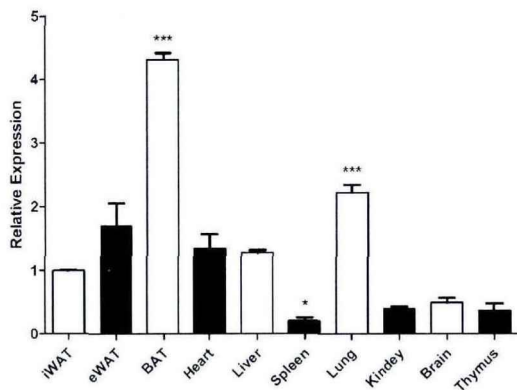


Figure 1-3 The mRNA level of *Trib1* in a variety of organs and tissues of normal C57BL/6J mice. The data were expressed as the mean $\pm$ SD. n=8. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. iWAT group.

3.2 冷刺激和肾上腺素对正常 C57BL/6J 小鼠脂肪组织的影响

在明确 *Trib1* 在棕色脂肪中高表达后，本研究利用寒冷刺激（饲养环境温度：4℃）和 β_3 -肾上腺素受体激动剂（CL316243）处理小鼠两周，评估脂肪组织的变化。结果表明与对照组相比，寒冷刺激和 CL316243 处理都能促进 BAT 和 iWAT 中的脂质消耗，减小脂肪细胞的面积。以上结果证明通过寒冷刺激和 CL316243 提高小鼠脂肪代谢功能。

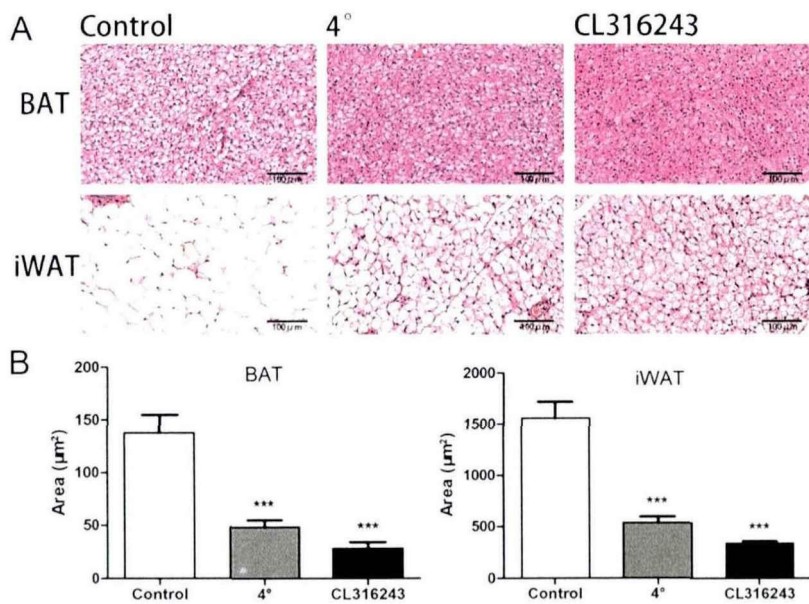


Figure 1-4 Effects of cold stimulation and epinephrine on adipose tissue in C57BL/6J mice. (A) H&E-stained and (B) lipid droplet area statistics of BAT and iWAT sections obtained from the C57BL/6J mice treated with cold exposure or CL316243 (β_3 -adrenoceptor agonist). Scale bar: 100 μ m. The data were expressed as the mean $\pm$ SD. n= 8.

*** $P < 0.001$ vs. control group.

3.3 冷暴露和肾上腺素对 *Trib1* 和产热基因的影响

确认寒冷刺激和 CL316243 提高小鼠 BAT 功能后, 本研究通过 RT-PCR 检测 BAT 产热相关基因 (Figure 1-5A)、脂合成基因 (Figure 1-5B) 和 *Trib1* (Figure 1-5C) 的表达水平。结果显示与对照组相比, 寒冷刺激和 CL316243 处理提高小鼠产热相关基因 UCP1、碘甲腺原氨酸脱碘酶 II (DIO2) 等基因的表达水平; 降低脂肪分化、合成基因 C/EBP- α 的表达水平。随着 BAT 中产热相关基因的升高, *Trib1* 的表达水平也明显升高。

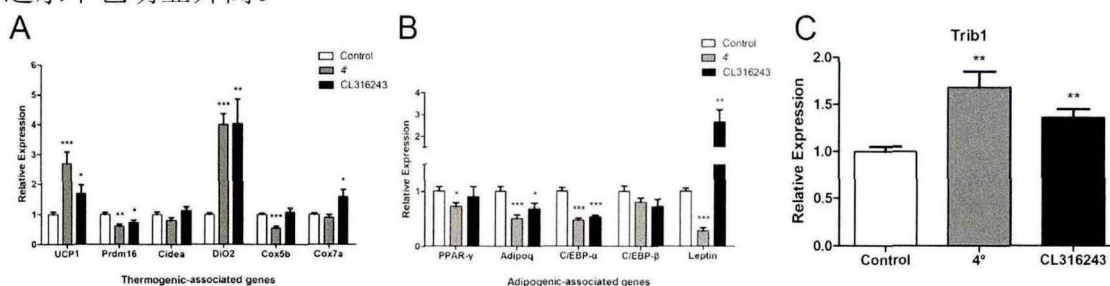


Figure 1-5 Effects of cold exposure and epinephrine on *Trib1* and thermogenic genes. After CL316243 treatment, the mRNA levels of thermogenesis-related genes (A), adipogenic-related genes (B) and *Trib1* (C) in BAT. The data were expressed as the mean $\pm$ SD. $n=8$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control group.

3.4 冷刺激和肾上腺素对 TRIB1 和产热蛋白的影响

采用 Western blot 检测寒冷刺激和 CL316243 处理对产热蛋白和 TRIB1 的影响。结果表明与对照组相比, 寒冷刺激和 CL316243 处理提高了小鼠 BAT 中产热关键蛋白 UCP1 和 PGC-1 α 的表达水平, 且随着棕色脂肪产热功能的提高, BAT 中 TRIB1 的蛋白水平也显著提高。

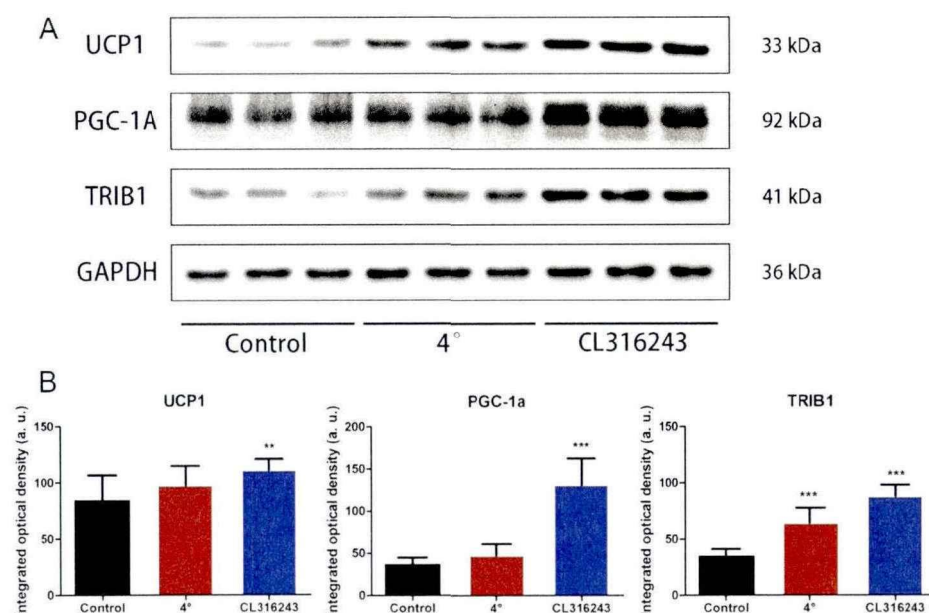


Figure 1-6 After CL316243 treatment, TRIB1 and thermogenic protein in BAT. Expression levels (A) and statistics (B) of thermogenic proteins after cold stimulation and epinephrine treatment. The data were expressed as the mean $\pm$ SD. $n=8$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control group.

4 小结

在这一节中我们利用 RT-PCR 测定 *Trib1* 在 C57BL/6J 小鼠各组织器官中的表达水平。在发现 *Trib1* 在小鼠 BAT 中高表达后，通过寒冷刺激和肾上腺素处理提高 C57BL/6J 小鼠的 BAT 代谢功能，并测定了 *Trib1* 在 C57BL/6J 小鼠棕色脂肪组织中的表达水平。结果显示随着 BAT 产热功能增强，*Trib1* 的蛋白和基因水平也随着升高。提示我们 *Trib1* 参与棕色脂肪组织代谢功能。

第三节 3T3-L1 脂肪前体细胞诱导分化对 Trib1 表达的影响

通过体内实验，表明 Trib1 参与 C57BL/6J 小鼠棕色脂肪组织代谢功能。本研究通过 3T3-L1 脂肪前体细胞，测定 Trib1 在分化过程中的表达水平，探究 Trib1 与脂肪细胞分化和脂质代谢的关系。

1 实验材料

1.1 实验细胞

3T3-L1 细胞购自北京协和医学院（1101MOU-PUMC00155）。

1.2 实验试剂

名称	厂家	货号
TRIZOL	Thermo Scientific 公司	15596018
PrimeScript™ RT Master Mix	宝日医生物技术有限公司	RR036A
TB Green® Premix Ex Taq™ II	宝日医生物技术有限公司	RR820A
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司	80109218
三氯甲烷	国药集团化学试剂有限公司	10006818
DEPC 水	碧云天生物技术有限公司	R0022
油红溶液	Sigma 公司	O1391
DMEM 高糖培养基	Thermo Scientific 公司	C11995500BT
0.25 %胰酶	Thermo Scientific 公司	25200-056
胰岛素	Sigma 公司	I5500
Dexamethasone	Sigma 公司	D4902
3-isobutyl-1-methylxanthine	Sigma 公司	I5879
Triiodothyronine	Sigma 公司	T2877
DMSO	索莱宝科技有限公司	D8371
PBS	中杉金桥生物技术有限公司	ZLI-9062
4%多聚甲醛	索莱宝科技有限公司	P1110

1.3 实验仪器

名称	厂家	型号
微量分光光度计	Thermo Scientific 公司	Nanodrop 2000
PCR 仪	Eppendorf 公司	Mastercycler® X50
荧光定量 PCR 仪	Roche 公司	LightCycler96
倒置显微镜	Nikon 公司	ECLIPSE Ts2
台式离心机	Eppendorf 公司	Centrifuge 5427 R

2 实验方法

2.1 3T3-L1 脂肪细胞诱导分化及脂滴油红染色

2.1.1 3T3-L1 脂肪细胞诱导分化

3T3-L1 细胞使用含有 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基，在 37℃，5 % CO₂ 的细胞培养箱中培养，每两天更换新鲜培养基。当融合率达到 80-90 %时，细胞传代。在 6 孔板中培养 3T3-L1 细胞至融合率 100 %，更换新鲜含血清的 DMEM 高糖培养基培养，使细胞接触抑制。两天后更换含有 500 μ M 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤（3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX）、0.25mM 地塞米松（Dexamethasone, DEX）和 8 μg/mL 胰岛素的诱导培养基，细胞培养 4 天。更换含有 0.1nM 三碘甲状腺原氨酸（Triiodothyronine, T3）和 5 μg/mL 胰岛素的分化培养基，细胞培养 4 天，可见蓄有脂滴的成熟脂肪细胞。

2.1.2 脂肪细胞油红染色

用磷酸盐缓冲盐水（Phosphate buffered saline, PBS）洗涤细胞一次，弃 PBS。在 4℃下用多聚甲醛固定细胞 30 分钟以上，弃多聚甲醛溶液，PBS 洗涤细胞两次。用水稀释油红 O 原液（油红原液：水 = 3:2）并过滤，室温下油红工作液染色细胞 30 min。弃油红工作液，PBS 洗涤细胞三次，在显微镜下观察细胞。

2.2 RT-PCR 检测不同时间段 3T3-L1 细胞样本中 *Trib1* 的基因表达

2.2.1 提取不同时间段细胞样本总 RNA

3T3-L1 细胞诱导分化过程中，分别在 2、4、6 和 8 天，弃去 6 孔板内培养基，用 PBS 洗涤细胞，加入 1 mL Trizol 并收集到标记好的去酶 1.5 mL 管内，-20℃冰箱保存。所有时间点细胞样品收集后，溶解冻存的样品，加入 0.2 mL 氯仿提取 RNA，提取方法本章第二节实验方法 2.1.2。

2.2.2 RT-PCR 检测各组织样本中 *Trib1* 的基因表达

同本章第二节实验方法 2.2。

2.3 统计学分析

使用软件 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析, 实验数据均采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。数据进行方差齐性检验, 在两组间, 采用双尾 T 检验 (Two-tailed Student's t-test); 多组间采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 在组间差异有统计学意义后采用 Turkey 进行两两比较, 当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 *Trib1* 在 3T3-L1 脂肪细胞不同分化阶段中的表达水平

除了体内实验, 本研究通过诱导液对 3T3-L1 脂肪细胞进行诱导分化。分别在诱导分化的第 2、4、6 和 8 天固定和收集细胞。通过油红对细胞脂滴进行染色, 结果显示在 3T3-L1 脂肪细胞诱导期间 (IM) 细胞中脂滴较少, 在分化期间 (DM) 细胞脂滴逐渐增多。同时通过 RT-PCR 测定 *Trib1* 在 3T3-L1 脂肪细胞不同分化阶段中的表达水平。结果显示, *Trib1* 随着脂肪细胞的分化成熟表达逐渐降低, 在分化期间的表达水平显著低于诱导期。

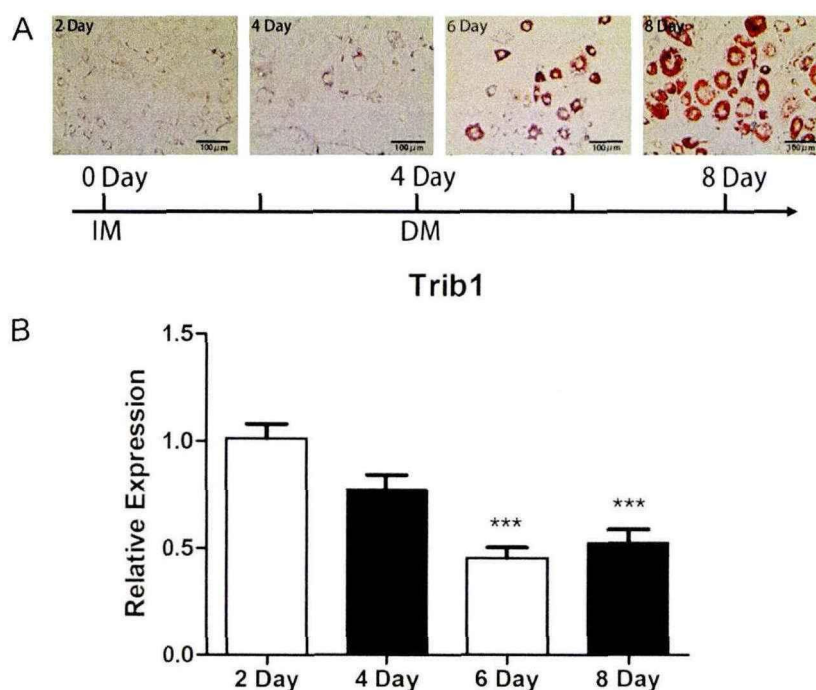


Figure 1-7 Expression levels of *Trib1* in different differentiation stages of 3T3-L1 adipocytes. Lipid drop oil red staining (A) and mRNA level of *Trib1* in 3T3-L1 cells

during adipogenesis (B). Scale bar: 100 μm . The data were expressed as the mean $\pm$ SD. *** $P < 0.001$ vs. control group.

4 小结

利用 RT-PCR 测定 *Trib1* 在 3T3-L1 脂肪细胞不同分化阶段中的表达水平。结果表明随着细胞分化成熟脂滴增多, *Trib1* 的表达随之降低, 这些结果表明 *Trib1* 参与脂肪细胞脂质代谢功能。

讨论

本研究对不同月龄的 db/db 肥胖小鼠进行测序, 探究在糖脂代谢紊乱发展过程中的通过差异基因, 以寻找新的肥胖治疗靶点。在预实验中, 我们对 14 周龄的雄性 db/db 肥胖小鼠进行观察取样。解剖结果显示 db/db 小鼠肩胛部位白色脂肪增多, 棕色脂肪白化, 难以清楚区分取样测序。通过查阅文献, 发现 db/db 小鼠心脏有极高的能量需求, 需要以高速率持续产生 ATP 以维持心肌收缩功能、基础代谢过程和离子稳态。因此心肌组织采用多种碳底物作为能源, 其中脂肪酸 β -氧化作为主要能量来源^[7]。db/db 肥胖小鼠随着周龄增大, 表现出代谢综合征, 其心肌组织也表现出底物倾向改变, 脂肪酸利用障碍等病理变化^[3, 4]。不同月龄心肌组织的转录组测序代表脂代谢紊乱发展的变化, 作为筛选肥胖治疗靶点的测序样本。

通过对不同月龄的心肌样本进行测序, 筛选共同差异基因。查阅文献后, Tribbles 家族的同源物 1 (Tribbles homolog 1, *Trib1*) 的表达变化值得特别关注。Tribbles 是一个假性蛋白激酶家族, 是人类钙离子/钙调素依赖性蛋白激酶亚家族激酶 (Calcium/calmodulin-dependent protein kinases, CaMK) 的分支, 有三个同源序列。Tribbles 家族最早在果蝇体内被发现, 可以在果蝇原肠胚形成期间调节中胚层细胞增殖和迁移^[19-21]。随后对人类 Tribbles 假激酶蛋白结构域的分析发现, Tribbles 家族蛋白包含三个区域: 中央激酶样结构域, 两侧分别连接着 C 末端和 N 末端结构域。由于中央激酶样结构域缺乏 ATP 的结合位点和催化核心基序, 因此不具催化活性^[22]。同时 Tribbles 家族蛋白 C 末端可结合泛素 E3 连接酶 COP1 靶向蛋白降解, 并作为分子支架协调丝裂原活化蛋白激酶等信号通路^[23, 24]。

Trib1 是 Tribbles 假性蛋白激酶家族的一员。前期的研究发现 *Trib1* 参与上皮癌、乳腺癌、胆管癌、前列腺癌、甲状腺癌和急性髓性白血病等多种癌症的发展^[25-28]。直到 2013 年, 研究者提出 TRIB1 通过结合 COP1 调节 C/EBP α 蛋白水平, 进而影响多器官组织中 M2 型巨噬细胞的极化^[28]。随后的研究发现 *Trib1* 可以作用于多种转录因子和信号通路, 调节 B 细胞功能, T 细胞活化和粒细胞的数量。*Trib1* 将肿

瘤、免疫和炎症串联了起来，是多种细胞信号通路的中心。

当脂肪组织体量过度膨胀诱导细胞缺氧时，细胞应激导致的脂肪细胞凋亡会募集巨噬细胞和其他免疫细胞浸润脂肪组织，产生慢性炎症反应。慢性炎症被认为是肥胖症的核心特征^[29]，会提高代谢综合征、肿瘤和心血管疾病等多种并发症的患病等风险。促炎性巨噬细胞的募集是肥胖的核心特征，也是与肥胖全身并发症相关的主要炎性成分^[30]。巨噬细胞是一群进化上起源较早的细胞，一般被分为 M1 和 M2 型，其中 M1 型巨噬细胞通过分泌促炎性细胞因子和趋化因子参与炎症反应，起到防御作用。M2 型巨噬细胞通过分泌抑制性细胞因子 IL-10 或 TGF- β 等参与抗炎反应，在组织损伤修复、肿瘤发生发展过程中发挥重要作用。研究发现减轻巨噬细胞炎症或促进 M2 巨噬细胞分化的药物，可以抑制脂肪炎症和肥胖的全身并发症^[31,32]。值得关注的是 TRIB1 蛋白可以作为接头蛋白，通过与组成型光形态发生蛋白 1（constitutive photomorphogenesis protein 1, COP1）相互作用参与 C/EBP α 蛋白的降解，从而导致 TRIB1 缺陷的小鼠在多个脏器如骨髓、脾脏、肺和脂肪组织中 M2 型巨噬细胞减少^[28]。除了 M2 型巨噬细胞外，TRIB1 也影响 IL-2、TNF- α 等细胞因子的表达^[33,34]。*Trib1* 在 M2 型巨噬细胞极化和炎症反应中的作用，提示我们探究 *Trib1* 与脂肪组织和肥胖的关系。

全基因组关联分析发布数据，超过 175 个基因位点与主要循环血脂水平强烈相关。其中大多数基因特异相关于一种或两种脂质，而一些基因，如 *Trib1* 和 *Fads1* 与所有循环血脂水平相关^[35,36]。进一步研究证实，*Trib1* 的过表达可以下调 ChREBP（碳水化合物反应元件结合蛋白，一种葡萄糖敏感分子，参与肝脂异生）的 mRNA 和蛋白水平从而影响肝脏脂肪生成^[18]。同时，肝脏特异性 *Trib1* 敲除小鼠血浆 TG 和 TC 水平升高。且 *Trib1* 的敲除使肝脏 C/EBP α 蛋白表达升高，从而促进脂肪在肝细胞的生成和累积^[18]。

我们测定了 *Trib1* 在普通饮食的 C57BL/6J 小鼠各组织器官中的表达水平。结果显示 *Trib1* 在 BAT 中的表达水平显著高于其他组织。研究发现，有别于白色脂肪细胞，棕色脂肪细胞具有较强的糖酵解和氧化磷酸化能力，被认为是能量代谢主要场所之一^[37]。BAT 包含大量线粒体，其中高水平的 UCP1 蛋白会以非战栗性产热的方式消耗生物能散发能量，以维持人体温度和能量消耗。*Trib1* 在 BAT 中的高表达提示我们对其关系进行探究。

近年来关于棕色脂肪的功能调控研究取得一些进展，如寒冷刺激、 β -肾上腺素诱导能提高 BAT 脂质代谢和产热能力^[38-40]。因此我们对 C57BL/6J 小鼠隔天腹腔注射 CL316243 或冷刺激 14 天。CL316243 是高效的选择性 β_3 -肾上腺素受体激动剂，可增加棕色脂肪组织的产热和代谢率，促进脂肪细胞脂解^[41]。结果显示 CL316243 和冷刺激都诱导脂肪细胞脂质分解，并提高了产热相关蛋白和基因的表达水平，表

现出棕色脂肪代谢产热功能提高。在确认 BAT 代谢功能后,我们还观察到 *Trib1* 的蛋白和基因水平也随着升高。

这些数据提示我们除了血脂和肝脏脂质外, *Trib1* 可能参与脂肪组织功能,影响棕色脂肪组织的脂质代谢能力。但 *Trib1* 在脂肪组织的具体功能仍未明确,待下一步实验探究。

结论

利用自发性肥胖小鼠、C57BL/6J 小鼠和 3T3-L1 脂肪细胞说明 *Trib1* 除了影响血脂和肝脏脂肪生成外,还直接参与脂肪组织的功能。*Trib1* 在 BAT 中的表达水平显著高于其他组织。通过寒冷环境和 CL316243 诱导提高 BAT 功能的小鼠模型中, *Trib1* 的表达水平上升。但 *Trib1* 对脂肪功能的利弊和具体的影响仍未明确,待进一步探究。

参考文献

- [1] ROGER V L, GO A S, LLOYD-JONES D M, et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2011, 123(4): e18-e209.
- [2] SURIANO F, VIEIRA-SILVA S, FALONY G, et al. Novel insights into the genetically obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice: two sides of the same coin [J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 147.
- [3] ORMAZABAL V, NAIR S, ELFEKY O, et al. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2018, 17(1): 122.
- [4] OPIE L H. Metabolism of the heart in health and disease. II [J]. *Am Heart J*, 1969, 77(1): 100-22 contd.
- [5] COLE M A, MURRAY A J, COCHLIN L E, et al. A high fat diet increases mitochondrial fatty acid oxidation and uncoupling to decrease efficiency in rat heart [J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(3): 447-57.
- [6] LEVELT E, RODGERS C T, CLARKE W T, et al. Cardiac energetics, oxygenation, and perfusion during increased workload in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(46): 3461-9.
- [7] LOPASCHUK G D, USSHER J R. Evolving Concepts of Myocardial Energy Metabolism: More Than Just Fats and Carbohydrates [J]. *Circ Res*, 2016, 119(11): 1173-

6.

- [8] BEDI K C, JR., SNYDER N W, BRANDIMARTO J, et al. Evidence for Intramyocardial Disruption of Lipid Metabolism and Increased Myocardial Ketone Utilization in Advanced Human Heart Failure [J]. *Circulation*, 2016, 133(8): 706-16.
- [9] BOUDINA S, SENA S, THEOBALD H, et al. Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins [J]. *Diabetes*, 2007, 56(10): 2457-66.
- [10] SLOAN C, TUINEI J, NEMETZ K, et al. Central leptin signaling is required to normalize myocardial fatty acid oxidation rates in caloric-restricted ob/ob mice [J]. *Diabetes*, 2011, 60(5): 1424-34.
- [11] ABDURRACHIM D, NABBEN M, HOERR V, et al. Diabetic db/db mice do not develop heart failure upon pressure overload: a longitudinal in vivo PET, MRI, and MRS study on cardiac metabolic, structural, and functional adaptations [J]. *Cardiovasc Res*, 2017, 113(10): 1148-60.
- [12] KATHIRESAN S, MELANDER O, GUIDUCCI C, et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(2): 189-97.
- [13] WILLER C J, SANNA S, JACKSON A U, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(2): 161-9.
- [14] CHAMBERS J C, ZHANG W, SEHMI J, et al. Genome-wide association study identifies loci influencing concentrations of liver enzymes in plasma [J]. *Nat Genet*, 2011, 43(11): 1131-8.
- [15] KRAJA A T, CHASMAN D I, NORTH K E, et al. Pleiotropic genes for metabolic syndrome and inflammation [J]. *Mol Genet Metab*, 2014, 112(4): 317-38.
- [16] AKIRA S, MISAWA T, SATOH T, et al. Macrophages control innate inflammation [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2013, 15 Suppl 3: 10-8.
- [17] NIESPOLO C, JOHNSTON J M, DESHMUKH S R, et al. Tribbles-1 Expression and Its Function to Control Inflammatory Cytokines, Including Interleukin-8 Levels are Regulated by miRNAs in Macrophages and Prostate Cancer Cells [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 574046.
- [18] BAUER R C, SASAKI M, COHEN D M, et al. Tribbles-1 regulates hepatic lipogenesis through posttranscriptional regulation of C/EBPalpha [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(10): 3809-18.

- [19] MATA J, CURADO S, EPHRUSSI A, et al. Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis [J]. *Cell*, 2000, 101(5): 511-22.
- [20] SEHER T C, LEPTIN M. Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation [J]. *Curr Biol*, 2000, 10(11): 623-9.
- [21] RORTH P, SZABO K, TEXIDO G. The level of C/EBP protein is critical for cell migration during *Drosophila* oogenesis and is tightly controlled by regulated degradation [J]. *Mol Cell*, 2000, 6(1): 23-30.
- [22] EYERS P A, KEESHAN K, KANNAN N. Tribbles in the 21st Century: The Evolving Roles of Tribbles Pseudokinases in Biology and Disease [J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(4): 284-98.
- [23] QI L, HEREDIA J E, ALTAREJOS J Y, et al. TRB3 links the E3 ubiquitin ligase COP1 to lipid metabolism [J]. *Science*, 2006, 312(5781): 1763-6.
- [24] DEDHIA P H, KEESHAN K, ULJON S, et al. Differential ability of Tribbles family members to promote degradation of C/EBP α and induce acute myelogenous leukemia [J]. *Blood*, 2010, 116(8): 1321-8.
- [25] JIN G, YAMAZAKI Y, TAKUWA M, et al. Trib1 and Evf1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis [J]. *Blood*, 2007, 109(9): 3998-4005.
- [26] LIN Z Y, HUANG Y Q, ZHANG Y Q, et al. MicroRNA-224 inhibits progression of human prostate cancer by downregulating TRIB1 [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(3): 541-50.
- [27] DUGAST E, KISS-TOTH E, DOCHERTY L, et al. Identification of tribbles-1 as a novel binding partner of Foxp3 in regulatory T cells [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(14): 10051-60.
- [28] SATOH T, KIDOYA H, NAITO H, et al. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages [J]. *Nature*, 2013, 495(7442): 524-8.
- [29] DENG T, LYON C J, BERGIN S, et al. Obesity, Inflammation, and Cancer [J]. *Annu Rev Pathol*, 2016, 11: 421-49.
- [30] XU H, BARNES G T, YANG Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1821-30.
- [31] HAN M S, JUNG D Y, MOREL C, et al. JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation [J]. *Science*, 2013, 339(6116): 218-22.
- [32] ODEGAARD J I, RICARDO-GONZALEZ R R, GOFORTH M H, et al.

Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance [J]. *Nature*, 2007, 447(7148): 1116-20.

[33] LIU Y H, TAN K A, MORRISON I W, et al. Macrophage migration is controlled by Tribbles 1 through the interaction between C/EBPbeta and TNF-alpha [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2013, 155(1-2): 67-75.

[34] MIYAJIMA C, ITOH Y, INOUE Y, et al. Positive Regulation of Interleukin-2 Expression by a Pseudokinase, Tribbles 1, in Activated T Cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38(8): 1126-33.

[35] WILLER C J, SCHMIDT E M, SENGUPTA S, et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(11): 1274-83.

[36] VAN DER LAAN S W, HARSHFIELD E L, HEMERICH D, et al. From lipid locus to drug target through human genomics [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(9): 1258-70.

[37] VIRTANEN K A, LIDELL M E, ORAVA J, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(15): 1518-25.

[38] TANG Q Q, LANE M D. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte [J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 715-36.

[39] CRISTANCHO A G, LAZAR M A. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(11): 722-34.

[40] LI C J, CHENG P, LIANG M K, et al. MicroRNA-188 regulates age-related switch between osteoblast and adipocyte differentiation [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(4): 1509-22.

[41] ZHU Y, LI N, HUANG M, et al. Adipose tissue hyaluronan production improves systemic glucose homeostasis and primes adipocytes for CL 316,243-stimulated lipolysis [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4829.

第二章 *Trib1* 敲除对小鼠棕色脂肪组织代谢功能的作用研究

哺乳动物的脂肪主要有两种类型,即储能的白色脂肪组织(white adipose tissue, WAT)和耗能的棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)。其中 WAT 将机体多余的能量转化为甘油三酯存储在细胞中,作为能量储库保护其他器官免受异位脂质沉积影响。而 BAT 含有多房脂滴和丰富的线粒体,是哺乳动物非颤栗性产热的主要器官^[1,2]。作为应对寒冷的表现,产热是一种代谢过程,包括颤栗产热和非颤栗产热。其中 BAT 参与的非颤栗性产热依赖于交感神经的调节和脂肪细胞膜上的 β_3 -肾上腺素能受体的激活^[3]。

BAT 产热的能力是通过上调线粒体 UCP1 蛋白表达介导的。UCP1 是位于线粒体膜上的 BAT 特异性蛋白,可使氧化磷酸化解偶联,导致 ATP 消耗和产热增加。游离脂肪酸是 BAT 氧化产热的主要能量来源。BAT 产热的激活会加速储存的甘油三酯和脂肪酸的消耗,以提供线粒体氧化的来源^[4]。除了在调节产热中的主要作用外, BAT 还参与外周组织的交互作用,包括肝脏、骨骼肌、肠道、中枢神经系统和免疫细胞,以控制全身能量平衡^[5]。

本研究在前面的章节已经证明了 *Trib1* 在 BAT 中的高表达,可能参与脂肪组织功能,影响 BAT 的代谢能力,但 *Trib1* 对脂肪组织功能的具体影响仍不清楚。因此本章节运用 *Trib1* 敲除小鼠,探究 *Trib1* 敲除对小鼠体重、血脂、和产热的影响。并通过给与 *Trib1* 敲除小鼠 CL316243 处理,提高 BAT 功能,探究 *Trib1* 敲除对小鼠棕色脂肪组织代谢水平的影响。

第一节 *Trib1* 敲除小鼠的构建及繁育鉴定

本研究通过 CRISPR/Cas9 技术,建立 *Trib1* 全身敲除小鼠进行繁育扩群。对新生小鼠剪取鼠尾,提取小鼠 DNA 通过核酸电泳鉴定基因型,选取同窝野生型和 *Trib1* 敲除小鼠进行对照实验。

1 实验材料

1.1 实验动物

CRISPR/Cas9 介导的 *Trib1* 基因敲除小鼠由赛业生物科技有限公司生产，合格证号：32004300000904。所有动物实验程序均由中国医学科学院北京协和医学院动物伦理委员会批准（SLXD-20180706）。

1.2 实验试剂

名称	厂家	货号
氢氧化钠	国药集团化学试剂有限公司	10019762
EDTA	国药集团化学试剂有限公司	H2241926
Tris-HCl	索莱宝科技有限公司	T8230
琼脂糖	Biowest 公司	111860
50×TAE	博奥拓达科技有限公司	top0751
MightyAmp™ Genotyping Kit	宝日医生物技术有限公司	R074A
核酸染料	博奥龙免疫技术有限公司	BF07001
DNA Marker	博奥龙免疫技术有限公司	BDIT0040

1.3 实验仪器

名称	厂家	型号
恒温金属浴	六一仪器厂	WD-2110A
PCR 仪	Eppendorf 公司	Mastercycler® X50
核酸电泳仪	Bio Rad 公司	1645050
紫外分析仪	其林贝尔仪器制造有限公司	GL-3120
台式离心机	Eppendorf 公司	Centrifuge 5427 R

2 实验方法

2.1 *Trib1* 敲除小鼠的构建

Cas9 和 sgRNA 被共同注射到受精卵中，以产生敲除小鼠。

sgRNA 靶序列包括：sgRNA1(5′ -TTGCGAGGTCGGCATGGG-3′)和 sgRNA2 (5′ -GCATAGGTTTGGTAACCCGAGG-3′)。

通过对使用以下引物扩增的 PCR 产物进行测序，筛选小鼠是否存在 *Trib1* 敲除：*Trib1*-sense (5′ -GCTTGGTTGGCAGAGATAAG-3′) 和 *Trib1*-antisense (5′ -GTGCTAACTTCGGGTCCTCAGC-3′)。 *Trib1* 基因敲除小鼠与野生型 C57BL/6 小鼠交配，获得杂合子 *Trib1* 小鼠。然后将这些小鼠交配至少三代，以获得 *Trib1* 基

因敲除小鼠和野生型小鼠。

2.2 PCR 鉴定小鼠基因型

2.2.1 小鼠 DNA 提取

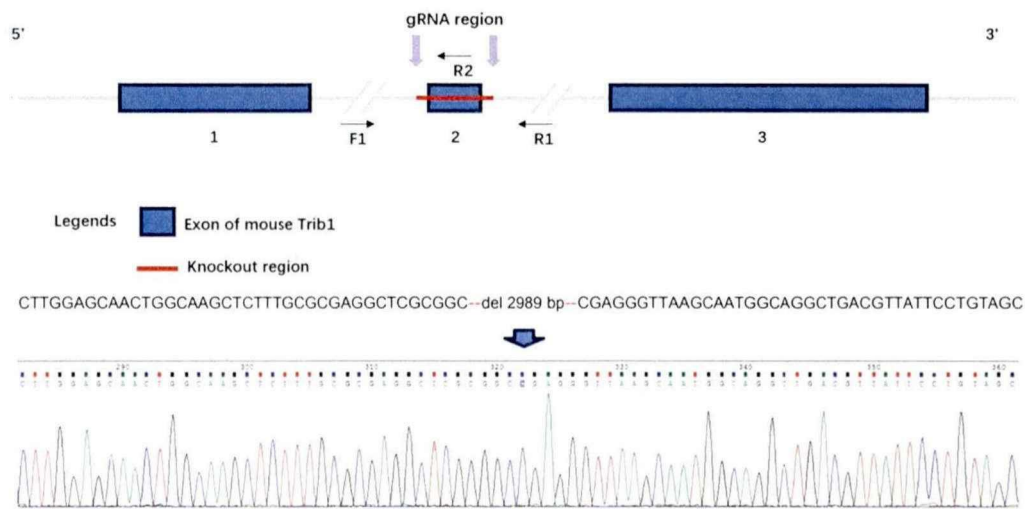
剪取 1-2 mm 宽出生后 7-12 天的小鼠耳朵，置于标记好的 1.5 mL 管内。加入 75 μ L 的碱液（氢氧化钠 50 g，0.5 mol/L 的 EDTA 20 mL，加入 1L 超纯水混匀），金属浴 100℃ 加热 40 min。取出离心管加入 75 μ L 中和液（Tris-HCl 粉末 315.2 g，加入 1L 超纯水混匀，pH:5.0），待冷却后 1500 r 离心 2 min，吸取上层清液即为 DNA 样品。

2.2.2 样本制备

在标记好的 1.5 mL 去酶管内，配置扩增溶液，体系如下：

Component	Volume (μ L)
Sample DNA	1.25
2×Mighty Buffer	12.5
ddH ₂ O	9.75
Enzyme	0.5
Primer (F+R)	1.0 (0.5+0.5)
Total	25.0

其中 Primer R 分为 R1 和 R2，引物序列如下：



PCR Primers1 (Annealing Temperature 60.0 °C):

F1: 5'-GCTTGGGTTTGGCAGAGCAGATAAG-3'

R1: 5'-TGCTGGCTACAGGAATAACGTCAGC-3'

Product size: 530 bp
PCR Primers2 (Annealing Temperature 60.0 °C):
F1: 5'-GCTTGGGTTTGGCAGAGCAGATAAG-3'
R2: 5'-AGACCGGCCATCCTGTATCTAGTTG-3'
Product size: 600 bp
Homozygotes: 530 bp
Heterozygotes: 530 bp/600 bp
Wildtype allele: 600 bp

将反应体系溶液混匀，置于 PCR 仪中，设定反应程序，反应程序如下：

Program	Step	Cycle
Stage 1	94℃ for 180 s	1
Stage 2	94℃ for 30 s	30
	60℃ for 30 s	
	72℃ for 90 s	
Stage 3	68℃ for 600 s	1
	4℃ for ∞	

程序结束后取出样品，每管加入 6.125 μL 的 Loading Dye 混匀。

2.2.3 琼脂糖凝胶的制备

在锥形瓶内准确称量 0.9 g 的琼脂糖，加入 90 mL 的 1×TAE 溶液，置于微波炉中火加热 2 分 30 秒至澄清沸腾。小心取出锥形瓶，加入 10 μL 的核酸染料并摇匀。倒入准备好的模具槽中，室温静置 20 min 待琼脂糖凝胶凝固。

2.2.4 核酸电泳和检测

在电泳槽中放入凝固的琼脂糖凝胶，加入 1×TAE 溶液没过上层胶面 1 cm，向上拔出梳子。在槽中加入 15 μL 制备好的样品，边缘槽加入 10 μL 核酸 Marker。连接仪器正负极，选择恒压 130 伏模式启动仪器，24-27 min 后停止电泳。小心取出凝胶置于紫外下检测。

3 实验结果

3.1 Trib1 敲除小鼠的鉴定

通过核酸电泳鉴定小鼠基因型。其中 R1 阴性，R2 阳性为野生型（Wildtype，WT）；R1 阳性，R2 阳性为杂合型（Heterozygotes，HE）；R1 阳性，R2 阴性为敲除型（Knockout，KO）。

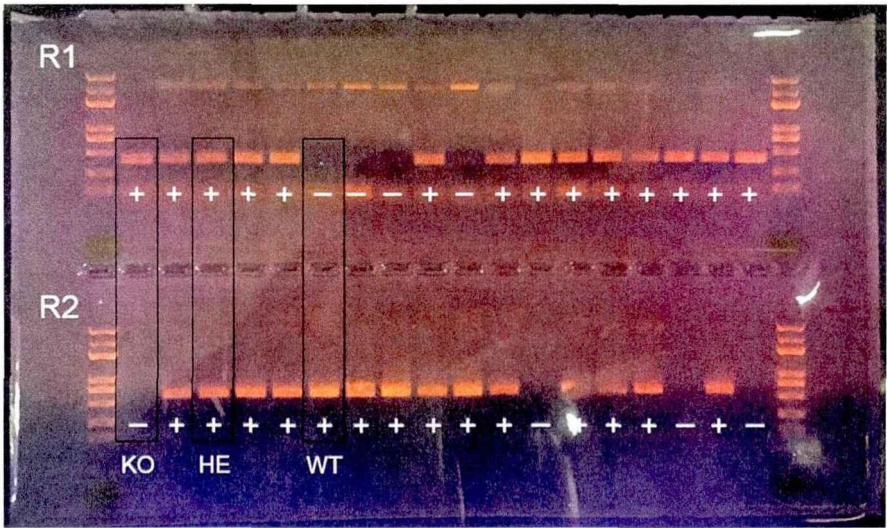


Figure 2-1 Identification of *Trib1* knockout mice. Representative pictures of genotype identification of heterozygous paired parental newborn mice.

3.2 Trib1 敲除小鼠各基因型出生率及性别比例

本研究对杂合配对的亲本 264 只新生小鼠性别和基因型进行统计。结果显示雄性 136 只，雌性 128 只。性别比例雄性/雌性为 1.0625。雄性 WT 出生率为 31.62%，HE 出生率为 58.09%，KO 出生率为 10.29%。雌性 WT 出生率为 24.22%，HE 出生率为 67.97%，KO 出生率为 7.81%。全体 WT 出生率为 28.03%，HE 出生率为 62.88%，KO 出生率为 9.09%，敲除小鼠出生率远低于孟德尔遗传定律。

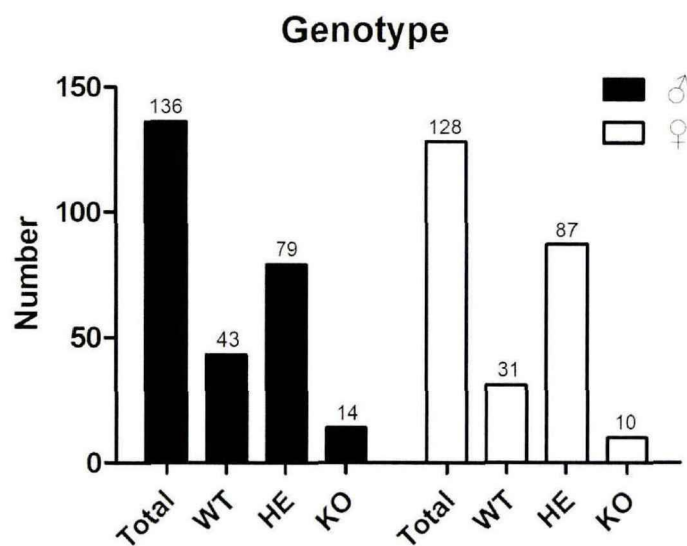


Figure 2-2 Birth rate and sex ratio of each genotype in *Trib1* knockout mice. Statistical map of sex and genotype of heterozygous paired parental newborn mice.

4 小结

对杂合配对亲本的新生小鼠性别和基因型进行统计。结果显示新生小鼠中 KO 出生率 9.09 % 远低于孟德尔遗传定律。已有文献报道 *Trib1* 纯合敲除小鼠具有高围产期死亡率^[6]，这是导致 KO 小鼠低出生率的原因。针对后期实验计划，小鼠扩群数量宜维持 200 只以上。

第二节 *Trib1* 敲除对小鼠体重、血脂和产热的影响

在第一章的研究中已经证明了 *Trib1* 在 BAT 中的高表达,可能参与脂肪组织功能,但 *Trib1* 对脂肪组织功能的具体影响仍不清楚。因此对 *Trib1* 敲除小鼠进行基因型鉴定后,选取同窝的野生型和 *Trib1* 敲除小鼠测定体重、体脂、和血脂等脂质代谢相关表型,探究 *Trib1* 敲除对脂肪组织功能的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物

CRISPR/Cas9 介导的 *Trib1* 基因敲除小鼠由赛业生物科技有限公司生产,合格证号:32004300000904。所有动物实验程序均由中国医学科学院北京协和医学院动物伦理委员会批准(SLXD-20180706)。

1.2 实验试剂

与前期实验材料重复部分不再列举。

名称	厂家	货号
LDL-C 测定试剂盒	中生北控生物科技股份有限公司	20162400518
HDL-C 测定试剂盒	中生北控生物科技股份有限公司	20152400950
TG 测定试剂盒	中生北控生物科技股份有限公司	20142401132
CHO 测定试剂盒	中生北控生物科技股份有限公司	20142401126
Mouse Leptin ELISA	冬歌博业生物科技有限公司	DG30235M
Mouse Insulin ELISA	Raybiotech 公司	ELM-Insulin
Mouse Adiponectin ELISA	冬歌博业生物科技有限公司	DG30529M
羊毛脂	吉至生化科技有限公司	L87671

1.3 实验仪器

与前期实验仪器重复部分不再列举。

名称	厂家	型号
体脂仪	Bruker 公司	LF50/90
动物代谢分析系统	Panlab 公司	Oxylet Pro
电子秤	幸运电子设备有限公司	XY300C
酶标仪	Tecan 公司	Infinite M1000
冰冻切片机	Leika 公司	CM1900

2 实验方法

2.1 *Trib1* 敲除小鼠脂肪组织分离取材

取 8 周龄的野生型小鼠和敲除小鼠，禁食一夜，称量记录小鼠体重。收集小鼠内眦血样，脱颈椎处死小鼠。酒精消毒小鼠，在冰上快速剪取小鼠的 BAT、iWAT、eWAT、肝脏、脾脏和心脏，并称量记录组织重量。将脂肪样本和肝脏样本取一半置于 4% 多聚甲醛中固定，另一半置于标记好的去酶管内，于液氮中快速冻存。小鼠血浆室温静置两小时待出现分层后，3000 r 离心 15 min 收集上层血清用于测定。

2.2 体脂仪测定 *Trib1* 敲除小鼠体脂比率

提前一天开机仪器进行预热，用标准样品平衡仪器后开始测定。将小鼠置于测定笼具筒中调节旋钮，使小鼠无法自由移动。将测定筒推入体脂仪中，利用核磁共振对身体非侵入式进行组分测定，随后仪器将显示小鼠脂肪、自由体液和瘦肉的含量值。

2.3 *Trib1* 敲除小鼠脂肪和肝脏组织 HE 染色

同第一章第三节实验方法 2.2。

2.4 *Trib1* 敲除小鼠肝脏组织油红染色

肝脏组织在 4% 多聚甲醛中固定两天，组织冲洗后 OTC 包埋剂浸没组织，置于 -20℃ 冷冻，冰冻切片机 5-10 μm 切片。切片 60% 异丙醇浸润 1 min，放入油红 O 染液（油红原液：水 = 3:2）染色 8 min，再放入 60% 异丙醇中分化。颜色适宜后放入苏木素染料中复染细胞核 1-2 min，PBS 冲洗，切片干燥后甘油明胶封片，用显微镜拍照观察肝脏组织的变化。

2.5 生化仪检测 *Trib1* 敲除小鼠血脂水平

使用 Beckman AU480 全自动生化仪，按照试剂盒说明书检测小鼠血脂指标包括高密度脂蛋白（High density lipoprotein, HDL），低密度脂蛋白（Low density lipoprotein, LDL）和总胆固醇（Total cholesterol, TC）。

2.6 ELISA 法检测 *Trib1* 敲除小鼠血清瘦素、胰岛素和脂联素水平

根据试剂盒说明书，使用酶联免疫吸附测定试剂盒测量血清中瘦素、胰岛素和脂联素的表达水平。

2.7 动物代谢分析系统检测 *Trib1* 敲除小鼠呼吸代谢水平

为了测量小鼠的基础耗氧量 (VO_2) 和二氧化碳生成量 (VCO_2)，使用了动物代谢分析系统 (LE 405 Gas Analyzer, Panlab)。将小鼠置于代谢笼 (Oxylet Pro, Panlab) 中，可自由获取食物和水，并保持 12/12 小时的光暗循环周期，使小鼠适应 24 小时。适应结束后，每小时测量环境和代谢笼内 VO_2 和 VCO_2 ，记录每小时小鼠的摄食量、饮水量和活动量，连续测量 24 小时后结束。

2.8 寒冷环境小鼠体温检测

使用羊毛脂润滑温度计探头后，记录小鼠初始肛温。将小鼠单只置于 4℃ 环境的饲养笼中（避免小鼠抱团取暖影响体温），可自由获取食物和水。每小时记录小鼠肛温，连续测量 8 小时。

2.9 统计学分析

使用软件 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析，实验数据均采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。数据进行方差齐性检验，在两组间，采用双尾 T 检验 (Two-tailed Student's t-test)；多组间采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)，在组间差异有统计学意义后采用 Turkey 进行两两比较，当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 *Trib1* 敲除对小鼠体重、体脂和脏器系数的影响

为了确定 *Trib1* 在小鼠代谢中的作用，本研究使用 CRISPR/Cas9 技术获得了 *Trib1* 敲除小鼠，并测定 8 周龄小鼠体重、体脂和组织重量的变化。结果显示喂食正常食物的野生型和 *Trib1* 敲除小鼠的体重和脂肪重量没有显著差异 (Figure 2-3A B)。体脂仪测定显示 *Trib1* 敲除小鼠体脂率低于野生型小鼠 (Figure 2-3C)，但 *Trib1* 敲除小鼠肝脏重量高于野生型 (Figure 2-3D)，这提示我们存在脂肪的异位堆积，表明 *Trib1* 对小鼠脂质代谢存在调节作用。

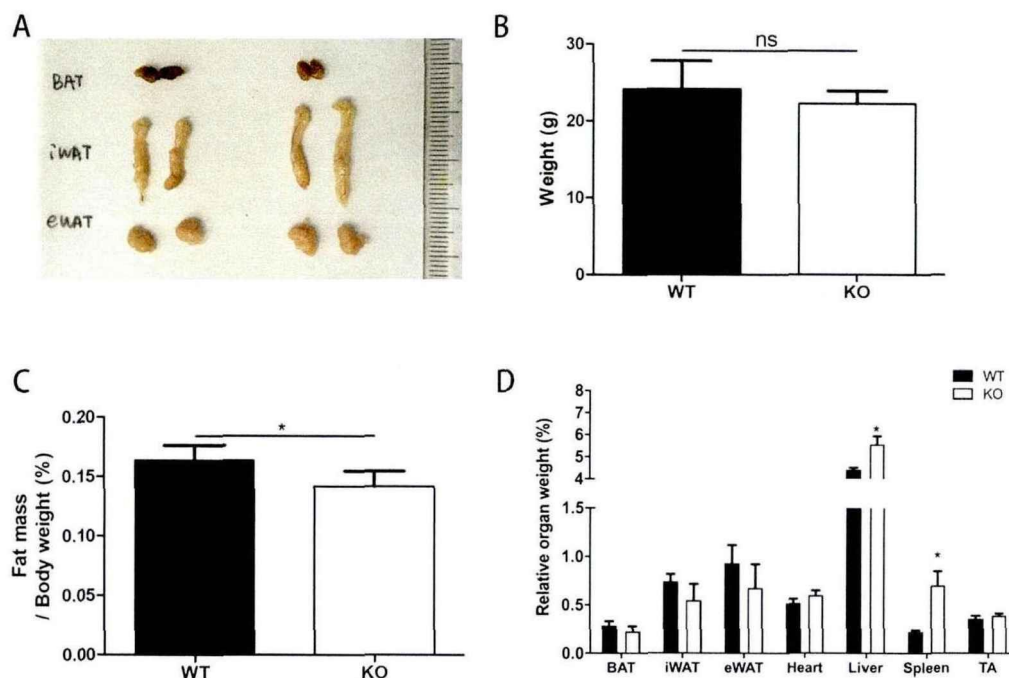


Figure 2-3 Effects of *Trib1* knockout on body weight, body fat and organ coefficients in mice. Representative adipose tissue image (A) and weight (B) of *Trib1* KO and WT mice. Body composition (C) and tissue weight ratio to bodyweight (D) of *Trib1* KO and WT mice. n=5. * $P < 0.05$ vs. *Trib1* WT mice.

3.2 *Trib1* 敲除对血脂和脂肪因子的影响

瘦素是作用于下丘脑瘦素受体的脂肪因子，可控制食欲和促进能量消耗。在肥胖患者体内下丘脑瘦素受体敏感性降低，瘦素水平会显著升高，表现出瘦素抵抗^[7]。脂联素是内源性脂肪因子，可提高机体胰岛素敏感性，减少肝脏糖异生、促进脂肪酸代谢和利用^[8]。本研究通过测定血清血脂、瘦素、胰岛素和脂联素水平，验证 *Trib1* 对脂肪代谢的作用。结果显示 *Trib1* 基因敲除小鼠血清中 TC 和 LDL 升高，HDL 水平降低（Figure 2-4A B C）。进一步结果显示，血清瘦素和胰岛素水平显著上升，脂联素水平显著降低（Figure 2-4D E F），表现出瘦素抵抗和胰岛素抵抗。这些结果提示我们 *Trib1* 敲除小鼠脂代谢紊乱。

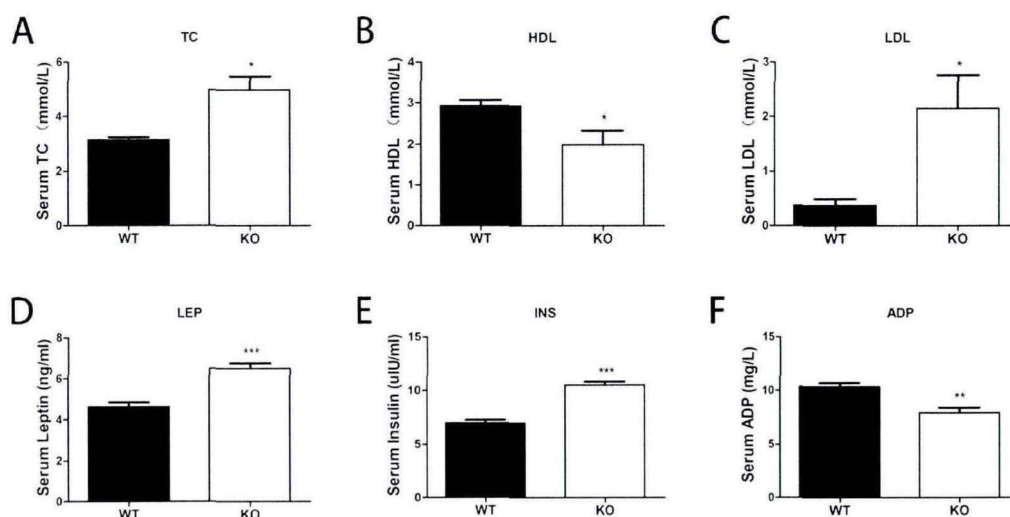


Figure 2-4 Effects of *Trib1* knockout on blood lipids and adipokines. Serum TC (A), HDL (B), LDL (C), leptin (D), insulin (E) and adiponectin (F) levels in *Trib1* KO and WT mice. $n=5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. *Trib1* WT mice.

3.3 *Trib1* 敲除对小鼠肝脏组织的影响

前面的研究发现, *Trib1* 敲除使小鼠肝脏重量增加, 我们通过 H&E 和油红染色验证 *Trib1* 敲除对小鼠肝脏组织的影响。H&E 染色结果显示肝细胞空泡面积增大。通过油红对肝脂质进行染色, 结果显示虽然脂质面积表现出上升的趋势, 但在 8 周龄野生型和 *Trib1* 敲除小鼠间无显著差异。

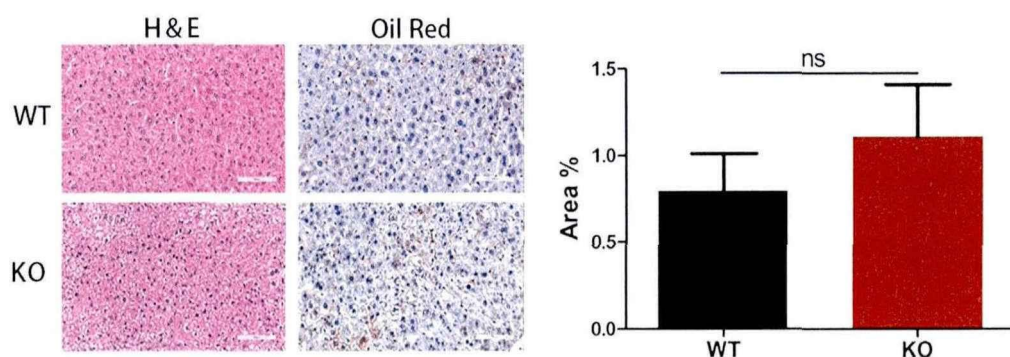


Figure 2-5 Effects of *Trib1* knockout on mouse liver tissue. Representative H&E staining and oil red O staining image and red staining area of liver tissue from *Trib1* KO and WT mice. Scale bar: 100 μm . $n=5$. * $P < 0.05$ vs. control group.

3.4 *Trib1* 敲除对小鼠脂肪组织的影响

本研究通过 H&E 染色和免疫组化验证 *Trib1* 敲除对小鼠脂肪组织的影响。H&E 染色显示白色脂肪组织包括 iWAT 和 eWAT 的脂肪细胞大小无明显变化 (Figure 2-4A), 但 BAT 中脂肪细胞脂滴增大 (Figure 2-4B), 且 UCP1 表达量降低。这些

结果表明, *Trib1* 敲除对白色脂肪无显著影响, 对 BAT 存在调节作用。

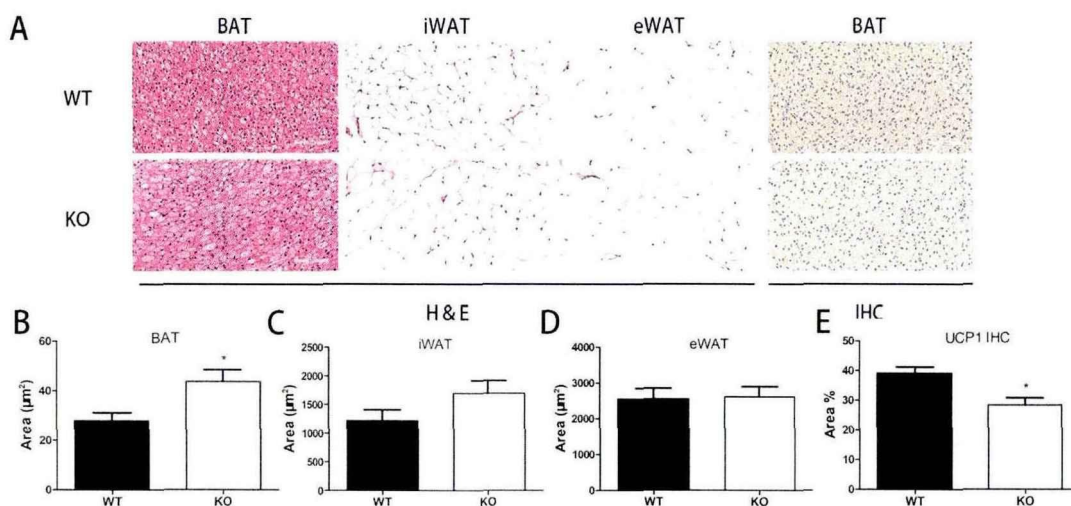


Figure 2-6 Effects of *Trib1* knockout on adipose tissue in mice. Representative hematoxylin and eosin (H&E) staining and immunohistochemical image (A) and adipocyte area (B-E) of BAT, iWAT and eWAT from *Trib1* KO and WT mice. Scale bar: 100 μm. n=5. * $P < 0.05$ vs. *Trib1* WT mice.

3.5 *Trib1* 敲除对小鼠呼吸代谢的影响

在确认 *Trib1* 敲除影响 BAT 细胞脂滴和 UCP1 表达后, 本研究通过动物代谢分析系统测量了小鼠的代谢水平。结果表明 *Trib1* 敲除小鼠的基础耗氧量 (VO_2) 和二氧化碳生成量 (VCO_2) 都低于野生型, 显现出代谢能力的显著降低。

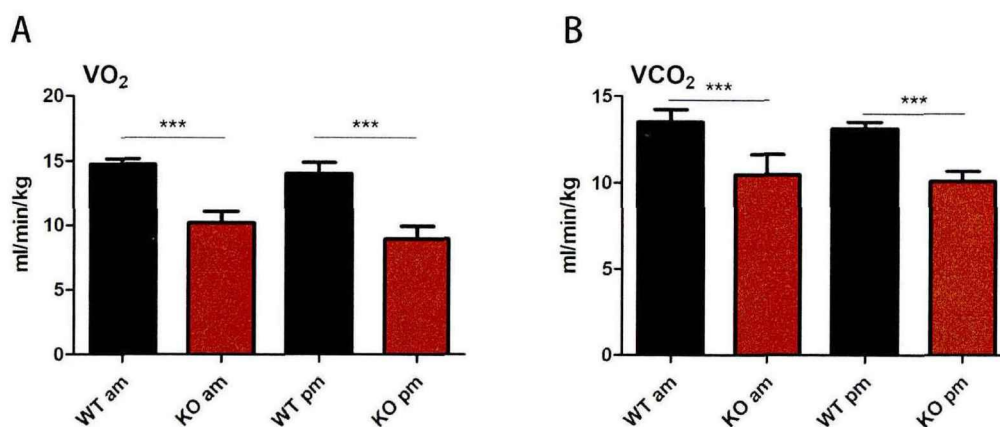


Figure 2-7 Effects of *Trib1* knockout on respiratory metabolism in mice. Energy expenditure was evaluated by measurement of oxygen consumption (A) and carbon dioxide release (B) in *Trib1* KO and WT mice. n=5. *** $P < 0.001$ vs. *Trib1* WT mice.

3.6 Trib1 敲除对小鼠在寒冷环境中适应性产热的影响

响应于寒冷刺激，BAT 会激活并利用脂肪酸产热以维持体温。本研究通过将小鼠暴露在 4℃ 环境下 8 小时连续记录其肛温，评估了 *Trib1* 对 BAT 产热的影响。结果表明，暴露于 4℃ 后，小鼠的温度降低。但 *Trib1* 敲除小鼠的肛温显著低于野生型小鼠，表明 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 产热维持体温的能力低于野生型小鼠，提示我们 *Trib1* 敲除对小鼠 BAT 功能的调节作用。

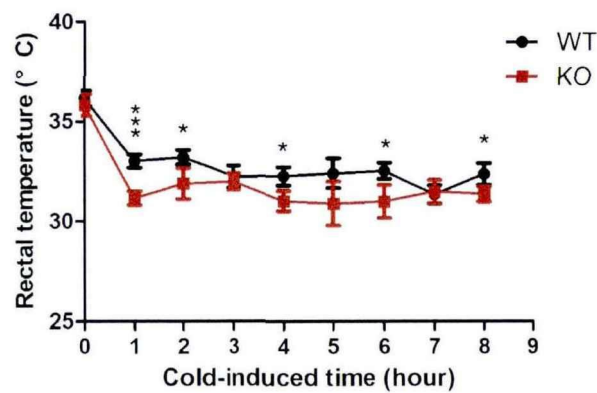


Figure 2-8 Effects of *Trib1* knockout on adaptive thermogenesis in cold environment in mice. After 8 hours of cold exposure, the rectal temperature of *Trib1* KO and WT mice. n=5. **P* < 0.05, ****P* < 0.001 vs. *Trib1* WT mice.

4 小结

本研究通过 CRISPR/cas9 技术获得了 *Trib1* 基因敲除小鼠，并对其表型进行测定。与野生型相比，8 周龄 *Trib1* 敲除小鼠脂肪组织重量和体重无显著变化，但肝脏重量增加。另外，*Trib1* 敲除小鼠表现出血脂水平上升，并伴随着瘦素和胰岛素抵抗。进一步的研究通过组织切片对小鼠脂肪和肝脏组织进行观察，结果显示 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 细胞脂滴增大和 UCP1 表达降低。随后我们通过动物代谢分析系统和寒冷环境肛温测定，评价 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 的代谢功能。结果显示 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 代谢和产热功能降低，提示我们 *Trib1* 对 BAT 代谢功能具有调节作用。

第三节 肾上腺素处理对 *Trib1* 敲除小鼠棕色脂肪组织代谢水平的影响

上一节研究证明 *Trib1* 敲除小鼠表现出高血脂、胰岛素抵抗和瘦素抵抗等肥胖小鼠的代谢表征，且 BAT 产热功能降低，表明 *Trib1* 对 BAT 代谢产热功能具有调节作用。但 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 功能降低的原因仍不清楚，因此在本节采用经典的 β_3 肾上腺素受体激动剂（CL316243）处理 *Trib1* 敲除小鼠，提高小鼠 BAT 的代谢产热功能，探究 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 产热功能降低的原因。

1 实验材料

1.1 实验动物

CRISPR/Cas9 介导的 *Trib1* 基因敲除小鼠由赛业生物科技有限公司生产，合格证号：32004300000904。所有动物实验程序均由中国医学科学院北京协和医学院动物伦理委员会批准（SLXD-20180706）。

1.2 实验试剂

与前期实验材料重复部分不再列举。

名称	厂家	货号
肾上腺素受体激动剂	Sigma 公司	C5976
ALT 测定试剂盒	中生北控生物科技股份有限公司	20142401158
AST 测定试剂盒	中生北控生物科技股份有限公司	20142401157
ALP 测定试剂盒	中生北控生物科技股份有限公司	20142401128
电镜固定液	赛维尔生物科技有限公司	G1102

1.3 实验仪器

与前期实验仪器重复部分不再列举。

名称	厂家	型号
透射电子显微镜	日本电子株式会社	JEM-1400plus
全自动生化仪	Beckman Coulter 公司	AU480

2 实验方法

2.1 肾上腺素配置与动物处理

肾上腺素受体激动剂（CL316243）的配置：使用生理盐水将 CL316243 配置为 5 mg/mL 的储备液，避光-20℃冰箱保存。CL316243 工作液浓度为 1 mg/mL。取 8 周龄的野生型小鼠和敲除小鼠，隔天腹腔注射 CL316243（1 mg/kg）14 天。

2.2 *Trib1* 敲除小鼠脂肪组织分离取材及样本制备

取 CL316243 处理 14 天的野生型小鼠和敲除小鼠，禁食一夜，称量记录小鼠体重。收集小鼠内眦血样，脱颈椎处死小鼠。清洁解剖剪和解剖镊，酒精消毒小鼠，在冰上快速剪取小鼠的 BAT 称量记录组织重量，随后立即取四分之一快速放入预冷的电镜固定液中进行固定。取材操作应明确快速，小心夹取组织，避免挤压损伤组织。快速固定，避免组织自溶解。其余取材操作步骤同本章第二节实验方法 2.1。

2.3 体脂仪测定 *Trib1* 敲除小鼠体脂比率

同本章第二节实验方法 2.2。

2.4 *Trib1* 敲除小鼠脂肪和肝脏组织 HE 染色

同第一章第三节实验方法 2.2。

2.5 *Trib1* 敲除小鼠肝脏组织油红染色

同本章第二节实验方法 2.4。

2.6 生化仪检测 *Trib1* 敲除小鼠血脂和肝损伤水平

小鼠肝损伤相关指标包括天门冬氨酸氨基转移酶（Aspartic acid transferase, AST），丙氨酸氨基转移酶（Alanine aminotransferase, ALT），碱性磷酸酶（Alkaline phosphatase, ALP）。使用 Beckman 全自动生化仪按照试剂盒说明书进行检测。其余操作步骤同本章第二节实验方法 2.5。

2.7 动物代谢分析系统检测 *Trib1* 敲除小鼠呼吸代谢水平

同本章第二节实验方法 2.7。

2.8 寒冷环境小鼠体温检测

同本章第二节实验方法 2.8。

2.9 RT-PCR 检测 *Trib1* 和产热基因的表达

同第一章第二节实验方法 2.2。

2.10 透射电镜观测 *Trib1* 敲除小鼠脂肪组织线粒体结构

用 PBS 清洗组织三次，持续 30min，用 1% 的渗透酸溶液固定 1h，然后冲洗。使用乙醇进行梯度脱水、使用包埋剂进行梯度渗透、加热聚合、超薄切片和染色，使用 JEOL JEM-1400Plus 透射电子显微镜进行观察。

2.11 统计学分析

使用软件 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析，实验数据均采用 mean ± SD 表示。数据进行方差齐性检验，在两组间，采用双尾 T 检验（Two-tailed Student's t-test）；多组间采用单因素方差分析（One-Way ANOVA），在组间差异有统计学意义后采用 Turkey 进行两两比较，当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 小鼠体重、体脂和脏器系数的影响

为了研究 *Trib1* 敲除后 BAT 产热减少的原因，本研究使用 CL316243 刺激野生型和 *Trib1* 敲除小鼠，提高 BAT 代谢脂肪产热的功能，并测定小鼠体重、体脂和组织重量的变化。结果显示野生型和 *Trib1* 敲除小鼠的体重没有显著差异（Figure 2-9A），但 *Trib1* 敲除小鼠体脂率高于野生型小鼠（Figure 2-9B），同时我们观察到了小鼠肝脏重量显著升高（Figure 2-9C），与前期肝脏解剖结果一致。这提示我们存在脂肪在肝脏的异位堆积，且肾上腺素受体激动剂反而加剧 *Trib1* 敲除小鼠肝脏脂质沉积的进展。

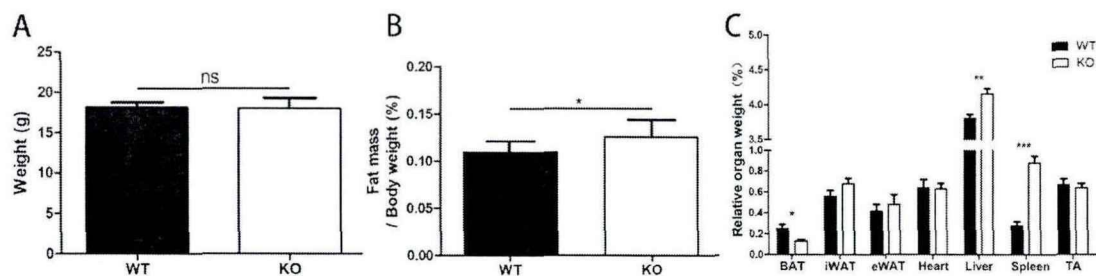


Figure 2-9 Effects of CL316243 treatment on body weight, body fat and organ coefficient of *Trib1* knockout mice. Body weight (A), composition (B) and tissue weight ratio to bodyweight (C) of *Trib1* KO and WT mice treated with CL316243. n=4. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs. *Trib1* WT mice.

3.2 血脂和肝损伤水平的影响

因为增加的脂质沉积会导致肝细胞损伤，从而增加血清 AST，ALT 和 ALP 水平升高，是检测肝脏脂肪变性和非酒精性脂肪肝病的有效指标^[9]，因此我们对血清血脂和肝损伤水平进行测定。结果显示 *Trib1* 敲除小鼠血清中 LDL 水平升高(Figure 2-10B)。进一步结果显示，肾上腺素处理使 *Trib1* 敲除小鼠血清 AST，ALT 和 ALP 水平显著升高（Figure 2-10D E F），表现出明显的急性肝损伤。

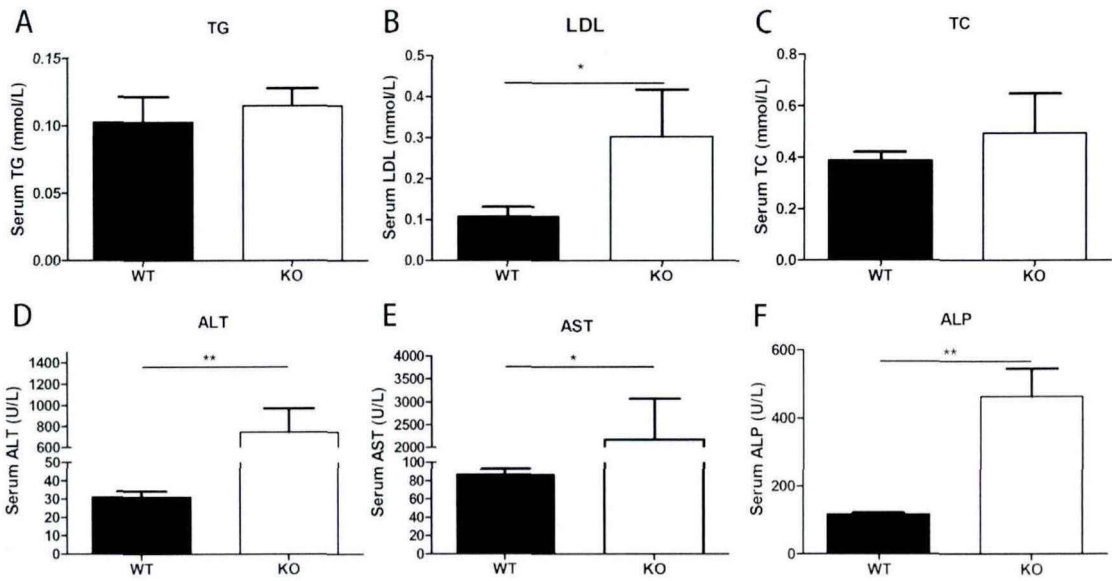


Figure 2-10 Effects of CL316243 treatment on blood lipids and liver injury levels in *Trib1* knockout mice. Serum TG (A), LDL (B), TC (C), ALT (D), AST (E) and ALP (F) levels in *Trib1* KO and WT mice treated with CL316243. n=4. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs. *Trib1* WT mice.

3.3 小鼠肝脏组织的影响

CL316243 是 β -肾上腺素受体激动剂，可促进体内脂肪的分解，并诱导 BAT 线粒体氧化磷酸化解偶联，利用游离脂肪酸产生热量^[10]。前面的研究发现，CL316243 处理后 *Trib1* 敲除小鼠肝脏重量反而显著增加且表现出肝损伤，我们通过肝切片对肝脏脂质进行染色。结果显示 *Trib1* 敲除小鼠肝细胞脂质显著增多，肝细胞空泡面积增大。这提示我们 BAT 线粒体功能障碍。由于 CL316243 刺激脂肪分解，升高的

游离脂肪酸没有被 BAT 消耗利用，因此刺激肝脏中的脂肪酸合成，导致大量游离脂肪酸在肝脏中积累，表现出肝损伤。

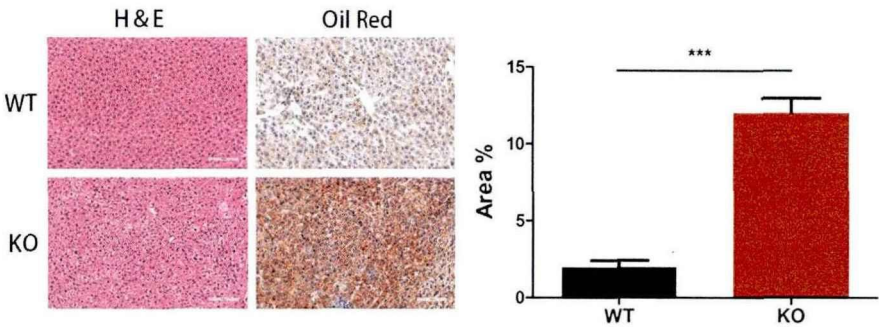


Figure 2-11 Effects of CL316243 treatment on liver tissue of *Trib1* knockout mice. Representative H&E staining and oil red O staining image and red staining area of liver tissue from *Trib1* KO and WT mice treated with CL316243. Scale bar: 100 μ m. n=4. *** P < 0.001 vs. control group.

3.4 小鼠脂肪组织的影响

本研究通过 H&E 染色验证 CL316243 处理对 *Trib1* 敲除小鼠脂肪组织的影响。H&E 染色显示 CL316243 处理使野生型小鼠 iWAT 脂滴变小，从单眼转化为多眼，表现出脂质代谢水平增加的棕色化转变，而 *Trib1* 敲除小鼠白色脂肪无明显改变。这些结果表明 *Trib1* 敲除小鼠对脂质的代谢能力降低。

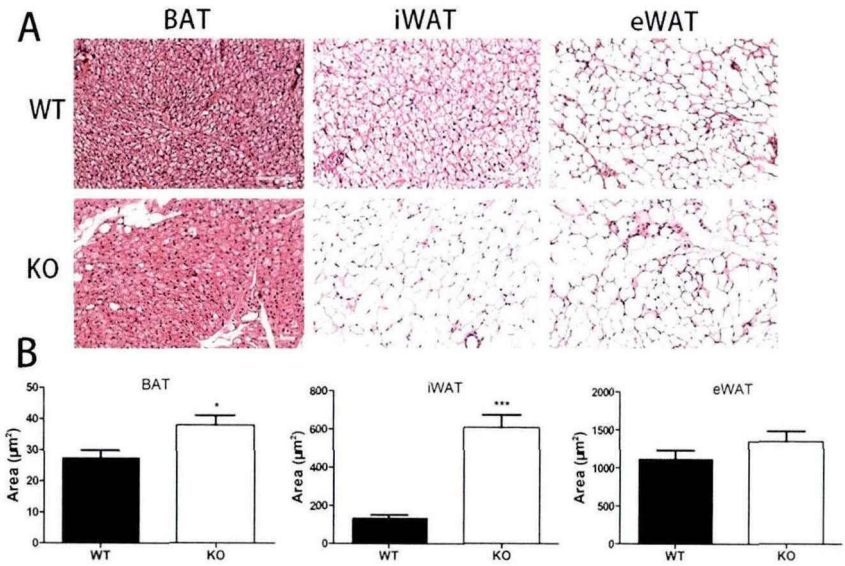


Figure 2-12 Effects of CL316243 treatment on adipose tissue in *Trib1* knockout mice. Representative hematoxylin and eosin (H&E) staining image (A) and adipocyte area (B) of BAT, iWAT and eWAT from *Trib1* KO and WT mice treated with CL316243. Scale bar:

100 μ m. n=4. * P < 0.05, *** P < 0.001 vs. *Trib1* WT mice.

3.5 小鼠呼吸代谢的影响

在 CL316243 处理后,我们发现 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 分解利用脂肪的能力降低。因此我们通过动物代谢分析系统对 *Trib1* 敲除小鼠的代谢水平进行评估。结果表明 CL316243 处理后 *Trib1* 敲除小鼠的 VO_2 和 VCO_2 都低于野生型。实验结果表明 *Trib1* 敲除小鼠的呼吸代谢水平仍低于野生型。

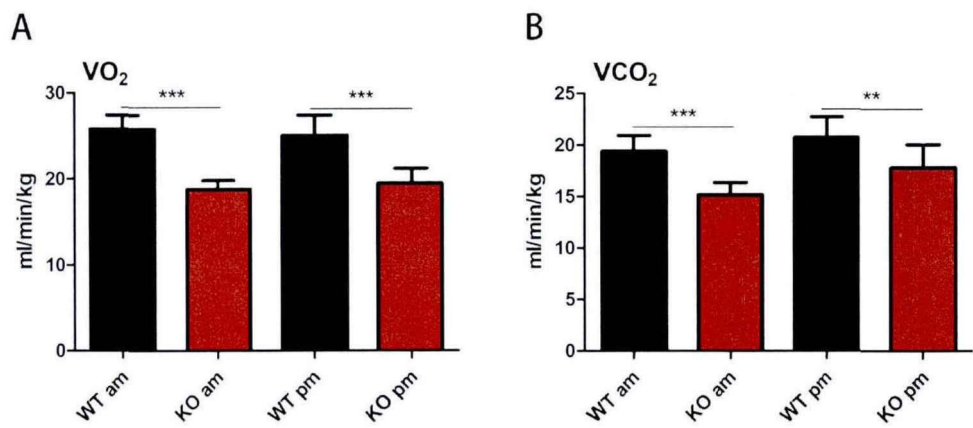


Figure 2-13 Effects of CL316243 treatment on respiratory metabolism in *Trib1* knockout mice. Energy expenditure was evaluated by measurement of oxygen consumption (A) and carbon dioxide release (B) in *Trib1* KO and WT mice treated with CL316243. n=4. ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. *Trib1* WT mice.

3.6 小鼠在寒冷环境中适应性产热的影响

本研究将 CL316243 处理的野生型和 *Trib1* 敲除小鼠单只置于寒冷环境中,评价 BAT 的适应性产热水平。结果表明 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 产热维持体温的能力低于野生型小鼠,提示我们 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 产热功能降低。

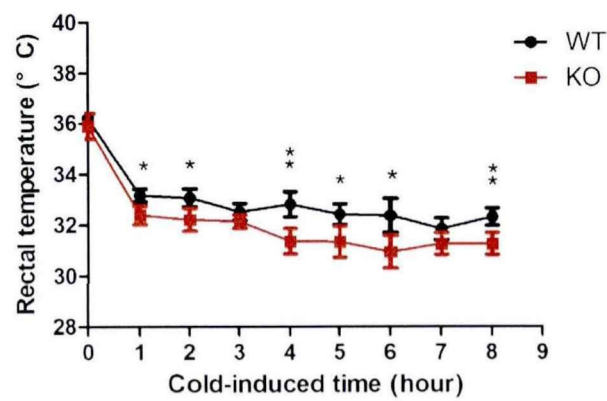


Figure 2-14 Effects of CL316243 treatment on adaptive thermogenesis in *Trib1*

knockout mice in a cold environment. After 8 hours of cold exposure, the rectal temperature of *Trib1* KO and WT mice treated with CL316243. n=4. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. *Trib1* WT mice.

3.7 小鼠产热基因的影响

本研究通过 RT-PCR 对 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 产热相关基因表达水平进行测定。结果表明，CL316243 处理提高了野生型小鼠产热基因的表达。但 CL316243 处理后，*Trib1* 敲除小鼠的 BAT 中产热基因的表达远低于野生型。

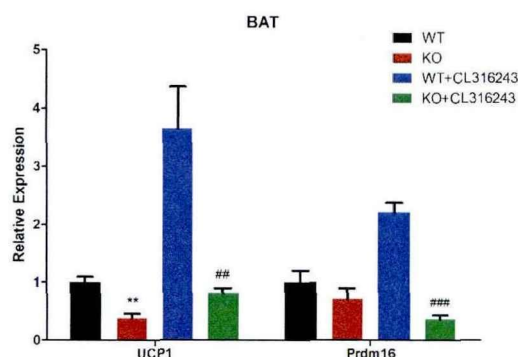


Figure 2-15 Effects of CL316243 treatment on thermogenic genes in *Trib1* knockout mice. The mRNA level of thermogenesis related genes in BAT from *Trib1* KO and WT mice treated with CL316243. n=4. ** $P < 0.01$ vs. *Trib1* WT mice; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. *Trib1* WT mice treated with CL316243.

3.8 小鼠 BAT 线粒体结构的影响

在前期我们确认了 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 的脂质代谢和产热功能降低。由于线粒体是 BAT 产热和脂肪酸 β -氧化的关键场所，因此本研究通过透射电镜对 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 线粒体结构进行观察。结果显示野生型小鼠 BAT 线粒体结构完整，呈椭圆形。而 CL316243 处理的 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 线粒体肿胀，线粒体膜结构破坏。这些结果表明，*Trib1* 基因敲除导致的线粒体结构损伤，损害 BAT 的脂质代谢和产热功能。

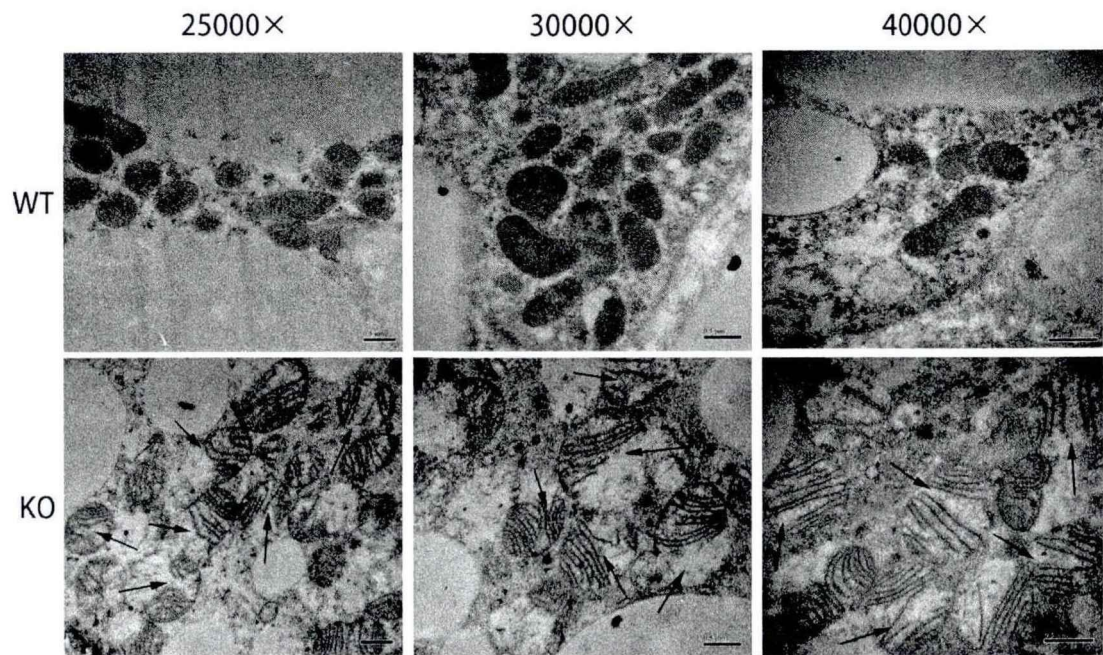


Figure 2-16 Effects of CL316243 treatment on mitochondrial structure of BAT in *Trib1* knockout mice. After 8 hours of cold exposure, the rectal temperature of *Trib1* KO and WT mice. Scale bar: 0.5 μ m. n=4.

4 小结

本研究通过对 *Trib1* 敲除小鼠给与 CL316243 处理，评价 BAT 的脂质代谢和产热功能。脂肪和肝脏组织学结果显示 CL316243 处理提高了 *Trib1* 敲除小鼠血脂水平，并加速了脂肪在肝脏的蓄积，使小鼠表现出肝损伤。这些结果表明 CL316243 诱导了脂肪分解，但 *Trib1* 敲除使 BAT 脂质代谢功能降低，促使脂肪在肝脏异位堆积。同时我们通过动物代谢分析系统和适应性产热分析，发现 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 产热功能降低。通过透射电镜对 BAT 线粒体进行观察，结果显示 CL316243 处理的 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 线粒体肿胀，线粒体膜结构破坏。这些结果表明，*Trib1* 基因敲除导致的线粒体结构损伤，是损害 BAT 的脂质代谢和产热功能的原因。

讨论

瘦素和脂联素都是由脂肪细胞分泌的脂肪因子，在调节能量平衡中起关键作用。瘦素主要由白色脂肪细胞合成和分泌，可作用于下丘脑，具有调节食物摄取和能量消耗，改善胰岛素敏感性，促进脂肪分解，抑制脂肪形成等作用^[7]。脂联素是一种受胰岛素调节的肽类脂肪因子，可作用于肝脏和骨骼肌受体，促进葡萄糖吸收和抑制肝糖的输出，刺激脂肪的氧化利用，从而改善糖脂代谢和胰岛素敏感性^[8]。在临

床观察中发现,随着 BMI 升高肥胖患者体内瘦素和胰岛素水平上升,而脂联素水平下降,表现出瘦素和胰岛素抵抗^[11]。高胰岛素和低脂联素血症,被认为是代谢综合征的生化标志。而本研究发现随着 *Trib1* 敲除,8 周龄小鼠虽然体重与野生型相比无显著差异,但表现出糖脂代谢紊乱的症状,包括血脂水平上升,脂联素水平下降,血清瘦素和胰岛素水平显著升高。这都提示我们 *Trib1* 对脂质代谢的调节作用。

在 20 世纪 60 年代, BAT 首次被描述为一种内分泌器官和产热器官,主要参与机体非颤抖性产热^[12]。长期以来,人们认为 BAT 只存在于新生儿心脏、胸、肩胛间区、脊柱周围、腋部及颈部等处。直到 2009 年,随着正电子发射断层扫描-计算机断层扫描 (PET-CT) 的应用,才增加了人们对成人棕色脂肪的了解^[13-15]。BAT 在成人受试者中展示活性和功能性以来,激活棕色脂肪以消耗机体多余的能量已成为对抗代谢性疾病的新策略。因此我们通过 β_3 肾上腺素受体激动剂处理 *Trib1* 敲除小鼠诱导 BAT 功能激活,验证 *Trib1* 对 BAT 功能的调节作用。

常见的肩胛部位的棕色脂肪细胞和骨骼肌细胞来源于 $Myf5^+$ 、 $Pax7^+$ 前体细胞,与腹股沟和附睾部位的白色脂肪细胞不具有相同的发育起源^[16-18]。BAT 大量的线粒体、产热的 UCP1 蛋白和提供能量来源的多房脂滴。其中高水平的 UCP1 具有跨线粒体膜破坏质子电化学梯度的能力,从而使解除氧化磷酸化解偶联产生热量^[19]。因此 UCP1 依赖性产热仍是评价 BAT 功能的重要方式。PRDM16 是调控 BAT 形成的关键蛋白。PRDM16 与多种转录因子和辅助因子相互作用,包括 C/EBP- β 、C 末端结合蛋白 (C-terminal binding proteins, Ctbp)、PPAR γ 和 PGC-1 α 。其中 PRDM16/Ctbp 可以激活棕色脂肪特异性基因的表达,而 PRDM16/PGC-1 α 可以抑制白色脂肪特异性基因的表达,从而诱导 $Myf5^+$ 、 $Pax7^+$ 前体细胞向棕色脂肪细胞分化^[18]。在我们的实验中 CL316243 处理显著提高了野生型小鼠 UCP1 和 PRDM16 的表达,且明显高于 *Trib1* 敲除小鼠。在动物代谢分析系统和适应性产热分析实验中, *Trib1* 敲除小鼠呼吸代谢水平和体温维持能力都低于野生型,说明 *Trib1* 敲除使小鼠 BAT 产热功能降低。

值得注意的是,本研究在实验中观察了 CL316243 处理反而加速了脂质在 *Trib1* 敲除小鼠肝脏的堆积。在以往的研究中, CL316243 是经典的 β_3 肾上腺素能受体激动剂 (β_3 -adrenergic receptor, β_3AR), 具有高效的脂肪分解和产热作用。在 β_3AR 激活后,一方面会通过蛋白激酶 A (Protein kinase, PKA) 诱导激素敏感性甘油三酯脂肪酶促进脂肪的分解。另一方面募集 Pgc1 α 以促进 RXR 异二聚化,然后与 PPAR 等核受体相互作用,以增强 BAT 线粒体中 UCP1 基因转录,消耗游离的脂肪酸产生热量^[20]。且 β -肾上腺素能信号可以通过 Ppar γ 诱导白色脂肪棕色化^[21], 转化为米色脂肪细胞利用游离脂肪酸产热 (Figure 2-17)。由此可见 CL316243 诱导脂肪分解产生的游离脂肪酸是 BAT 和米色脂肪细胞产热的能源物质。但在我们的实验中,观察

到 CL316243 处理造成了脂肪在 *Trib1* 敲除小鼠肝脏的蓄积，这提示我们升高的游离脂肪酸没有被 BAT 消耗利用，因此刺激了肝脏中的脂肪酸合成蓄积，表明 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 对脂肪的代谢利用出现障碍。

线粒体是机体能量代谢的中心。葡萄糖在细胞质进行无氧呼吸，产生的丙酮酸通过进入线粒体三羧酸循环完全氧化供能。脂肪酸进入线粒体通过 β -氧化分解，产生乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环供能。因此线粒体对机体糖脂代谢是至关重要的。本研究通过透射电镜对 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 进行观察，发现不同于野生型小鼠完整且椭圆的线粒体结构，敲除小鼠 BAT 线粒体肿胀，线粒体膜结构破坏，表明线粒体进行糖脂代谢的功能障碍^[22]。这些结果也能说明 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 脂肪代谢功能障碍，维持产热的功能降低。

正常的 BAT 通过参与葡萄糖代谢和脂质代谢在身体能量消耗中发挥着至关重要的作用。本研究通过 CL316243 处理小鼠，验证了 *Trib1* 敲除使小鼠 BAT 脂质代谢和产热功能障碍，但其中的机制仍待进一步研究。

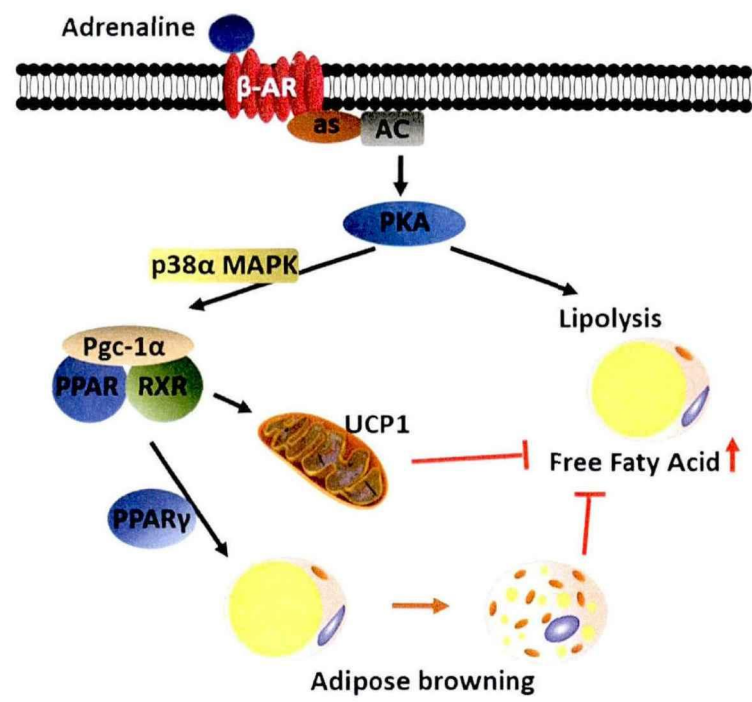


Figure 2-17 Schematic diagram of β_3 -AR on brown and beige adipose.

结论

利用 *Trib1* 敲除小鼠对其表型进行测定，结果显示 *Trib1* 敲除小鼠血脂水平上升，BAT 细胞脂滴增大和 UCP1 表达降低，并伴随着瘦素和胰岛素抵抗，提示我们 *Trib1* 对 BAT 功能具有调节作用。进一步利用 CL316243 处理 *Trib1* 敲除小鼠，结果

显示 *Trib1* 敲除损害 BAT 的脂质代谢和产热功能,这是由于 *Trib1* 敲除使小鼠 BAT 线粒体肿胀,线粒体膜结构破坏导致的。

参考文献

- [1] MONTANARI T, POSCIC N, COLITTI M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review [J]. *Obes Rev*, 2017, 18(5): 495-513.
- [2] WANG Q A, TAO C, GUPTA R K, et al. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration [J]. *Nat Med*, 2013, 19(10): 1338-44.
- [3] CARPER D, COUE M, NASCIMENTO E B M, et al. Atrial Natriuretic Peptide Orchestrates a Coordinated Physiological Response to Fuel Non-shivering Thermogenesis [J]. *Cell Rep*, 2020, 32(8): 108075.
- [4] M U D, SAARI T, RAIKO J, et al. Postprandial Oxidative Metabolism of Human Brown Fat Indicates Thermogenesis [J]. *Cell Metab*, 2018, 28(2): 207-16 e3.
- [5] SCHEELE C, WOLFRUM C. Brown Adipose Crosstalk in Tissue Plasticity and Human Metabolism [J]. *Endocr Rev*, 2020, 41(1).
- [6] OSTERTAG A, JONES A, ROSE A J, et al. Control of adipose tissue inflammation through TRB1 [J]. *Diabetes*, 2010, 59(8): 1991-2000.
- [7] KLOK M D, JAKOBSDOTTIR S, DRENT M L. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review [J]. *Obes Rev*, 2007, 8(1): 21-34.
- [8] LIN Z, TIAN H, LAM K S, et al. Adiponectin mediates the metabolic effects of FGF21 on glucose homeostasis and insulin sensitivity in mice [J]. *Cell Metab*, 2013, 17(5): 779-89.
- [9] PRINCE M R U, ZIHAD S, GHOSH P, et al. *Amaranthus spinosus* Attenuated Obesity-Induced Metabolic Disorders in High-Carbohydrate-High-Fat Diet-Fed Obese Rats [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 653918.
- [10] SON Y, CHO Y K, SAHA A, et al. Adipocyte-specific Beclin1 deletion impairs lipolysis and mitochondrial integrity in adipose tissue [J]. *Mol Metab*, 2020, 39: 101005.
- [11] ODA N, IMAMURA S, FUJITA T, et al. The ratio of leptin to adiponectin can be used as an index of insulin resistance [J]. *Metabolism*, 2008, 57(2): 268-73.
- [12] TRAYHURN P, ARCH J R. New Physiological Aspects of Brown Adipose Tissue [J]. *Curr Obes Rep*, 2014, 3(4): 414-21.
- [13] VIRTANEN K A, LIDELL M E, ORAVA J, et al. Functional brown adipose tissue in

- healthy adults [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(15): 1518-25.
- [14] CYPRESS A M, LEHMAN S, WILLIAMS G, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(15): 1509-17.
- [15] VAN MARKEN LICHTENBELT W D, VANHOMMERIG J W, SMULDERS N M, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(15): 1500-8.
- [16] LEPPER C, FAN C M. Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells [J]. *Genesis*, 2010, 48(7): 424-36.
- [17] AN Y, WANG G, DIAO Y, et al. A Molecular Switch Regulating Cell Fate Choice between Muscle Progenitor Cells and Brown Adipocytes [J]. *Dev Cell*, 2017, 41(4): 382-91 e5.
- [18] PEIRCE V, CAROBBIO S, VIDAL-PUIG A. The different shades of fat [J]. *Nature*, 2014, 510(7503): 76-83.
- [19] DOUETTE P, GERKENS P, NAVET R, et al. Uncoupling protein 1 affects the yeast mitoproteome and oxygen free radical production [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40(2): 303-15.
- [20] LIU J, WANG Y, LIN L. Small molecules for fat combustion: targeting obesity [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(2): 220-36.
- [21] VAN NGUYEN T T, VU V V, PHAM P V. Transcriptional Factors of Thermogenic Adipocyte Development and Generation of Brown and Beige Adipocytes From Stem Cells [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2020, 16(5): 876-92.
- [22] WU H, WANG Y, LI W, et al. Deficiency of mitophagy receptor FUNDC1 impairs mitochondrial quality and aggravates dietary-induced obesity and metabolic syndrome [J]. *Autophagy*, 2019, 15(11): 1882-98.

第三章 Trib1 调控小鼠棕色脂肪组织能量代谢的分子机制研究

上一章研究发现 Trib1 敲除小鼠棕色脂肪中线粒体肿胀、膜结构破坏，而线粒体是机体的能量中心，包括丙酮酸氧化、脂肪酸 β -氧化、三羧酸循环（Tricarboxylic acid cycle, TCA）和 OXPHOS，都发生在线粒体中^[1]，因此 Trib1 敲除小鼠表现出产热和代谢功能降低。线粒体参与多种关键代谢功能，研究表明线粒体功能的异常也表现在糖尿病，肥胖和胰岛素抵抗的脂肪组织中^[2]。

本研究发现 8 周龄 Trib1 敲除小鼠表现出高血脂、胰岛素抵抗和瘦素抵抗等肥胖小鼠的代谢表征，而 β_3 肾上腺素受体激动剂处理后，反而加剧了脂质在小鼠肝脏的堆积。这是 Trib1 敲除使小鼠 BAT 线粒体肿胀，线粒体膜结构破坏导致的。为进一步阐明 Trib1 敲除使小鼠线粒体结构损伤的原因，我们利用 RNA 测序和 TRIB1-GST 蛋白对 Trib1 作用靶点进行探究。

第一节 利用 RNA-Sequencing 探讨 Trib1 调控的关键分子

前面的研究发现 Trib1 敲除使 BAT 中线粒体结构损伤，进而导致其产热代谢功能降低。但 Trib1 敲除破坏线粒体结构的靶点和机制仍不清楚，因此我们通过 RNA 测序和 TRIB1-GST 蛋白对 Trib1 作用靶点进行探究。

1 实验材料

1.1 实验动物

CRISPR/Cas9 介导的 Trib1 基因敲除小鼠由赛业生物科技有限公司生产，合格证号：32004300000904。所有动物实验程序均由中国医学科学院北京协和医学院动物伦理委员会批准（SLXD-20180706）。

1.2 实验试剂

与前期实验材料重复部分不再列举。

名称	厂家	货号
Trib1 原核表达质粒	云舟生物科技股份有限公司	VB180515

TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit	宝日医生物技术有限公司	9762
GeneArt™无缝克隆和组装试剂盒	Thermo Scientific 公司	A13288
胰蛋白胨	Oxoid 公司	LP0042
酵母提取物	Oxoid 公司	LP0021
葡萄糖	Sigma 公司	D9434
氯化钠	国药集团化学试剂有限公司	10019308
磷酸二氢钾	国药集团化学试剂有限公司	10017690
氯化铵	国药集团化学试剂有限公司	10001590
磷酸二氢钠	国药集团化学试剂有限公司	20040818
α-乳糖	国药集团化学试剂有限公司	63008060
硫酸镁	国药集团化学试剂有限公司	20025118
抗 UQCRC2 抗体	Abcam 公司	ab203832

1.3 实验仪器

与前期实验仪器重复部分不再列举。

名称	厂家	型号
磁力搅拌器	上海禾汽仪器有限公司	SZ-130002
恒温摇床	上海智城分析仪器有限公司	ZWYR-200D
恒温恒湿箱	北京赛欧华创科技有限公司	HWS-65L150B
pH 计	上海雷磁创益仪器有限公司	PHS-25
制冰机	Sanyo 公司	SIM-F124

2 实验方法

2.1 Trib1 敲除小鼠棕色脂肪组织分离取材及样本制备

同第一章第二节实验方法 2.1。

2.2 Trib1 敲除小鼠棕色脂肪 RNA 提取及 RNA-Sequencing 检测

2.2.1 提取棕色脂肪总 RNA

同第一章第二节实验方法 2.1.2。

2.2.2 RNA-Sequencing 检测

从 8 周龄野生型和 *Trib1* 敲除小鼠的 BAT 中提取的总 RNA 由干冰保存送样，测序由北京诺禾致源科技股份有限公司进行。样品检测合格后，构建通用的转录组文库，使用 Illumina HiSeq 平台进行双端测序。最后进行差异表达分析、主成分分析、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 分析和蛋白质相互作用网络分析。

2.3 *Trib1* 原核表达质粒构建和 TRIB1-GST 蛋白表达

2.3.1 目的基因片段的获得

从 GenBank 中查询目的基因以及上下游的序列，用 VectorNTI 软件进行引物设计。

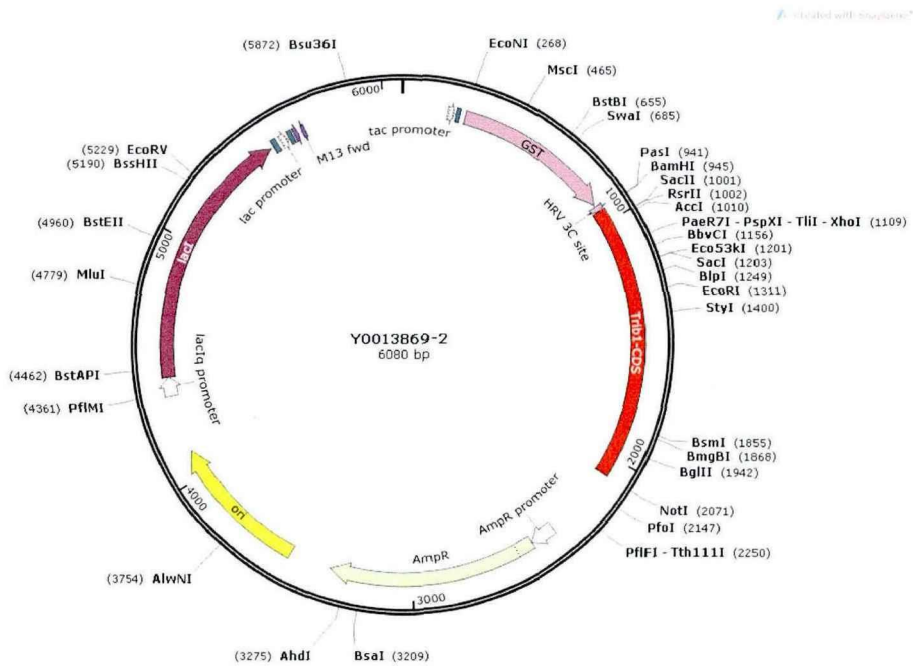


Figure 3-1 *Trib1*-CDS Plasmid Map

使用高保真的 PrimeSTAR 酶扩增目的基因，反应体系和条件如下：

Component	Volume (μL)
5×PrimeSTAR Buffer	10
dNTP Mixture	4
Primer 1	1
Primer 2	1
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5
模板 DNA	20

RNase-free H ₂ O	13.5
Total	50

50 μ L 反应体系中模板和水量可调整，总计 50 μ L 即可。推荐 DNA 使用量为：人基因组 DNA 5 ng-200 ng，大肠杆菌基因组 100 pg-100 ng，质粒 DNA 10 pg-1 ng。将反应体系溶液混匀，置于 PCR 仪中，设定反应程序，反应程序如下：

Program	Step	Cycle
3 Step	98°C for 10 s	30
	55°C for 15 s	
	97°C for 1 min/kb	

PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果，并把目的基因条带从琼脂糖凝胶电泳后的胶中切胶回收。

2.3.2 线性化表达载体的制备

用限制性内切酶对表达载体进行酶切，酶切反应体系为：质粒 2 μ g，10 $\times$ 反应 Buffer 5 μ L，限制性内切酶各 1 μ L，用水补足 50 μ L，于 37°C 水浴锅中孵育 2h 以上。酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果，并把目的载体条带从琼脂糖凝胶电泳后的胶中割下来，用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit 做胶回收。

2.3.3 目的基因构建入线性化表达载体

将目的基因片段和线性化载体以摩尔比 3:1 加到离心管中进行连接反应，反应体系如下：

Component	Volume (μ L)
<i>Trib1</i> 的 cDNA 片段	1
线性化载体	2
5 $\times$ T4 DNA 连接缓冲液	0.5
T4 DNA 连接酶	0.5
无缝克隆酶	5

混匀后在 16°C 连接过夜，取 10 μ L 反应液体转化到感受态细胞中。

2.3.4 感受态细胞的转化

取 1 μ L 生成的质粒加入 50 μ L 的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中，轻轻混匀，冰浴 30 min。42°C 金属浴上热激 90 s，不要晃动离心管，立即插入冰中，冰浴 2 min。

加入 0.5 mL LB 液体培养基，轻轻混匀，37℃，200 rpm，活化细菌 1 h。置于离心机，2000 rpm 离心 2 min，弃部分上清。移液枪吹打均匀，取 20 μ L 悬浮菌液，涂布于平板培养基上。待菌液干燥后，倒置放于 37℃培养箱中培养 8 h 以上。

2.3.5 菌落 PCR 鉴定阳性转化子

从培养箱中取出平板，挑取转化子重悬于 10 μ L 培养液中，取 1 μ L 作为模板进行菌落 PCR 鉴定。剩余液体转移至 5 mL LB 液体培养基的试管中。37℃，180 rpm 过夜培养 12 h。

2.3.6 TRIB1-GST 蛋白表达

试管过夜培养出现浑浊后，取 1 mL 菌液加入 1 L 的自动诱导培养基中。加入抗生素，培养基浓度为 100 μ g/mL。将培养瓶置于摇床，37℃，180 rpm 培养 24 h。取出培养基分装于离心管内，4℃，13000 rpm 离心 25 min，弃上清。沉淀加入 15 mL 的 PBS 吹匀，转移到新的离心管内。放入盛有冰水混合物的超声仪中，超声 20 min 破碎菌体。4℃，13000 rpm 离心 25 min，收集上清。

2.4 *Trib1* 敲除小鼠棕色脂肪 Pull Down 实验检测靶蛋白

2.4.1 Pull Down 实验

用 PBS 平衡 GST 层析柱，2 mL / 5 次。将收集的 TRIB1-GST 蛋白上清液以 40 - 50 滴/分钟的速度流过 GST 层析柱。用 PBS 洗涤层析柱，10 mL / 5 次。取出 GST 凝珠，加入 C57BL/6J 小鼠的 BAT/肝脏蛋白提取液中（组织蛋白现用现提，提取完毕 4℃短暂保存），并在低温下孵育过夜。孵育后低速离心弃上清，用 PBS 清洗凝胶五到六次。小心吸弃凝胶上层透明液体后，加入适量的 loading buffer 缓冲液，100℃金属浴加热 5 min，样品-20℃保存。

2.4.2 考马斯亮蓝染色检测差异条带

将上述 Pull Down 实验富集纯化的蛋白经过凝胶电泳分离，进行 Western blot 电泳的条件同第一章第三节 2.3。电泳结束后取出凝胶，倒入考马斯亮蓝溶液，染色 30 min。沸水脱色后可用扫描仪拍摄。

2.4.3 高分辨质谱（LC-MS/MS）鉴定差异蛋白

切取考马斯亮蓝染色指示的差异条带，放入标记好的 1.5 mL 离心管中，使用超纯水冲洗三次保存。使用 25 mmol/L NH_4HCO_3 和 50%乙腈配置脱色液，更换脱色液

两次室温脱色。使用 50 mmol/L TCEP 和 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液裂解二硫键, 56°C 孵育 1 h。使用 100 mmol/L IAA, 25 mmol/L NH_4HCO_3 溶液, 避光处理 0.5 h, 使巯基烷基化。1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的胰蛋白酶用 25 mmol/L NH_4HCO_3 稀释至 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 37°C 水浴消化过夜。将混合物转移至一个新离心管中, 使用 5%TFA, 50%乙腈溶液提取两次, 将得到的提取物冻干, 在检测之前重悬, 使用高分辨质谱 (LC-MS/MS) 鉴定蛋白, 质谱分析采用 Proteome Discoverer 1.4 软件处理。

2.4.4 Western Blot 验证蛋白结合

为确认高分辨质谱鉴定差异蛋白, 分别收集将 Pull Down 实验富集纯化的蛋白、与 GST 蛋白交联的琼脂糖珠对照组, 采用 Western Blot 特异检测候选靶标蛋白。电泳和抗体孵育步骤同第一章第三节 2.3。

2.5 统计学分析

使用核酸序列的 GC 含量(GC content), Q20 和 Q30 评估测序数据质量。采用皮尔逊相关系数的平方 (R^2) 评价样品之间重复性和相关性, 在数据质量合格后进行差异表达基因的筛选。

3 实验结果

3.1 *Trib1* 敲除小鼠棕色脂肪组织表达谱及 KEGG 分析

在前面的研究我们发现 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 线粒体肿胀, 线粒体膜结构破坏。为了阐明 *Trib1* 敲除使小鼠线粒体结构损伤的原因, 本研究对野生型和 *Trib1* 敲除小鼠的 BAT 进行测序, 以探索 *Trib1* 基因敲除对线粒体功能的影响。在野生型和 *Trib1* 基因敲除小鼠中, 总共有 11042 和 11002 个基因的表达水平变化分别大于两倍 (Figure 3-2A)。火山图显示 660 个基因上调, 405 个基因下调。除了与线粒体复合物、线粒体内膜和线粒体膜蛋白复合物相关的成分基因下调外 (Figure 3-2C), 还发现了产热信号通路有关 19 个下调基因, 包括 *Atp5e*、*Prkag2* 和 *Cox8a* 等。此外, 与氧化磷酸化、脂肪酸代谢和胰岛素敏感性相关的基因也被下调 (Figure 3-2D-G)。这些结果表明, *Trib1* 基因敲除引起的线粒体结构损伤导致线粒体功能障碍, 导致产热受损和脂质代谢改变。

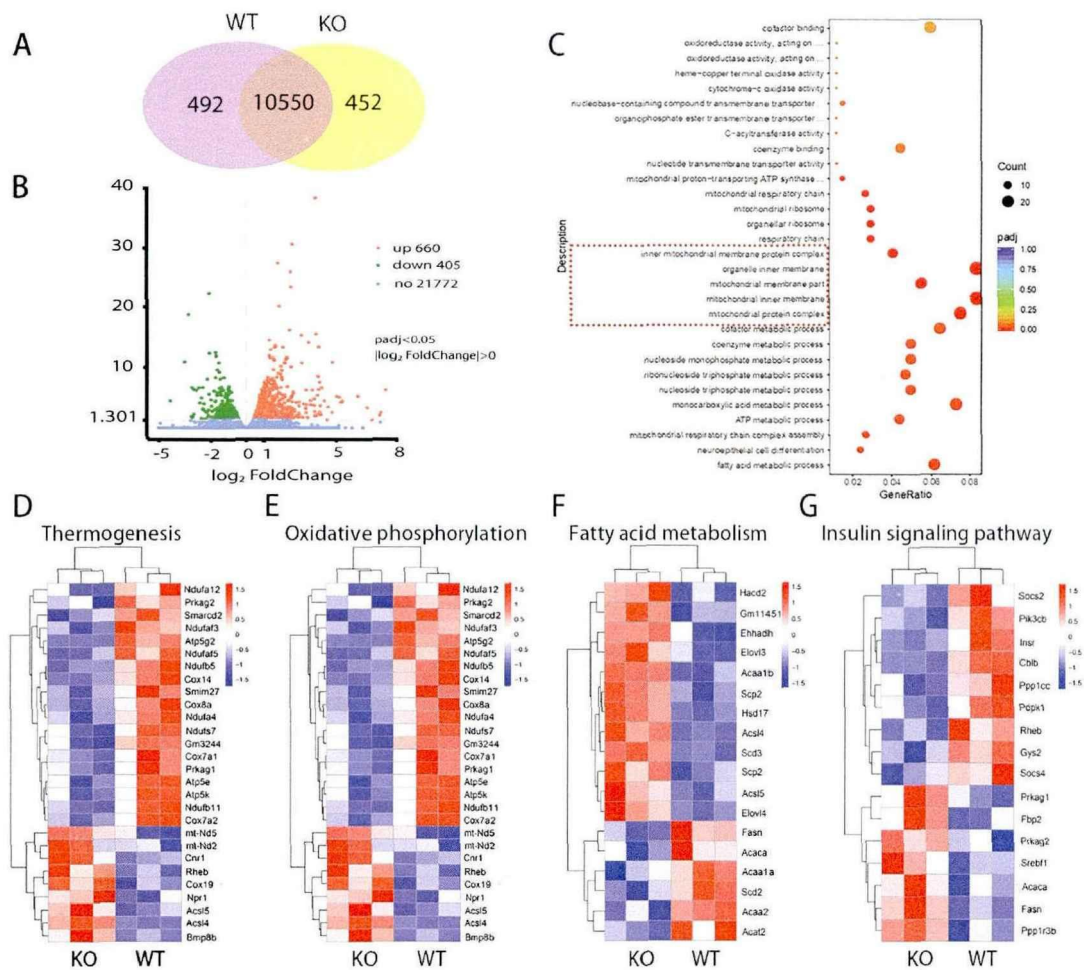


Figure 3-2 Differential genes and KEGG analysis of brown adipose tissue in *Trib1* knockout mice. (A) The venn diagram of RNA-seq indicated the number of differentially expressed genes between *Trib1*-knockout and wildtype mice, respectively. n = 3. (B) The volcano plot of RNA-seq showing up and downregulated genes between *Trib1*-knockout and wildtype mice. (C) Gene Ontology analysis of down regulated genes in brown adipose tissue of *Trib1* knockout mice. Heat map of thermogenesis (D), oxidative phosphorylation (E), fatty acid metabolism (F) and insulin signaling pathway (G) gene clusters in *Trib1*-knockout and wildtype mice. Red and blue represent upregulation and downregulation expression, respectively.

3.2 *Trib1* 调节棕色脂肪组织的关键分子

本研究利用 TRIB1-GST 融合蛋白探究 TRIB1 作用靶点。GST, 全称 glutathione-S-transferase, 即谷胱甘肽-S-转移酶蛋白, 能够和谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 稳定结合。我们把 GSH 与琼脂糖交联形成 GSH 琼脂糖珠, 能够将带有 GST 标签的 TRIB1-GST 融合蛋白固定, 当体系中存在与 TRIB1 蛋白有直接相互作用的靶标蛋

白时，它就能够与微珠固相复合物结合而被固定在层析柱上（Figure 3-3A）。对特异性条带蛋白通过 LC-MS/MS 质谱鉴定，剔除掉得分为 0 的蛋白和骨架蛋白，选取与对照组 10 倍差异以上的蛋白进行 Western Blot 验证，结果显示 TRIB1 可以与线粒体呼吸链复合物亚单位 UQCRC2 结合（Figure 3-3B）。

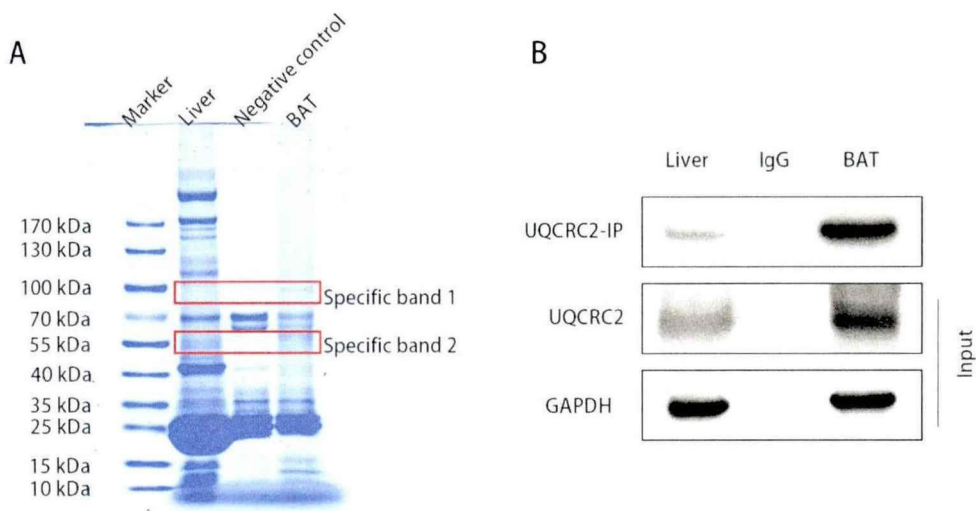


Figure 3-3 *Trib1* regulates key molecules in brown adipose tissue. (A) The final elution samples were analyzed by Western blot and stained with Coomassie brilliant blue. The specific bands were used for mass spectrometry analysis. (B) The final elution samples were analyzed by Western blot and incubated with *uqcrc2* primary antibody.

4 小结

本节利用野生型和 *Trib1* 敲除小鼠的 BAT 进行测序，结果显示与线粒体结构相关的成分基因下调，产热、氧化磷酸化、脂肪酸代谢和胰岛素敏感性相关的通路基因也表现出下调。进一步的研究通过 Pull Down 实验和 LC-MS/MS 鉴定 TRIB1 结合蛋白，并通过 Western Blot 对靶标蛋白进行验证。结果显示 TRIB1 可以与线粒体呼吸链复合物III亚单位 UQCRC2 结合。这提示我们 *Trib1* 基因敲除引起的线粒体功能障碍与线粒体呼吸链有关。

第二节 Trib1 敲除对棕色脂肪线粒体呼吸链的影响

上一节研究证明 TRIB1 可以与线粒体呼吸链复合物III亚单位 UQCRC2 结合，但 TRIB1 和 UQCRC2 对线粒体结构和功能的调节机制仍不明确。

线粒体质量和功能的维持与线粒体动力学（包括线粒体融合、分裂和自噬）密切相关^[3]。线粒体动力学受线粒体融合和分裂的蛋白调控。线粒体分裂过程涉及的主要蛋白是动态相关蛋白 1（dynamin related protein 1, DRP1）和分裂蛋白 1（fission 1, FIS1）。线粒体融合过程涉及的主要蛋白是线粒体融合蛋白 1 和 2（mitofusin 1 and 2, MFN1, MFN2）和视神经萎缩 1（optic atrophy 1, OPA1）。其中 MFN1 和 MFN2 蛋白控制线粒体外膜融合，而调节 OPA1 线粒体内膜融合^[3, 4]。

除了经典的 PINK1–Parkin 途径 2 和 GTPases 调控融合分裂蛋白影响线粒体动力学外^[5, 6]，最新研究发现氧化磷酸化（Oxidative phosphorylation, OXPHOS）与线粒体动力学关系密切。线粒体融合蛋白 OPA1 和 MFN2 的敲除可以降低细胞氧化磷酸化水平^[7, 8]，进一步研究发现线粒体融合蛋白的敲除可以减少呼吸链复合物 I，III 和 IV 的活性^[8, 9]。相同的，氧化磷酸化也可以影响线粒体动力学，有研究发现 OXPHOS 可以特异性的诱导线粒体外膜融合，而不影响内膜的融合^[10]。OXPHOS 可以通过影响 OPA1 的蛋白水解，调整 OPA1 促融合形式（长，约 100 kDa）和非促融形式（短，约 85 kDa）比例^[11]。同样的，体外添加呼吸链复合物 II，III，IV 或 ATP 合酶（复合物 V）的抑制剂会有效地阻断线粒体内膜融合^[10]。氧化磷酸化水平和线粒体动力学可以相互作用调控线粒体功能，响应于机体不同的生理状态。

在前面我们确认 TRIB1 可以与线粒体呼吸链复合物III亚单位 UQCRC2 结合，因此后续研究对线粒体呼吸链复合物表达水平，酶活性和组织 ATP 水平进行测定，探究 TRIB1 和 UQCRC2 影响线粒体结构和功能的机制。

1 实验材料

1.1 实验动物

CRISPR/Cas9 介导的 Trib1 基因敲除小鼠由赛业生物科技有限公司生产，合格证号：32004300000904。所有动物实验程序均由中国医学科学院北京协和医学院动物伦理委员会批准（SLXD-20180706）。

1.2 实验试剂

与前期实验材料重复部分不再列举。

名称	厂家	货号
----	----	----

线粒体呼吸链复合体 I 活性测定试剂盒	索莱宝科技有限公司	BC0515
线粒体呼吸链复合体 III 活性测定试剂盒	索莱宝科技有限公司	BC3245
线粒体呼吸链复合体 IV 活性检测试剂盒	索莱宝科技有限公司	BC0945
增强型 ATP 检测试剂盒	碧云天生物技术有限公司	S0027
抗 OXPHOS 抗体	Abcam 公司	ab110413
抗 OPA1 抗体	Abcam 公司	27733-1-AP
抗 mtTFA 抗体	Abcam 公司	ab47517
抗 MFN2 抗体	武汉三鹰生物技术有限公司	12186-1-AP
抗 DRP1 抗体	武汉三鹰生物技术有限公司	12957-1-AP

1.3 实验仪器

与前期实验仪器重复部分不再列举。

2 实验方法

2.1 Trib1 敲除小鼠棕色脂肪组织分离取材及样本制备

同第一章第二节实验方法 2.1。

2.2 Western blot 检测线粒体呼吸链和动力学蛋白的表达

同第一章第三节实验方法 2.3。

2.3 RT-PCR 检测线粒体呼吸链、动力学和脂质代谢基因的表达

同第一章第二节实验方法 2.3。引物序列如下：

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (3'-5')
Trib1	AGAACCCAGCTTAGACTGGA	AAAAGCGTATAGAGCATCA
	A	CCC
Ndufa9	ACTGTGTTTGGGGCTACAGG	GATTGATGACCACGTTGCTG
SDHA	ACACAGACCTGGTGGAGAC	GCACAGTCAGCCTCATTCAA
	C	
Uqcrc2	ATCAAAAGGGGCAACAACA	CACTCAGGAAGCCCTCTGA

	C	C
COX1	ATTCGAGCAGAATTAGGTCA	CTCCGTTATTAGTGGGACA
APT5a	AGGCCTATCCTGGTGATGTG	CTTCATGGTACCTGCCACCT
OPA1	CGACTTTGCCGAGGATAGCT	CGTTGTGAACACACTGCTCT
	T	TG
MFN1	ATGGCAGAAACGGTATCTCC	CTCGGATGCTATTTCGATCAA
	A	GTT
DNM1L	CAGGAATTGTTACGGTTCCC	CCTGAATTAACCTTGTCCTG
	TAA	GA
FIS1	TGTCCAAGAGCACGCAATT	CCTCGCACATACTTTAGAGC
	G	CTT
mtDNA	CGAAAGGACAAGAGAAATA	GAACAAGGTTTTAAGTCTTA
	GAG	CGCA
TFAM	ATTCCGAAGTGTTTTTCCAG	TCTGAAAGTTTTGCATCTGG
	CA	GT
CPT1α	GCTGGATGGCTTTGGT	GCTTGGCGGATGTGGTTC
LCAD	GGCACAAAAGAACAGATCG	TGGCTATGGCACCGATACA
	AGAA	C
MCAD	GCAGAGAAGAAGGGTGACG	TCCCCCGTTGGTTATCCA
	AGTAT	

2.4 线粒体复合物酶活性检测

按试剂盒说明进行测定。称取适量组织，加入试剂盒提供的提取液，用匀浆器或研钵于冰上匀浆。4℃，600g 离心 10 min。将上清液移至另一离心管中，4℃，11000g 离心 15 min。在沉淀中加入提取液，超声波破碎，用于线粒体复合物酶活性检测，并且用于蛋白含量测定。

2.5 棕色脂肪组织 ATP 水平检测

按试剂盒说明进行测定。称取适量组织，加入试剂盒提供的裂解液，匀浆裂解细胞。4℃，12000 g 离心 5 min，吸取上清。配制 ATP 标准曲线溶液浓度。配制 ATP 检测工作液，每孔 100 μL 加入黑色 96 孔板中，静置 5 min。每孔加入 20 μL 样品或标准品，用酶标仪测定。

2.6 统计学分析

使用软件 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析，实验数据均采用 mean±SD 表示。数据进行方差齐性检验，在两组间，采用双尾 T 检验（Two-tailed Student’s t-test）；多组间采用单因素方差分析（One-Way ANOVA），在组间差异有统计学意义后采用 Turkey 进行两两比较，当 $P<0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 Trib1 敲除对小鼠棕色脂肪线粒体呼吸链蛋白和基因的影响

UQCRC2 是线粒体呼吸链复合物 III 的亚基。在前面的研究中我们发现 TRIB1 与 UQCRC2 结合，这提示我们探究 TRIB1 对线粒体呼吸链的影响。Western blot 和 RT-qPCR 结果显示，*Trib1* 敲除小鼠的 BAT 中线粒体呼吸链复合物 I、III 和 V 的蛋白质（Figure 3-4A B）和基因（Figure 3-4C）表达水平低于野生型小鼠。

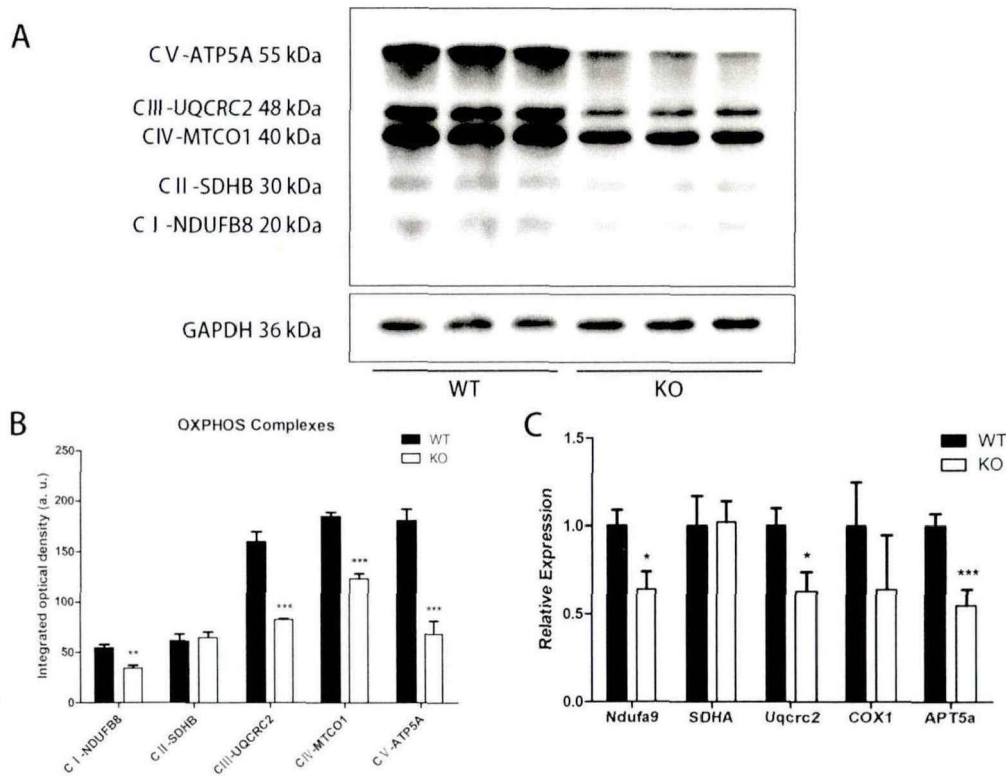


Figure 3-4 Effects of *Trib1* knockout on mitochondrial respiratory chain proteins and genes in mouse brown fat. (A, B) Western blots of mitochondrial electron transport chain complexes (complexes I–V) in brown adipose of *Trib1*-knockout and wildtype mice, and the results of optical density analyses. (C) The mRNA level of brown adipose respiratory chain complex in *Trib1*-knockout and wildtype mice. n = 4. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

0.001 vs. *Trib1* WT mice.

3.2 *Trib1* 敲除对小鼠棕色脂肪 ATP 水平和呼吸链复合物III酶活性的影响

本研究利用线粒体复合物酶活性检测试剂盒和 ATP 检测试剂盒进一步验证 *Trib1* 敲除对呼吸链的影响。结果显示 *Trib1* 敲除小鼠的 BAT 呼吸链复合物 III 的活性低于野生型小鼠。经 CL316243 处理后, *Trib1* 敲除小鼠的复合物 III 活性略有增加, 但仍低于野生型 (Figure 3-5A)。除此之外, *Trib1* 敲除小鼠 BAT 的 ATP 水平明显低于野生型 (Figure 3-5B), 证明 *Trib1* 敲除影响了线粒体复合物的表达和蛋白酶活性。

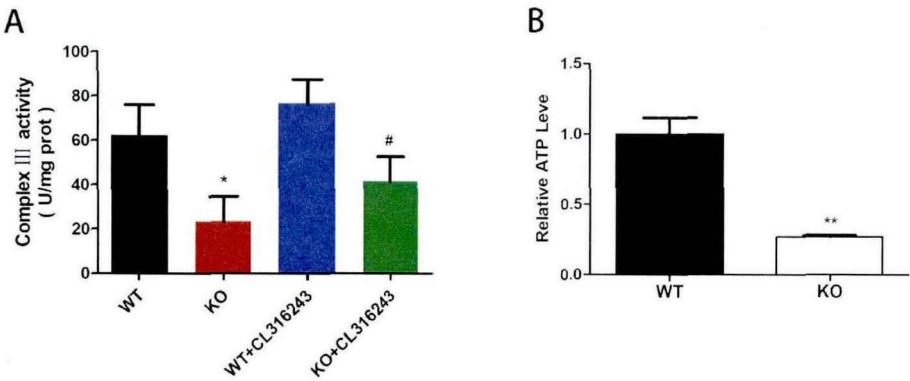


Figure 3-5 Effects of *Trib1* knockout on brown fat ATP levels and respiratory chain complex III enzymatic activity in mice. (A) Mitochondrial complex III activity of brown adipose in *Trib1* KO and WT mice treated with CL316243 or not. (B) ATP level of brown adipose in *Trib1*-knockout and wildtype mice. n=4. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. *Trib1* WT mice; # $P < 0.01$ vs. *Trib1* WT mice treated with CL316243.

3.3 *Trib1* 敲除对小鼠棕色脂肪线粒体动力学蛋白和基因的影响

线粒体融合依赖于线粒体呼吸活动, 抑制呼吸链复合物 II、III、IV 或 V 可有效防止内膜融合^[10]。因此本研究检测了参与线粒体内膜融合和分裂的关键蛋白 OPA1 的表达。结果显示 *Trib1* 敲除小鼠的 BAT 中, OPA1 的表达水平降低。此外, *Trib1* 敲除小鼠的 mtTFA、MFN2 和 DRP1 的表达水平低于野生型小鼠。这些发现表明, 线粒体呼吸链活性的降低影响线粒体动力学, 并导致线粒体结构损伤。

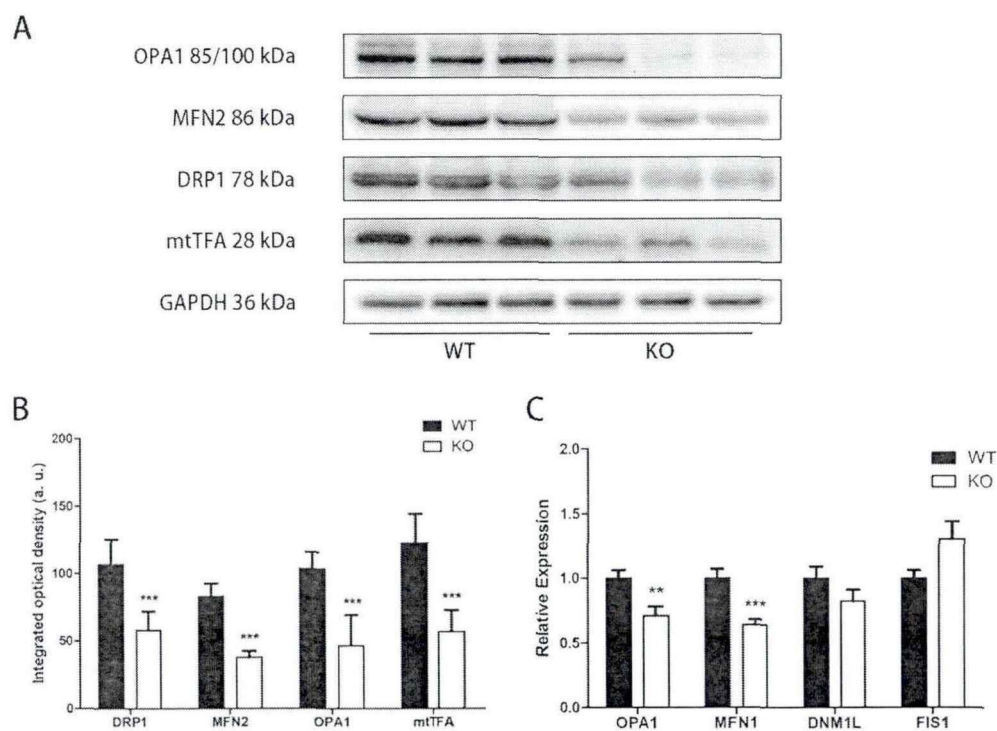


Figure 3-6 Effects of *Trib1* knockout on mitochondrial dynamics proteins and genes in mouse brown fat. (A, B) Expression of mitochondrial fusion and fission proteins in brown adipose tissue of *Trib1*-knockout and wildtype mice, and the results of optical density analyses. (C) Mitochondrial fusion and fission gene mRNA level in *Trib1*-knockout and wildtype mice. n=4. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. *Trib1* WT mice.

3.4 *Trib1* 敲除对小鼠棕色脂肪线粒体拷贝数和脂质代谢基因的影响

本研究进一步检测了脂肪酸 β -氧化相关基因的表达。RT-qPCR显示,在*Trib1*基因敲除小鼠中,长链乙酰辅酶A脱氢酶(Long-chain acyl-CoA dehydrogenases, LCAD)和中链乙酰辅酶A脱氢酶(Medium-chain acyl-CoA dehydrogenases, MCAD)的表达水平降低,表明线粒体脂肪酸 β -氧化受到抑制。这一结果与之前的观察结果一致,在之前的观察中,基因敲除小鼠表现出高脂血症和肝脏脂肪堆积。

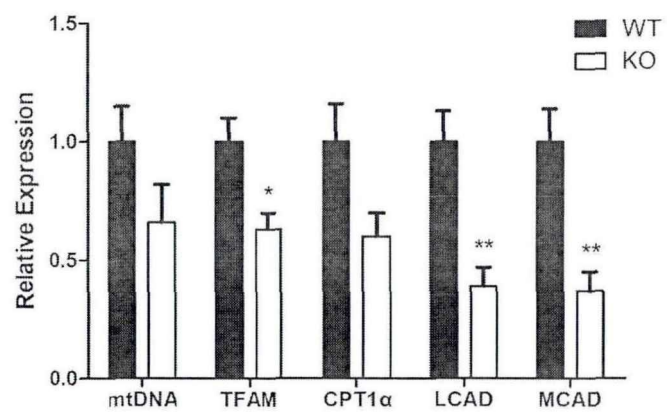


Figure 3-7 Effects of *Trib1* knockout on mitochondrial copy number and lipid metabolism genes in brown fat in mice. Mitochondrial copy number and fatty acid oxidation gene mRNA level of brown adipose in *Trib1*-knockout and wildtype mice. n=4. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. *Trib1* WT mice.

4 小结

本研究通过 RT-PCR 和 Western Blot 对呼吸链复合物表达水平进行测定。结果显示 *Trib1* 敲除小鼠 BAT 呼吸链复合物I，III和V的表达量降低。且线粒体复合物III的活性和 ATP 水平均低于野生型。进一步实验发现，呼吸链复合物的破坏低影响了线粒体动力学，结果显示 *Trib1* 敲除小鼠的 BAT 中 OPA1，DRP1 的蛋白和基因表达水平降低。此外脂肪酸 β -氧化相关基因的表达水平也明显低于野生型。这提示我们 *Trib1* 敲除通过影响电子呼吸链活性破坏了线粒体动力学稳态，进而导致其结构损伤和脂肪代谢功能障碍。

第三节 过表达 *Trib1* 对 3T3-L1 细胞呼吸代谢水平的影响

明确 *Trib1* 敲除调节线粒体功能的靶点和机制后，本节利用真核质粒在 3T3-L1 细胞上过表达 *Trib1*，对前面的靶点和机制进行验证和确认。

1 实验材料

1.1 实验细胞

3T3-L1 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所北京协和细胞资源中心（1101MOU-PUMC00155）。

1.2 实验试剂

与前期实验材料重复部分不再列举。

名称	厂家	货号
LIPOFECTAMINE 3000	Thermo Scientific 公司	L3000015
HiPure Plasmid MiniPrep Kit	全式金生物技术股份有限公司	EM111-01
Mitotracker	Cell Signaling Technology 公司	9082S
Hoechst 33342	Cell Signaling Technology 公司	4082S
线粒体压力试剂盒	Agilent 公司	103015-100

1.3 实验仪器

与前期实验仪器重复部分不再列举。

名称	厂家	型号
Seahorse 代谢仪	Agilent 公司	Seahorse XFe24

2 实验方法

2.1 *Trib1* 真核表达质粒构建和扩增

2.1.1 *Trib1* 真核表达质粒构建

同本章第一节实验方法 2.3。

从 GenBank 中查询目的基因以及上下游的序列，用 VectorNTI 软件进行引物设计。

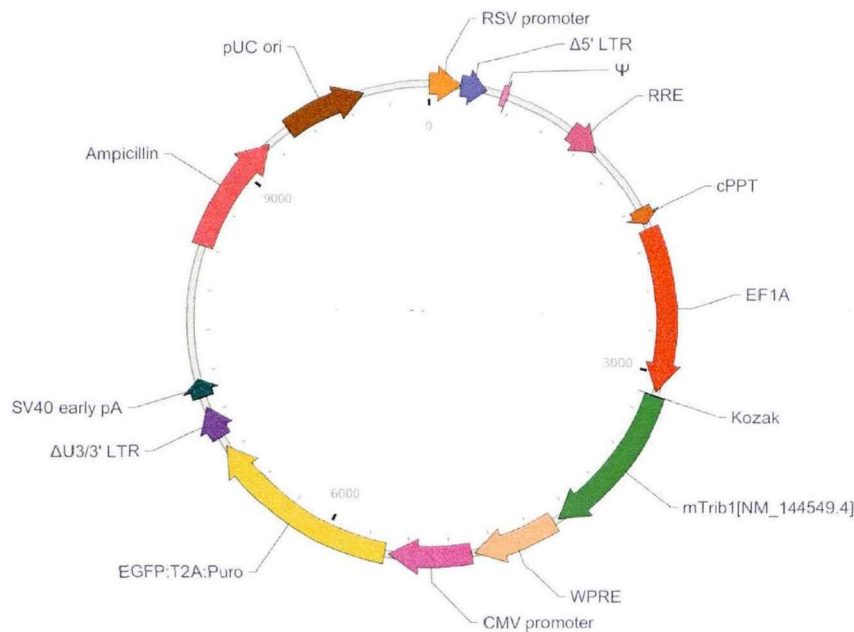


Figure 3-8 Plasmid Map

2.1.2 Trib1 真核表达质粒提取

按试剂盒说明进行提取。使用前将 RNase A 加入 RB 中，加 100 mL 无水乙醇到 WB 中。取过夜培养的菌液，12000 g 离心 2 min，弃上清。加入无色的 RB 溶液，振荡悬浮菌体，避免存在菌块。加入 LB，温和地翻转混合 4-6 次，使菌体充分裂解，形成蓝色透亮的溶液，全程不宜超过 5 min。加入 NB 溶液，温和的混匀 5-6 次，直至蛋白变性形成黄色凝集块，室温静置 2 min。12000 g 离心 15 min，取上清加入离心柱中，过柱完毕 8000 g 离心 2 min，弃流出液。加入 5 mL 的 TB 溶液，室温静置 10 min，8000 g 离心 2 min，弃流出液。加入 5 mL 的 WB 溶液两次，8000 g 离心 2 min，弃流出液。8000 g 离心 5 min，彻底去除 WB 溶液，室温静置 10 min，使乙醇挥发干净。将柱子置于干净的离心管内，加入适量的 EB 或者去离子水，室温静置 5 min（EB 和去离子水量不宜多，避免质粒浓度过低，使用前 70℃ 预热）。8000 g 离心 2 min，收集洗脱液-20℃ 保存。

2.2 过表达 Trib1 的脂肪细胞 RNA 提取及 RNA-Sequencing 检测

2.2.1 脂肪细胞过表达 Trib1

在 6 孔板中使用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养 3T3-L1 细胞，在 37℃，5 % CO₂ 的细胞培养箱中培养至融合率 100 %。更换新鲜含血清的 DMEM 高糖培养基培养，使细胞接触抑制。6 孔板每孔使用 6 μl Lipo3000 加入 0.2 mL 无血清

的 DMEM 高糖培养基，吹匀静置 5 min。6 孔板每孔使用 10 μL 的 *Trib1* 质粒溶液（浓度 250 ng/ μL ）加入 0.2 mL 无血清的 DMEM 高糖培养基，与 Lipo3000 培养基溶液混匀后为静置 30 min。6 孔板每孔加入 0.4 mL 混合静置完毕后的质粒溶液和 1.6 mL 的诱导液。后续细胞诱导分化步骤同第一章第二节实验方法 2.3。

2.2.2 过表达 *Trib1* 脂肪细胞 RNA-Sequencing 检测

过表达 *Trib1* 的脂肪细胞分化成熟后，收集细胞 RNA 样本，同本章第一节实验方法 2.2。

2.3 3T3-L1 脂肪细胞诱导分化及脂滴油红染色

同第一章第二节实验方法 2.3。

2.4 Mitotracker 线粒体染色检测脂肪细胞线粒体数目

将 Mitotracker 用无血清培养基配置成浓度 250 nmol/L 的工作液，避光 37°C 预热。过表达 *Trib1* 的脂肪细胞分化成熟后，加入 PBS 洗涤三次。每孔加入 500 μL 预热的 Mitotracker 工作液，避光 37°C 染色 30 min。每孔加入预热的 H333342 染色液 500 μL ，避光 37°C 染色 15 min。PBS 洗涤三次，荧光显微镜拍照。

2.5 Seahorse 能量代谢仪检测脂肪细胞呼吸代谢水平

2.5.1 细胞培养和水化探针

细胞培养：过表达 *Trib1* 的脂肪细胞分化成熟后，在培养板内加入胰酶消化细胞。停止消化后离心细胞，加入完全培养基重悬并计数，稀释细胞使细胞浓度为 5×10^5 个/mL。在 XF24 细胞培养板上标记出 4 个背景孔，在其余 20 个非背景孔中加入 150 μL 含血清培养基。轻轻吹匀计数后的细胞液，在非背景孔中加入 100 μL 细胞液，背景孔不加入任何液体。将 XF24 细胞培养板置于 37°C，5 % CO_2 的细胞培养箱中培养过夜，使细胞贴壁。

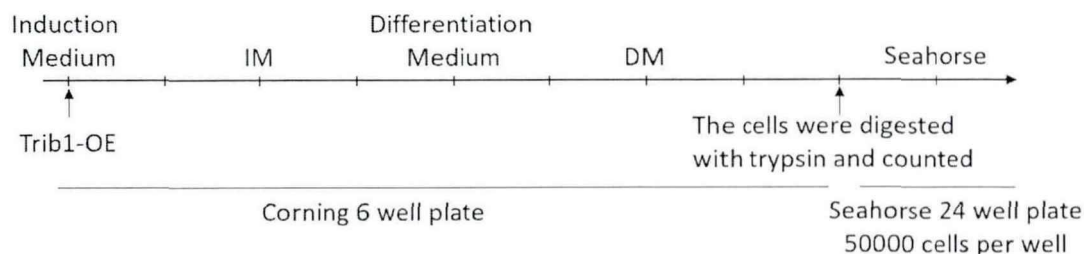


Figure 3-9 Cell culture process

水化探针：在探针板相同位置上标记出 4 个背景孔，在所有孔中加入 1 mL 校正

缓冲液，仔细检查探针上无气泡后，将探针板置于 37°C，无 CO₂ 的培养箱中水化过夜。

分析培养基配置：使用分析基础培养基（不含葡萄糖、丙酮酸钠、谷氨酰胺、碳酸氢钠）配置分析工作培养基，包括谷氨酰胺 2 mmol/L、葡萄糖 10 mmol/L 和丙酮酸钠 1 mmol/L（50 mL 分析基础培养基加入 14.615 mg 谷氨酰胺，90.08 mg 葡萄糖和 5.502 mg 丙酮酸钠）。混匀后水浴 37°C，用碳酸氢钠粉末调节 pH 为 7.40。4°C 保存分析工作培养基，使用前 37°C 预热。

2.5.2 细胞呼吸代谢测定

细胞换液：从细胞孵箱中取出贴壁的 XF24 细胞培养板。以预热的分析工作培养基洗涤 20 个细胞孔两次：吸弃 200 μ l 含血清培养基，贴壁加入 1 mL 分析工作培养基，吸弃 1 mL 分析工作培养基，加入 1 mL 分析工作培养基，吸弃所有培养基，在 24 孔中（包括背景孔）贴壁加入 500 μ l 分析工作培养基。洗涤过程每次操作 3-4 孔，也避免全部吸走培养基使细胞长时间暴露。

细胞呼吸代谢测定：XF24 细胞培养板完成更换分析工作培养基后，放入 37°C，无 CO₂ 的培养箱，平衡 1 h。同时取出装有粉末的 A，B 和 C 管，A 中加入 630 μ l 分析工作培养基，B 中加入 720 μ l 分析工作培养基，C 中加入 540 μ l 分析工作培养基混合均匀为药物母液。预实验后脂肪细胞最终采用的 A，B 和 C 工作液浓度为：A 液 1 μ mol/L，B 液 4 μ mol/L 和 C 液 0.5 μ mol/L，采用母液稀释混合均匀。拿出探针板，于 A 孔加入 A 工作液 50 μ l，B 孔加入 B 工作液 62 μ l，C 孔加入 C 工作液 69 μ l。取出探针板粉色和透明盖子，放入仪器平衡，约 30 min。探针板平衡完毕，将弹出的探针缓冲液板替换 XF24 细胞培养板，开始测定，持续测量 3 小时。

2.6 统计学分析

使用软件 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析，实验数据均采用 mean $\pm$ SD 表示。数据进行方差齐性检验，在两组间，采用双尾 T 检验（Two-tailed Student's t-test）；多组间采用单因素方差分析（One-Way ANOVA），在组间差异有统计学意义后采用 Turkey 进行两两比较，当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 过表达 *Trib1* 对 3T3-L1 脂肪细胞脂滴形成的影响

前面的实验结果表明，*Trib1* 敲除导致小鼠 BAT 线粒体功能障碍，进而使小鼠产热受损和血脂升高。然而我们不能确定这种功能障碍是否是由于肝脏或肌肉等其

他组织中的 *Trib1* 敲除所致。因此，本研究在 3T3-L1 前脂肪细胞中过表达 *Trib1*，并诱导细胞分化和成熟。油红 O 染色显示过表达 *Trib1* 的脂肪细胞中脂滴数量显著减少，这提示我们 *Trib1* 可以减少脂质在脂肪细胞的蓄积。

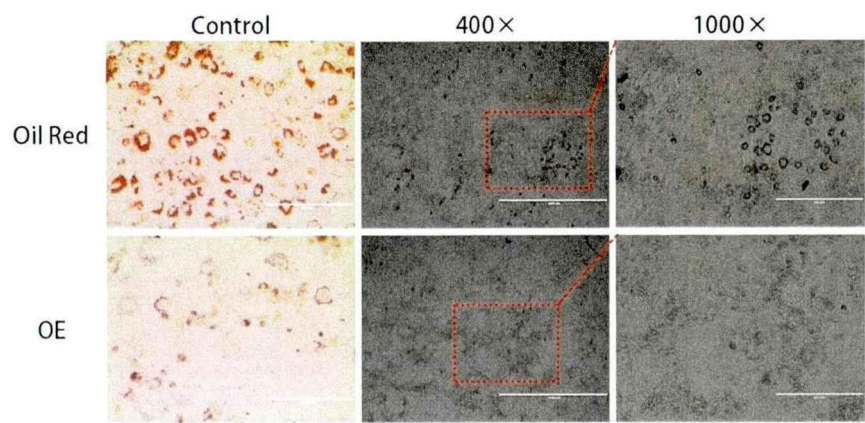


Figure 3-10 Effects of *Trib1* overexpression on lipid droplet formation in 3T3-L1 adipocytes. After overexpression of *Trib1*, 3T3-L1 cells were stained with oil red staining and lipid droplets under natural light. Oil red scale bar: 400 μm ; Lipid droplets under natural light scale bar: 1000 μm / 400 μm .

3.2 过表达 *Trib1* 的脂肪细胞表达谱及 KEGG 分析

进一步我们通过 RNA 测序探究 *Trib1* 对脂肪细胞的影响。结果显示与对照组相比，过表达 *Trib1* 条件下，表达变化大于两倍的基因数量分别为 11027 个和 11164 个，火山图显示 4398 个基因上调，4015 个基因下调。与产热和氧化磷酸化相关的基因在 *Trib1* 过表达的细胞中明显上升。（产热相关基因附录二）

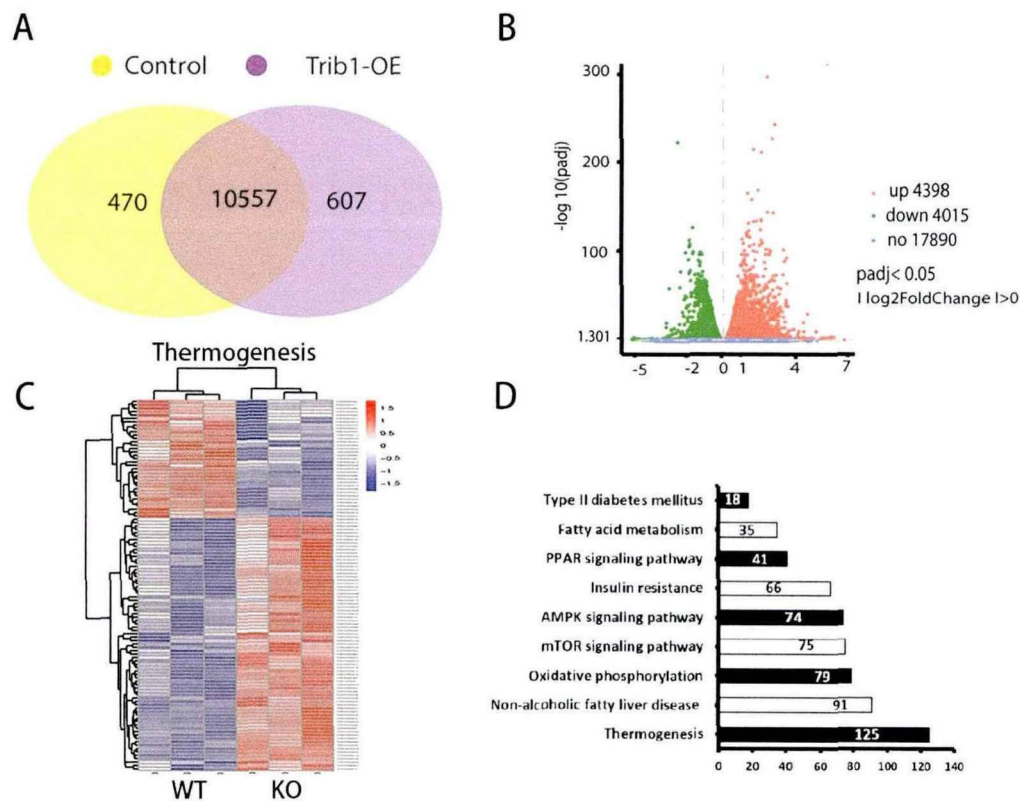


Figure 3-11 Adipocyte differential genes overexpressing *Trib1* and KEGG analysis. (A) The venn diagram of RNA-seq indicated the number of differentially expressed genes between 3T3-L1 cells control group and *Trib1* overexpressing group, respectively. n = 3. (B) The volcano plot of RNA-seq showing up and downregulated genes between 3T3-L1 cells control group and *Trib1* overexpressing group. (C) Heat map of thermogenesis gene clusters in 3T3-L1 cells control group and *Trib1* overexpressing group. Red and blue represent upregulation and downregulation expression, respectively. (D) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes analysis of upregulated pathway in 3T3-L1 cells control group and *Trib1* overexpressing group.

3.3 过表达 *Trib1* 对 3T3-L1 脂肪细胞线粒体数目的影响

本研究使用 MitoTracker 染色观察过表达 *Trib1* 后线粒体数目的变化。结果显示过表达 *Trib1* 和 *Uqcrc2* 后线粒体数量增加，但加入线粒体呼吸链复合物 III 抑制剂后，线粒体数目增加的变化被抑制，这提示我们 *Trib1* 对线粒体生物发生的正向调节作用。

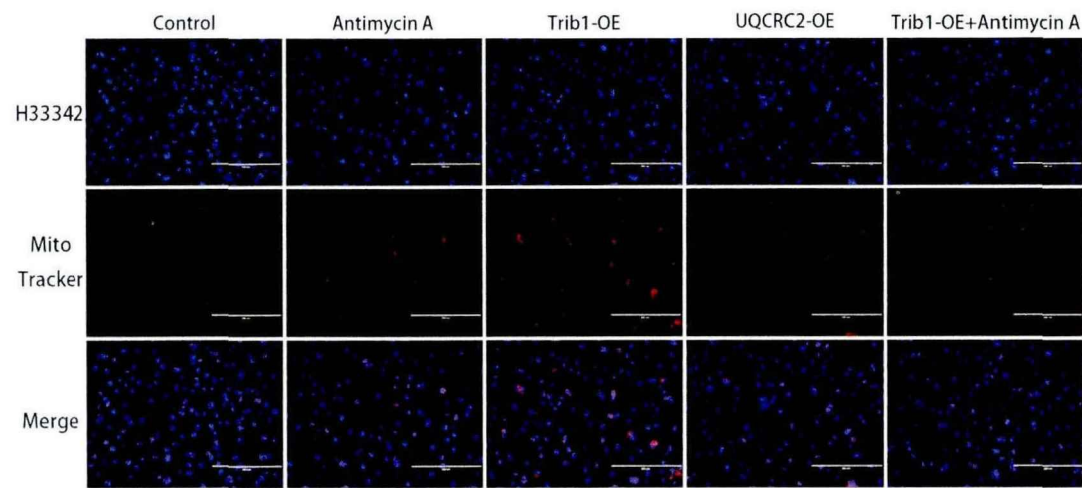


Figure 3-12 Effects of overexpression of *Trib1* on mitochondrial numbers in 3T3-L1 adipocytes. Cells were stained with mitotracker and Hoechst 33342. Scale bar: 200 μ m.

3.4 过表达 *Trib1* 对 3T3-L1 脂肪细胞呼吸代谢水平的影响

为了确定 *Trib1* 过表达对线粒体功能的直接影响，本研究通过 Seahorse 实验直接测定细胞耗氧率（OCR）和细胞外酸化率（ECAR）来评估细胞氧化磷酸化和糖酵解水平。结果显示 *Trib1* 过表达组的基础耗氧率显著高于对照组，提示我们 *Trib1* 过表达提高了细胞呼吸代谢水平。*Trib1* 过表达组的基础 OCR 和最大 OCR（加入 FCCP 处理后）均高于对照组，但加入线粒体复合物III的抑制剂抗霉素 A 可抑制 *Trib1* 改善呼吸代谢的功能。这些结果表明，*Trib1* 可以通过改善线粒体功能来增强脂肪细胞代谢功能，这与 *Trib1* 基因敲除降低 BAT 产热的结果一致。

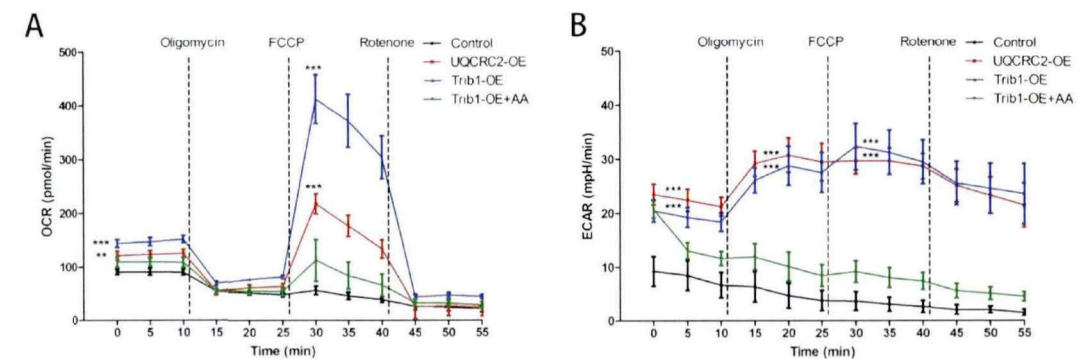


Figure 3-13 Effects of overexpression of *Trib1* on the level of respiratory metabolism in 3T3-L1 adipocytes. Seahorse XF24 mitochondrial stress analyses for OCR (A) and ECAR (B) in 3T3-L1 cells treated by overexpression of *Trib1* (*Trib1*-OE), *Uqcrc2* (*Uqcrc2*-OE) and inhibitor (*Trib1*-OE+AA). One-way ANOVA multiple comparisons with Tukey's test. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.01$ vs. control group.

4 小结

本研究在脂肪细胞中过表达 *Trib1*, 验证 *Trib1* 对脂肪细胞的直接作用。结果显示过表达 *Trib1* 后脂肪细胞中的脂滴减少, 线粒体数目增加。测序结果显示出产热和氧化磷酸化相关的基因高表达。通过 Seahorse 能量代谢仪直接测定细胞线粒体的代谢水平, 结果显示 *Trib1* 的过表达显著提高细胞的基础呼吸代谢水平和最大呼吸代谢水平, 而加入抑制剂后其功能被抑制。这些结果证明 *Trib1* 通过提高线粒体功能增加细胞代谢, 是调控棕色脂肪功能的重要靶点。

讨论

我们通过 TRIB1-GST 融合蛋白在体外探究 TRIB1 作用蛋白, 结果显示 TRIB1 与线粒体复合物III的亚基 UQCRC2 结合。由于 UQCRC2 蛋白在线粒体内膜表达, 因此我们对 TRIB1 蛋白在 3T3-L1 脂肪细胞内的分布进行探究。我们分别提取了脂肪细胞的细胞质蛋白、核蛋白和线粒体蛋白进行 Western Blot 实验, 结果发现在各部分内参蛋白稳定表达的情况下, 都无法检测到 TRIB1 蛋白。同样的, Sébastien Soubeyrand 等人在 HEK293T、HeLa 和动脉平滑肌细胞三种细胞系中, 也发现通过 Western Blot 无法检测到 TRIB1 蛋白。利用 TRIB1 重组蛋白发现 TRIB1 在蛋白质和 RNA 水平上高度不稳定。且通过阻断蛋白酶体功能发现 TRIB1 蛋白的不稳定发生在其核易位功能之前的阶段^[12]。Elizabeth E Ha 等人发现, 通过蛋白酶体抑制剂 MG132 处理, 可以检测到微量的 TRIB1 蛋白, 表明在 3T3-L1 细胞中 TRIB1 不稳定与蛋白酶体快速降解有关^[13]。

通过对 *Trib1* 敲除小鼠棕色脂肪进行 RNA-Sequencing, 我们发现除了与线粒体结构相关的成分基因下调外, 产热、氧化磷酸化、脂肪酸代谢和胰岛素敏感性相关的基因也被下调。有研究提出在肥胖患者中线粒体功能障碍和糖脂代谢异常, 可能导致炎症级联反应的发生^[14]。高水平的脂肪酸和葡萄糖被氧化成乙酰辅酶 A, 进入线粒体三羧酸循环使线粒体超载, 这也增加了线粒体呼吸链复合物的电子传递, 从而导致细胞内活性氧的增加^[15]。线粒体活性氧是氧化磷酸化的副产物, 主要由于电子呼吸链复合物 I 和 III 释放^[16]。当线粒体过载时, 堆积的活性氧没有及时被超氧化物歧化酶等清除, 进而诱导组织慢性炎症的发生。而慢性全身炎症和氧化应激被认为介导胰岛素抵抗^[17], 这也与我们观察到 *Trib1* 敲除小鼠表现出瘦素和胰岛素抵抗一致。

作为高度动态化的细胞器, 线粒体经历形态变化和空间重排以适应细胞需求并维持能量稳态^[3]。寒冷刺激下细胞产热需求增加, 中枢神经系统通过影响线粒体动

力学, 调控线粒体的形态、质量和密度增加棕色脂肪的产热^[18]。线粒体动力学包括线粒体融合、分裂和自噬, 在动态平衡中维持着线粒体质量^[19]。有研究发现肥胖个体脂肪组织的 ATP 水平降低与线粒体动力学改变相关^[20]。线粒体动力学改变使线粒体功能降低, 进而改变脂肪细胞代谢途径, 例如脂肪生成、脂肪氧化分解和脂肪细胞因子的分泌等^[3, 21]。我们的研究发现 *Trib1* 敲除的小鼠线粒体复合物 I、III 和 V 的表达水平降低, 进而影响细胞的氧化磷酸化和 ATP 水平, 这也提示我们对 *Trib1* 敲除小鼠的线粒体融合和分裂进行测定。线粒体融合是将两个原本不同的线粒体, 通常一个受损, 另一个正常的线粒体膜和成分融合, 通过互补的方式混合部分受损的线粒体的结构来减轻线粒体压力。而裂变主要为了分离线粒体膜以重组结构受损部分, 分离有利于线粒体受损部分的自噬和消除, 并保留还能进行正常功能的线粒体^[22]。在我们的实验中发现 *Trib1* 敲除通过影响电子呼吸链活性破坏了线粒体动力学稳态, 进而导致其结构损伤和脂肪代谢功能障碍。但线粒体功能障碍和线粒体动力学的因果关系仍有许多不同的看法, 仍待进一步的实验探究。

在我们的实验中为了直接测定细胞线粒体功能和呼吸代谢水平, 通过 Seahorse 能量代谢仪加入不同细胞呼吸调节剂, 检测细胞的基础呼吸、ATP 关联呼吸、最大呼吸、备用呼吸能力以及非线粒体呼吸。寡霉素 (oligomycin) 为 ATP 合酶的抑制剂, 可以特异地抑制 H⁺ 的跨膜运输, 从而抑制 ATP 的合成^[23]。因此, 可以通过寡霉素测定 ATP 关联呼吸水平。三氟甲氧基苯腈羰基氰化物 (FCCP) 是线粒体氧化磷酸化解偶联剂, 可破坏线粒体内膜, 使线粒体氧耗增加而不产生 ATP, 用于测定细胞的最大呼吸代谢水平和备用呼吸能力^[24, 25]。与对照组细胞相比, 我们发现 *Trib1* 过表达可以显著提高脂肪细胞的基础呼吸代谢水平和最大呼吸代谢水平, 这提示我们 *Trib1* 过表达可以提高细胞线粒体功能, 这也在细胞水平上说明了 *Trib1* 是调控棕色脂肪功能的重要靶点。

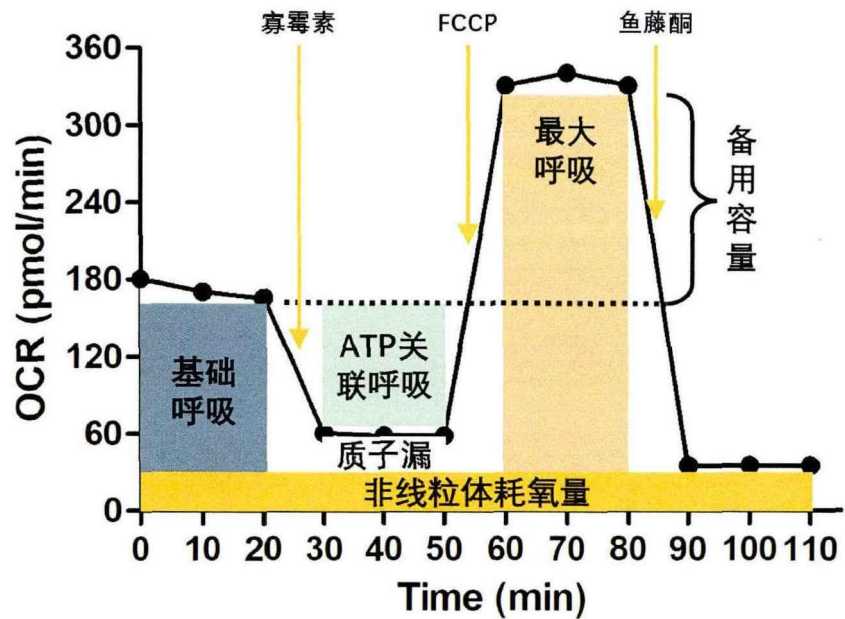


Figure 3-14 Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Profile for mitochondrial respiration.

结论

利用 *Trib1* 敲除小鼠和 3T3-L1 脂肪细胞对 *Trib1* 调控 BAT 产热的分子机制进行探究。在动物水平上，通过 RNA-Sequencing 和 Pull Down 实验发现，*Trib1* 敲除通过影响电子呼吸链活性破坏了线粒体动力学稳态，进而导致其结构损伤和脂肪代谢功能障碍。但我们不能确定这种功能障碍是否是有其他组织中 *Trib1* 敲除所致。因此，我们在 3T3-L1 前脂肪细胞中过表达 *Trib1*。在细胞水平上我们发现 *Trib1* 的过表达直接提高细胞代谢水平，而加入抑制剂后其功能被抑制。这些结果提示我们 *Trib1* 通过提高线粒体功能增加细胞代谢，*Trib1* 是调控棕色脂肪功能的重要靶点。

参考文献

- [1] LEE J H, PARK A, OH K J, et al. The Role of Adipose Tissue Mitochondria: Regulation of Mitochondrial Function for the Treatment of Metabolic Diseases [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19).
- [2] FERNIE A R, CARRARI F, SWEETLOVE L J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport [J]. Curr Opin Plant Biol, 2004, 7(3): 254-61.
- [3] EISNER V, PICARD M, HAJNOCZKY G. Mitochondrial dynamics in adaptive and

- maladaptive cellular stress responses [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(7): 755-65.
- [4] MEYER J N, LEUTHNER T C, LUZ A L. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity [J]. *Toxicology*, 2017, 391: 42-53.
- [5] PRYDE K R, SMITH H L, CHAU K Y, et al. PINK1 disables the anti-fission machinery to segregate damaged mitochondria for mitophagy [J]. *J Cell Biol*, 2016, 213(2): 163-71.
- [6] LOPEZ-LLUCH G. Mitochondrial activity and dynamics changes regarding metabolism in ageing and obesity [J]. *Mech Ageing Dev*, 2017, 162: 108-21.
- [7] BOUTANT M, KULKARNI S S, JOFFRAUD M, et al. Mfn2 is critical for brown adipose tissue thermogenic function [J]. *EMBO J*, 2017, 36(11): 1543-58.
- [8] TEZZE C, ROMANELLO V, DESBATS M A, et al. Age-Associated Loss of OPA1 in Muscle Impacts Muscle Mass, Metabolic Homeostasis, Systemic Inflammation, and Epithelial Senescence [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(6): 1374-89 e6.
- [9] FAVARO G, ROMANELLO V, VARANITA T, et al. DRP1-mediated mitochondrial shape controls calcium homeostasis and muscle mass [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2576.
- [10] MISHRA P, CARELLI V, MANFREDI G, et al. Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation [J]. *Cell Metab*, 2014, 19(4): 630-41.
- [11] WIKSTROM J D, MAHDAVIANI K, LIESA M, et al. Hormone-induced mitochondrial fission is utilized by brown adipocytes as an amplification pathway for energy expenditure [J]. *EMBO J*, 2014, 33(5): 418-36.
- [12] SOUBEYRAND S, MARTINUK A, LAU P, et al. TRIB1 Is Regulated Post-Transcriptionally by Proteasomal and Non-Proteasomal Pathways [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0152346.
- [13] HA E E, QUARTUCCIA G I, LING R, et al. Adipocyte-specific tribbles pseudokinase 1 regulates plasma adiponectin and plasma lipids in mice [J]. *Mol Metab*, 2022, 56: 101412.
- [14] SALMINEN A, OJALA J, KAARNIRANTA K, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress activate inflammasomes: impact on the aging process and age-related diseases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(18): 2999-3013.
- [15] HAMILTON S, TERYTYEVA R, MARTIN B, et al. Increased RyR2 activity is exacerbated by calcium leak-induced mitochondrial ROS [J]. *Basic Res Cardiol*, 2020, 115(4): 38.

- [16]CHEN Y R, ZWEIER J L. Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation [J]. *Circ Res*, 2014, 114(3): 524-37.
- [17]CARRIER A. Metabolic Syndrome and Oxidative Stress: A Complex Relationship [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 26(9): 429-31.
- [18]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.
- [19]MISHRA P, CHAN D C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(10): 634-46.
- [20]WANG Y, KATAYAMA A, TERAMI T, et al. Translocase of inner mitochondrial membrane 44 alters the mitochondrial fusion and fission dynamics and protects from type 2 diabetes [J]. *Metabolism*, 2015, 64(6): 677-88.
- [21]CHAN D C. Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 235-59.
- [22]KRAUS F, ROY K, PUCADYIL T J, et al. Function and regulation of the divisome for mitochondrial fission [J]. *Nature*, 2021, 590(7844): 57-66.
- [23]PENEFSKY H S. Mechanism of inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by dicyclohexylcarbodiimide and oligomycin: relationship to ATP synthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985, 82(6): 1589-93.
- [24]JOHNSTON R, CRIDDLE R S. F1-ATPase-catalyzed synthesis of ATP from oleoylphosphate and ADP [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977, 74(11): 4919-23.
- [25]SHI C M, WANG Y M, ZHANG C M, et al. Knockdown of NYGGF4 (PID1) rescues insulin resistance and mitochondrial dysfunction induced by FCCP in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Mitochondrion*, 2012, 12(6): 600-6.

第四章 小檗碱调控棕色脂肪功能抑制肥胖的作用研究

小檗碱是中药黄连 (*Coptis chinensis* Franch) 中分离得到的异喹啉生物碱，最初用于治疗腹泻^[1]。随着传统医药发展，对小檗碱进行了系统的研究，发现小檗碱还可用于神经退行性疾病、肿瘤、心血管等多种疾病的治疗^[2-6]。在 2004 年，有研究者提出小檗碱是一种作用机制不同于他汀的新型降血脂药物^[7]。随后研究发现，小檗碱在高血脂、糖尿病和肥胖中都有很好的药效^[8-10]。其中小檗碱在肥胖治疗中涉及到的主要机制包括：抑制脂肪生成、减轻脂肪组织纤维化、缓解炎症，以及激活 AMPK 促进棕色脂肪产热^[10, 11]。由此，我们可见小檗碱对棕色脂肪代谢产热是有正调节作用的。

有趣的是，有研究发现小檗碱处理可以提高小鼠肝脏 LDLR 和 TRIB1 的表达水平，降低血清甘油三酯。进一步的，研究者采用了肝脏特异性 LDLR 敲除小鼠 (*LDLR^{-/-}*)，并给与小檗碱处理。结果表明小檗碱提高 *LDLR^{-/-}* 小鼠的肝脏 *Trib1* 表达水平，并降低血清甘油三酯。该研究指出，小檗碱通过提高 *Trib1* 表达水平降低血清甘油三酯的作用是非 LDLR 依赖的^[12]。

而我们前面的研究结果表明，*Trib1* 是调节小鼠线粒体和棕色脂肪细胞功能的重要靶点。但对于小檗碱在棕色脂肪能量代谢中的作用是否与 *Trib1* 有关仍需探究。

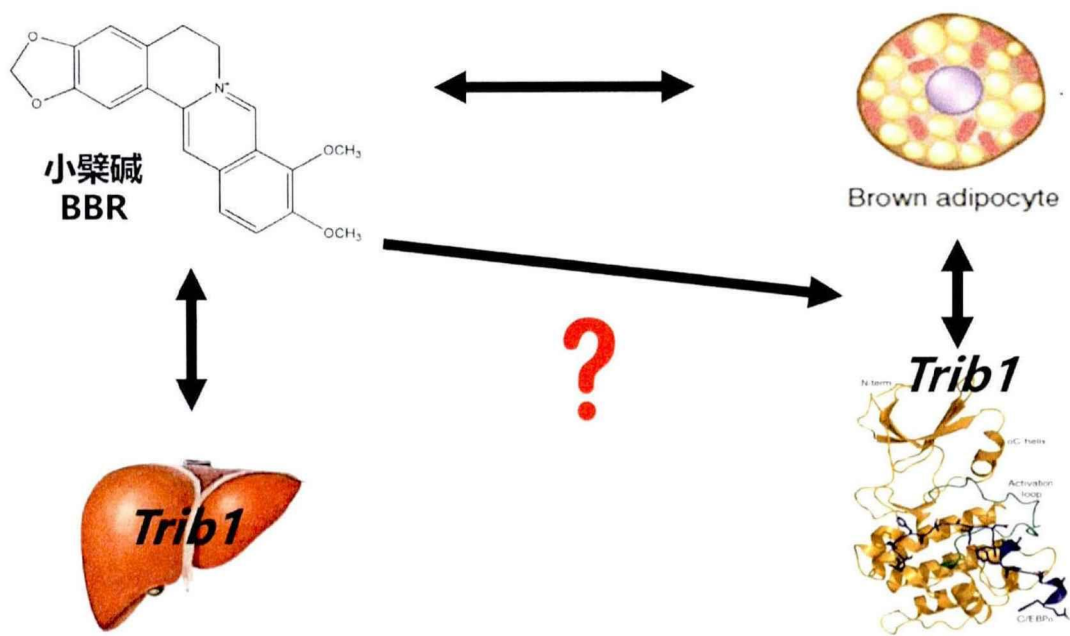


Figure 4-1 Pharmacological effects of berberine in liver and brown adipose tissue.

第一节 小檗碱对肥胖小鼠体重、血脂和炎症的影响

ob/ob 小鼠是瘦素基因纯合突变的小鼠，其特征为肥胖、多食、高血糖和胰岛素抵抗。相比于 db/db 肥胖小鼠模型，ob/ob 小鼠的肝脏具有更高程度的脂肪变性和炎症水平，其特征是免疫细胞浸润显著增加。在脂肪增量相似的情况下，ob/ob 小鼠的附睾脂肪组织和棕色脂肪组织的显著高于 db/db 小鼠^[13]。因此本研究采用 ob/ob 自发性肥胖小鼠，灌胃给予小檗碱处理 8 周。记录肥胖小鼠体重和血糖变化，并测定小鼠的血脂和炎症水平，探究小檗碱对 ob/ob 肥胖小鼠脂代谢相关表型的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物

6 周龄 ob/ob 和对照 ob/ob^(+/+) 小鼠（雄）购于江苏集萃药康生物科技有限公司，合格证号：202016589。所有动物实验程序均由中国医学科学院北京协和医学院动物伦理委员会批准（SLXD-20180706）。

1.2 实验试剂

与前期实验材料重复部分不再列举。

名称	厂家	货号
胰岛素注射液	万邦生化医药股份有限公司	21804212
小檗碱	Sigma 公司	B3251
褪黑素	Sigma 公司	M5250
小鼠肿瘤坏死因子 α	冬歌博业生物科技有限公司	DG30048M
小鼠 IL-10 ELISA KIT	冬歌博业生物科技有限公司	DG30091M
小鼠 IL-1βELISA KIT	冬歌博业生物科技有限公司	DG95603Q
小鼠 CRP ELISA Kit	华美生物工程有限公司	CSB-E07923
稳豪型血糖试纸	强生医疗器材有限公司	1297006

1.3 实验仪器

与前期实验仪器重复部分不再列举。

名称	厂家	型号
血糖仪	强生医疗器材有限公司	Onetouch Ultra

全自动生化仪

Beckman Coulter 公司

AU480

2 实验方法

2.1 ob/ob 小鼠分组和给药

小檗碱的配置：使用 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液将小檗碱粉末配置为 10 mg/mL 的剂量备用，4℃ 冰箱保存。小檗碱溶液给药剂量为 100 mg/kg。

褪黑素的配置：使用 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液将褪黑素粉末配置为 10 mg/mL 的剂量备用，锡纸避光 4℃ 冰箱保存。褪黑素溶液给药剂量为 100 mg/kg。

将 ob/ob 小鼠饲养在室温 22℃，适度 60% 的环境。保证 12 h 的光暗循环且给与普通饲料和干净的水。在适应一周后，将小鼠随机分为四组：

- (1) ob/ob^{+/+} 组（对照组）；
- (2) ob/ob 组（模型组）；
- (3) ob/ob+褪黑素组；
- (2) ob/ob+小檗碱组。

每天小鼠灌胃给与药物，每周禁食测定血糖和体重，连续处理 8 周。

2.2 ob/ob 小鼠胰岛素敏感性和葡萄糖耐量检测

在胰岛素敏感性检测中，小鼠禁食 6 h，测定基础血糖值后在腹腔注射 0.75 U/kg 的胰岛素。在注射后 30、60、90 和 120 min，使用自动血糖仪检测 ob/ob 小鼠的血糖水平。至少使小鼠恢复三天后进行葡萄糖耐量检测，小鼠禁食 12 h，测定基础血糖值后灌胃给予 2 g/kg 的葡萄糖。在给药后 30、60、90 和 120 分钟，使用自动血糖仪检测 ob/ob 小鼠的血糖水平。

2.3 体脂仪测定 ob/ob 小鼠体脂比率

同第二章第二节实验方法 2.2。

2.4 ob/ob 小鼠组织分离取材及样本制备

同第二章第二节实验方法 2.1。

2.5 ob/ob 小鼠脂肪和肝脏组织 HE 染色

同第二章第二节实验方法 2.3。

2.6 ob/ob 小鼠肝脏组织油红染色

同第二章第二节实验方法 2.4。

2.7 生化仪检测 ob/ob 小鼠血脂和肝损伤水平

同第二章第三节实验方法 2.6。

2.8 ELISA 法检测 ob/ob 小鼠血清瘦素、胰岛素和脂联素水平

同第二章第二节实验方法 2.6。

2.9 ELISA 法检测 ob/ob 小鼠血清炎症因子水平

根据制造商的说明，使用酶联免疫吸附测定试剂盒测量血清中肿瘤坏死因子 α (Tumour necrosis factor- α , TNF- α)、C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)、IL-10 和 IL-1 β 的表达水平。

2.10 统计学分析

使用软件 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析，实验数据均采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。数据进行方差齐性检验，在两组间，采用双尾 T 检验 (Two-tailed Student's t-test)；多组间采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)，在组间差异有统计学意义后采用 Turkey 进行两两比较，当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 小檗碱对 ob/ob 小鼠体重、体脂和脏器系数的影响

6 周龄的 ob/ob 小鼠给与小檗碱治疗 8 周，每周禁食测定各组体重。与对照组相比 ob/ob 小鼠体重增加明显，经小檗碱治疗 4 周后体重减轻。治疗 8 周后，与模型组小鼠相比，小檗碱治疗的 ob/ob 小鼠的体重和体脂率显著降低 (Figure 4-2A B D)，且小檗碱给药处理明显减少脂质在肝脏的堆积 (Figure 4-2C)。

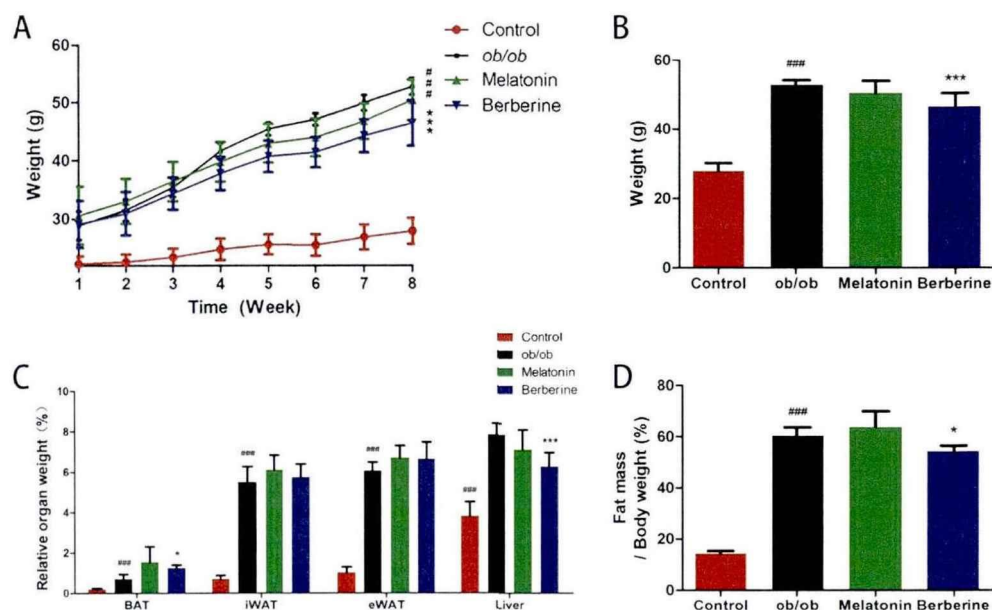


Figure 4-2 Effects of berberine on body weight, body fat and organ coefficients in ob/ob mice. The bodyweight curve (A) and body weight in the last week (B) during the 8 weeks of treatment. Body composition (C) and fat mass-to-body weight ratio (D). Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 8$). ^{###} $P < 0.001$ vs. the Control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{***} $P < 0.001$ vs. the ob/ob group.

3.2 小檗碱对 ob/ob 小鼠胰岛素敏感性和葡萄糖耐量的影响

小檗碱治疗 8 周后，为了评估小鼠胰岛素敏感性，本研究进行了葡萄糖耐量测试（Glucose tolerance test, GTT）和胰岛素耐量测试（Insulin tolerance test, ITT）。结果显示治疗 8 周后，小檗碱对 ob/ob 小鼠葡萄糖耐量无明显改善作用（Figure 4-3A B），但提高了 ob/ob 小鼠胰岛素敏感性（Figure 4-3C D）。

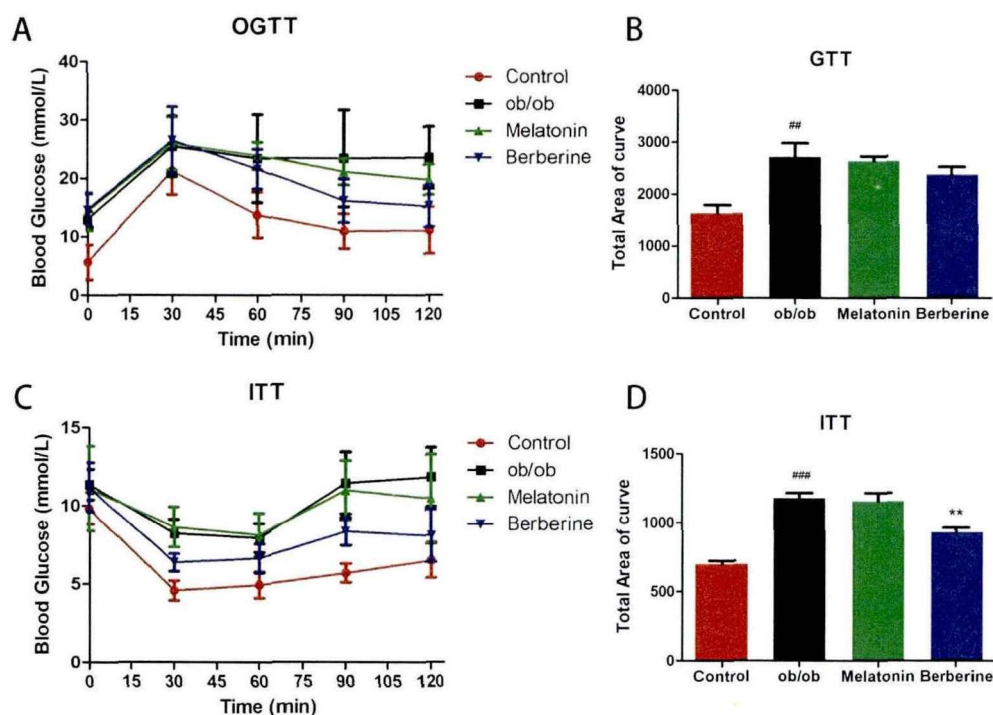


Figure 4-3 Effects of berberine on insulin sensitivity and glucose tolerance in ob/ob mice. The oral glucose tolerance test (OGTT) was performed in various groups, and (A) the values of the area under the curve (B). Insulin tolerance test (ITT) was performed in various groups, and (C) the values of the area under the curve (D). Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 8$). ^{##} $P < 0.01$, ^{###} $P < 0.001$ vs. the Control group; ^{**} $P < 0.01$ vs. the ob/ob group.

3.3 小檗碱对 ob/ob 小鼠脂肪组织的影响

前面的实验中我们观察到小檗碱显著降低了 ob/ob 小鼠体重，因此本研究对小鼠的 BAT、iWAT 和 eWAT 进行切片观察。结果显示与对照小鼠相比，ob/ob 模型小鼠脂肪细胞明显增大，阳性药褪黑素和小檗碱治疗 8 周后，棕色脂肪细胞脂滴变小，但 iWAT 和 eWAT 无明显变化（Figure 4-4A）。进一步免疫组化染色显示，小檗碱给药可以增加 BAT 中产热关键蛋白 UCP1 的表达（Figure 4-4B）。

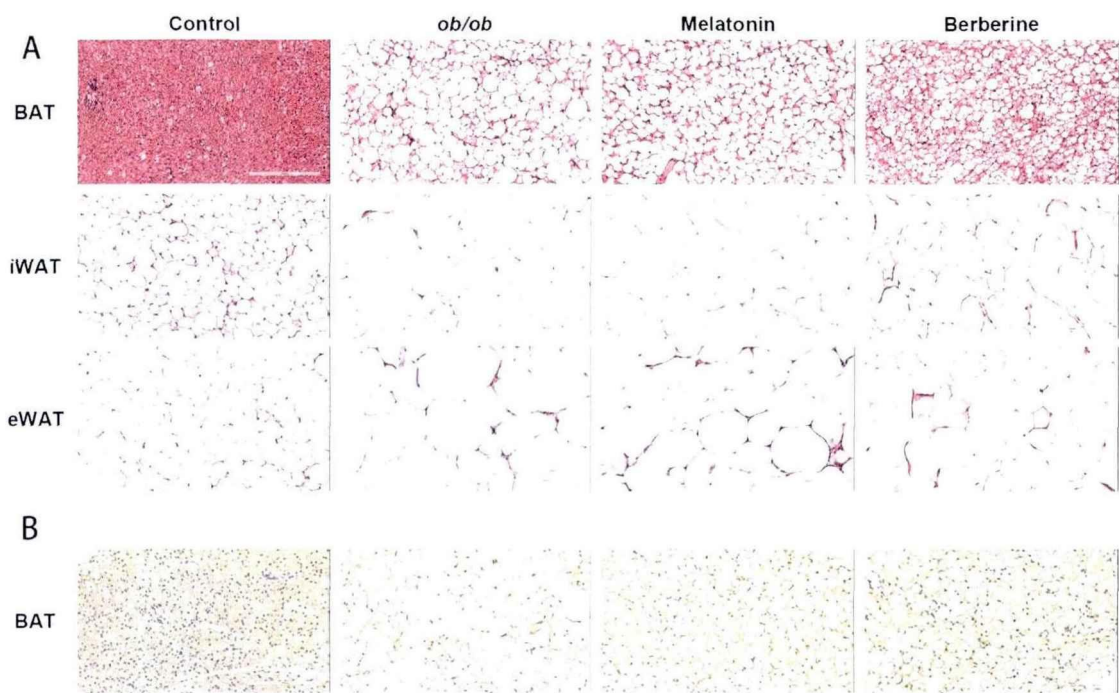


Figure 4-4 Effects of berberine on adipose tissue in *ob/ob* mice. (A) Representative images of H&E staining of mouse BAT, iWAT, and eWAT. (B) Representative images of UCP1 immunohistochemical staining of mice BAT. Scale bar: 200 μ m.

3.4 小檗碱对 *ob/ob* 小鼠肝脏组织的影响

通过脏器系数我们观察到小檗碱给药改善了脂质在肝脏的蓄积，进一步本研究通过 H&E 和油红染色对肝脏组织学和脂质情况进行观察。结果显示，小檗碱和褪黑素能明显减少脂质在肝细胞的堆积，改善肝脏组织空泡。

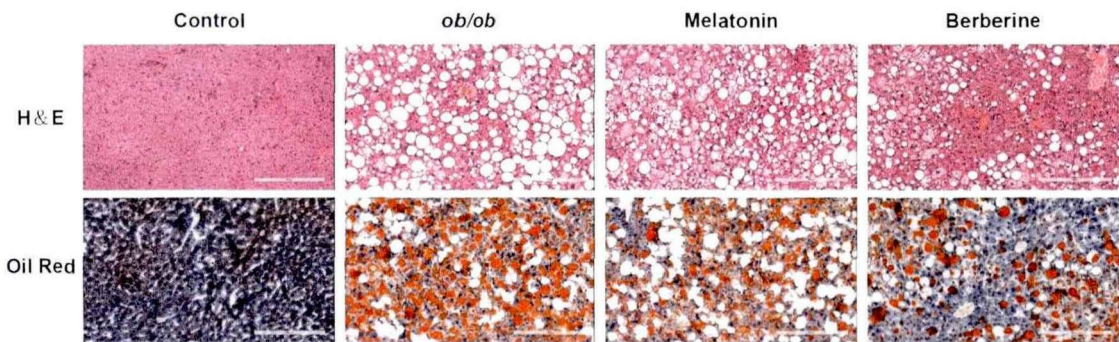


Figure 4-5 Effects of berberine on liver tissue of *ob/ob* mice. Representative images of H&E and oil red staining of mice liver tissue. Scale bar: 200 μ m.

3.5 小檗碱对 *ob/ob* 小鼠血脂和肝损伤水平的影响

通过自动生化仪对小鼠血脂和血清肝损伤指标进行测定。结果显示小檗碱治疗

能显著降低 ob/ob 小鼠血清 TC 和 TG 水平 (Figure 4-6A B C)。除此之外, 急性肝损伤指标 AST、ALT 和 ALP 水平也呈下降趋势 (Figure 4-6D E F)。提示我们 ob/ob 小鼠脂肪肝的缓解可能与小檗碱降低血清总胆固醇和肝损伤标志物的水平相关。

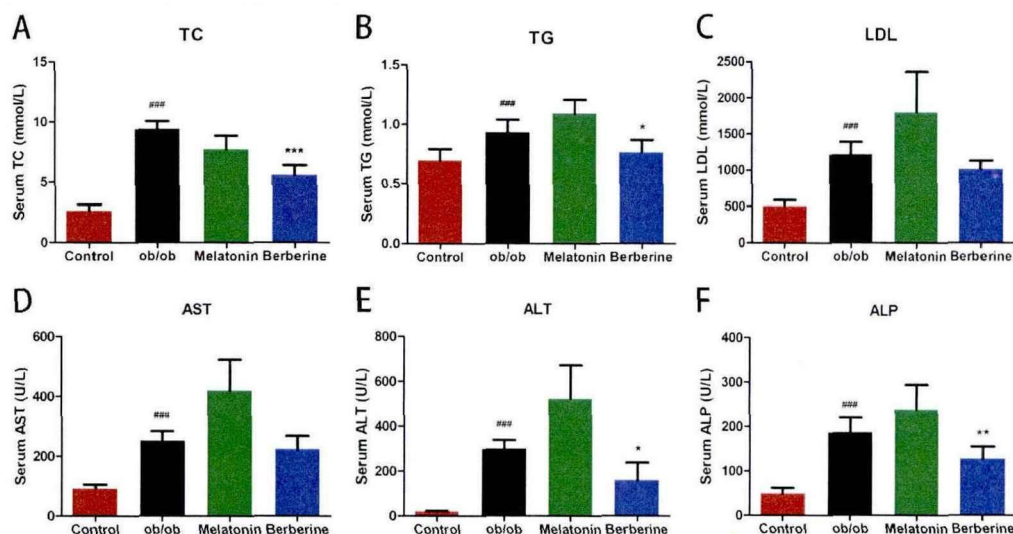


Figure 4-6 Effects of berberine on blood lipids and liver injury levels in ob/ob mice. Serum TC (A), TG (B) and LDL (C) levels in ob/ob mice. The levels of AST (D), ALT (E) and ALP (F) in serum of ob/ob mice with acute liver injury. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 8$). ### $P < 0.001$ vs. the Control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. the ob/ob group.

3.6 小檗碱对 ob/ob 小鼠血清瘦素、胰岛素和脂联素的影响

瘦素和脂联素都是脂肪组织分泌的脂肪因子, 可调控脂肪代谢和胰岛素敏感性。本研究通过测定血清血脂、瘦素、胰岛素和脂联素水平, 验证小檗碱对脂肪组织的作用。结果显示小檗碱处理 8 周后小鼠, ob/ob 小鼠血清中瘦素和胰岛素水平显著下降 (Figure 4-7A B), 脂联素水平显著升高 (Figure 4-7C), 表明小檗碱处理改善了 ob/ob 小鼠瘦素抵抗和胰岛素抵抗。

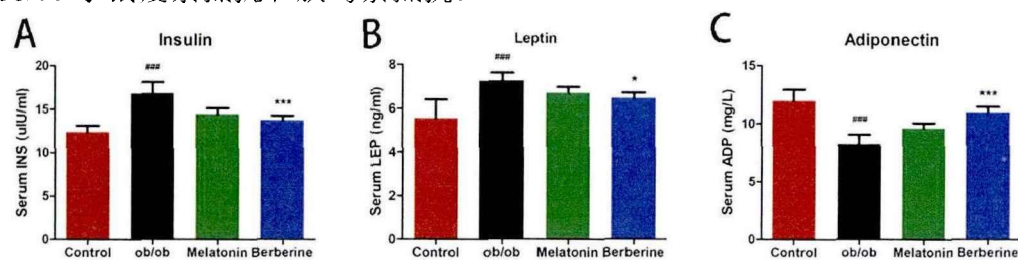


Figure 4-7 Effects of berberine on serum leptin, insulin and adiponectin in ob/ob mice. Obesity-related serum leptin (A), insulin (B), and adiponectin (C) expression levels in mice. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 8$). ### $P < 0.001$ vs. the Control group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs. the ob/ob group.

3.7 小檗碱对 ob/ob 小鼠血清炎症因子的影响

慢性炎症是肥胖症的核心特征，衰老和坏死的脂肪细胞募集巨噬细胞和其他免疫细胞浸润产生炎症反应，并释放炎症因子^[14-15]。因此我们验证了小檗碱对 ob/ob 小鼠炎症水平的作用。结果显示小檗碱处理能够降低 TNF- α 和 CPR 的血清水平，提高炎症抑制因子 IL-10 的血清水平，表明小檗碱能改善肥胖伴随的慢性炎症状态。

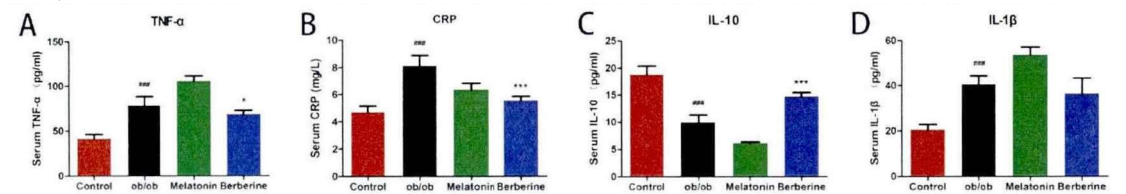


Figure 4-8 Effects of berberine on serum inflammatory factors in ob/ob mice. Inflammation-related serum TNF- α (A), CRP (B), interleukin-10 (C) and interleukin-1 β (D) expression levels in mice. Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 8). ^{###} P < 0.001 vs. the Control group; ^{*} P < 0.05, ^{***} P < 0.001 vs. the ob/ob group.

4 小结

小檗碱给药 8 周能明显降低 ob/ob 小鼠的体重和体脂率。组织切片染色分析显示，小檗碱可以减少脂质在 BAT 和肝脏组织的堆积。除此之外，小檗碱可以降低血脂水平和炎症水平，提高脂联素表达，改善胰岛素抵抗和瘦素抵抗。

第二节 小檗碱对肥胖小鼠棕色脂肪组织能量代谢的影响

前三章的研究结果表明, *Trib1* 是调节小鼠线粒体和棕色脂肪细胞功能的重要靶点, 在动物水平上 *Trib1* 敲除会损害小鼠棕色脂肪的产热代谢功能。而 Singh, A. B. 等人发现小檗碱可以通过提高 *LDLR*^{-/-} 小鼠肝脏 *Trib1* 的表达水平, 降低血清甘油三酯。

虽然前一节的研究已经证明了小檗碱显著抑制 *ob/ob* 小鼠体重增长, 并减少脂质在 BAT 和肝脏组织的堆积, 但小檗碱对棕色脂肪组织中 *Trib1* 表达水平的影响仍需进一步探究。

1 实验材料

1.1 实验动物

6 周龄 *ob/ob* 和对照 *ob/ob*^(+/+) 小鼠(雄)购于江苏集萃药康生物科技有限公司, 合格证号: 202016589。所有动物实验程序均由中国医学科学院北京协和医学院动物伦理委员会批准 (SLXD-20180706)。

1.2 实验试剂

与前期实验材料重复部分不再列举。

1.3 实验仪器

与前期实验仪器重复部分不再列举。

2 实验方法

2.1 动物代谢分析系统检测 *ob/ob* 小鼠呼吸代谢水平

同第二章第二节实验方法 2.7。

2.2 寒冷环境 *ob/ob* 小鼠体温检测

同第二章第二节实验方法 2.8。

2.3 RT-PCR 检测目的基因的表达

同第一章第二节实验方法 2.2。引物序列如下：

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (3'-5')
Trib1	AGAACCCAGCTTAGACTGGA	AAAAGCGTATAGAGCATCA
	A	CCC
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTT	TGTAGACCATGTAGTTGAG
	G	GTCA

2.4 Western blot 检测目的蛋白的表达

同第一章第三节实验方法 2.3。

2.5 统计学分析

使用软件 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析，实验数据均采用 mean ± SD 表示。数据进行方差齐性检验，在两组间，采用双尾 T 检验（Two-tailed Student’s t-test）；多组间采用单因素方差分析（One-Way ANOVA），在组间差异有统计学意义后采用 Turkey 进行两两比较，当 $P<0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 小檗碱对 ob/ob 小鼠呼吸代谢的影响

小檗碱处理后 BAT 中 UCPI 蛋白表达水平的升高提示我们通动物代谢分析系统测量对小鼠的能量代谢水平进行测定。结果显示，与模型组小鼠的相比，小檗碱处理的小鼠在 12 小时的光/暗周期中表现出明显高于模型组动物的氧气消耗和二氧化碳产生率，代谢水平上升。

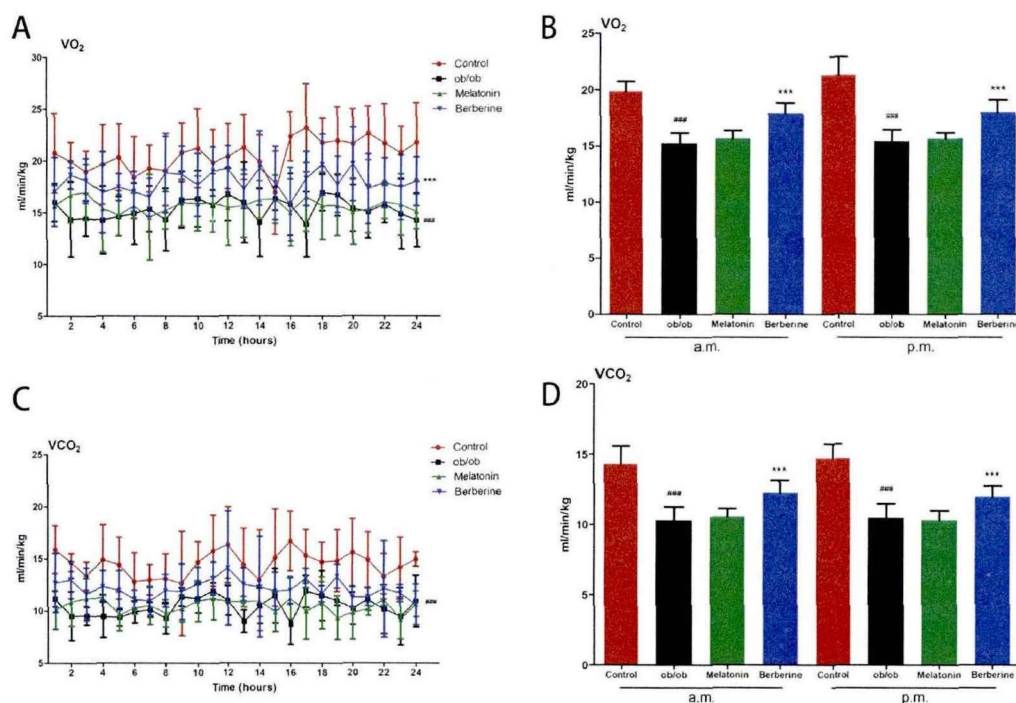


Figure 4-9 Effects of berberine on respiratory metabolism in ob/ob mice. Energy expenditure was evaluated by measuring oxygen consumption (A, B) and carbon dioxide release (C, D) in the control and ob/ob mice treated with berberine. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 5$). ### $P < 0.001$ vs. the Control group; *** $P < 0.001$ vs. the ob/ob group.

3.2 小檗碱对 ob/ob 小鼠在寒冷环境中适应性产热的影响

响应于寒冷刺激，BAT 会激活并利用脂肪酸产热以维持体温^[6]。本研究通过将小鼠暴露在 4°C 环境下 5 小时连续记录其肛温，评估了小檗碱对小鼠产热的影响。结果显示，小檗碱处理提高了 ob/ob 小鼠的适应性产热能力，提示我们小檗碱通过增加脂肪代谢产热，并减轻脂肪的蓄积。

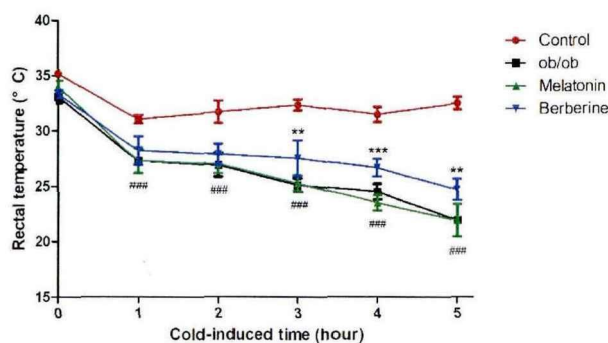


Figure 4-10 Effects of berberine on adaptive thermogenesis in ob/ob mice in a cold environment. After 5 h of cold exposure, the rectal temperature of the mice was measured. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 8$). ### $P < 0.001$ vs. the Control group; ** $P < 0.01$,

*** $P < 0.001$ vs. the ob/ob group.

3.3 小檗碱对 ob/ob 小鼠产热蛋白的影响

进一步本研究对棕色脂肪线粒体产热蛋白 UCP1 和 PGC-1 α 的表达水平进行测定。结果显示小檗碱提高了线粒体生物发生调节蛋白 PGC-1 α 和棕色脂肪线粒体特异性产热蛋白 UCP1 的表达水平。

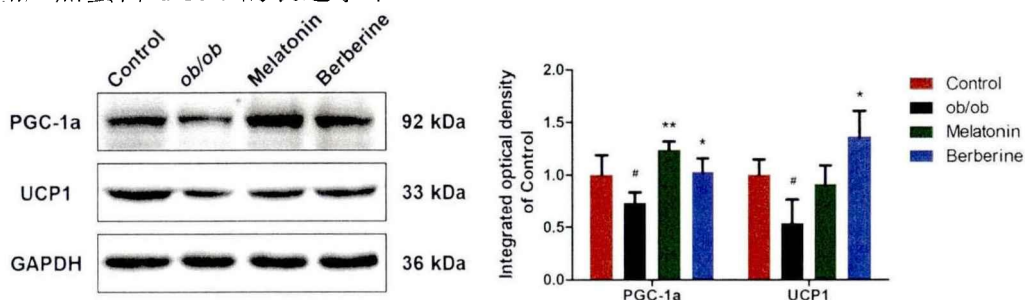


Figure 4-11 Effects of berberine on thermogenic proteins in ob/ob mice. Expression levels and statistics of BAT thermogenic protein in ob/ob mice. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 8$). [#] $P < 0.05$ vs. the Control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs. the ob/ob group.

3.4 小檗碱对 ob/ob 小鼠脂肪代谢基因的影响

血脂作为能量来源，对 BAT 产热是必需的^[17]。血脂水平的降低和 ob/ob 小鼠适应性产热的升高提示我们对脂肪代谢基因进行测定。RT-PCR 结果显示，与模型组相比，小檗碱处理后 ob/ob 小鼠棕色脂肪中中链酰基辅酶 A 脱氢酶 (long-chain acyl-CoA dehydrogenases, LCAD) 和中链酰基辅酶 A 脱氢酶 (Medium-chain acyl-CoA dehydrogenases, MCAD) 等脂肪酸氧化的基因表达水平上升 (Figure 4-12A)。除此之外，脂肪分解代谢相关乙酰辅酶 A 羧化酶 (Acetyl-CoA carboxylase α , Acaca) 和肉碱棕榈酰转移酶 1A (Carnitine Palmitoyltransferase 1A, CPT1A) 等基因水平上升 (Figure 4-12B)。这些结果说明小檗碱处理改善了 ob/ob 肥胖小鼠脂质代谢障碍，提高了棕色脂肪的脂质代谢能力。

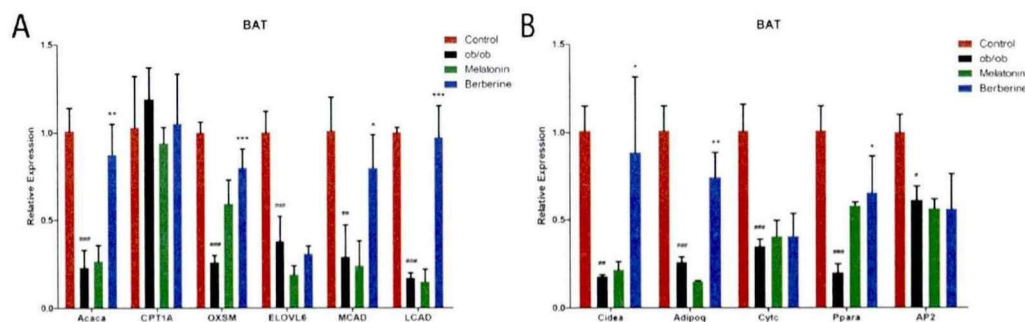


Figure 4-12 Effects of berberine on fat metabolism genes in ob/ob mice. (A, B) After 8 weeks of treatment, the expression levels of the mitochondrial fatty acid oxidation gene in mice. Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 8). $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$ vs. the Control group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs. the ob/ob group.

3.5 小檗碱对 ob/ob 小鼠 *Trib1* 和线粒体功能基因的影响

Amar Bahadur Singh 等人发现小檗碱处理显著增加 *Trib1* 的 mRNA 表达，并通过上调肝脏 LDLR 的机制降低小鼠血脂水平^[12]。而我们前面的研究发现 TRIB1 可以通过影响线粒体功能影响棕色脂肪产热，因此我们对小檗碱处理后棕色脂肪的变化进行观察。结果显示，小檗碱处理使棕色脂肪中 *Trib1* 的基因水平升高（Figure 4-13A）。除此之外，与 ob/ob 肥胖模型小鼠相比，小檗碱处理使线粒体呼吸链复合物 I, II和IV和线粒体拷贝数的基因表达水平明显提高（Figure 4-13B），提示我们小檗碱处理改善了棕色脂肪线粒体功能。

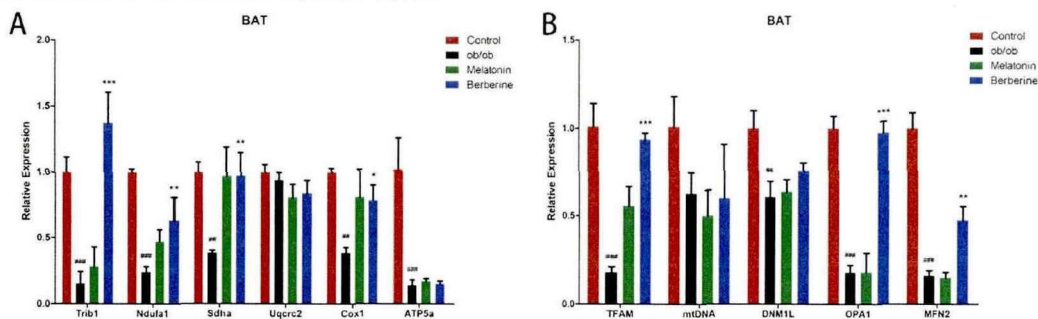


Figure 4-13 Effects of berberine on *Trib1* and mitochondrial function genes in ob/ob mice. After berberine treatment for 8 weeks, (A) expression levels of *Trib1* and mitochondrial respiratory chain genes in brown adipose tissue. (B) Expression levels of mitochondrial copy number and mitochondrial dynamics-related genes in BAT. Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 8). $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$ vs. the Control group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs. the ob/ob group.

3.6 小檗碱对 ob/ob 小鼠 TRIB1 和线粒体功能蛋白的影响

本研究也对线粒体复合物和线粒体动力学相关蛋白进行测定。结果显示小檗碱处理使棕色脂肪中 TRIB1 和线粒体复合物I, II和IV蛋白水平都增加，且提高了线粒体生物发生相关蛋白 PPAR- γ 和线粒体内膜融合蛋白 OPA1 的表达水平。

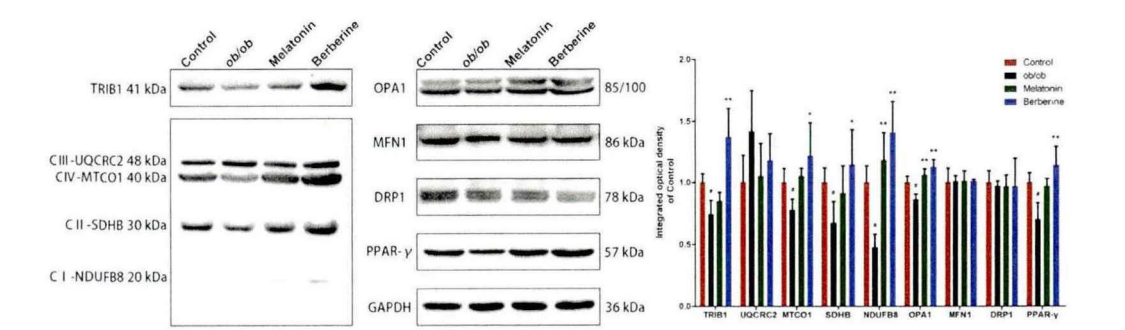


Figure 4-14 Effects of berberine on TRIB1 and mitochondrial functional proteins in ob/ob mice. TRIB1, respiratory chain complex, mitochondrial dynamics, and mitochondrial functional gene and protein levels in brown adipose tissue after berberine treatment. Data are presented as mean ± SD (n = 8). #*P* < 0.05 vs. the Control group; **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs. the ob/ob group.

4 小结

通过动物代谢分析系统和寒冷环境肛温测定实验，发现小檗碱处理可以提高 ob/ob 小鼠的呼吸代谢水平和产热能力。进一步 RT-PCR 和 Western blot 结果说明，小檗碱提高 ob/ob 小鼠 BAT 脂肪酸氧化和分解代谢相关基因的表达，并提高小鼠 BAT 产热相关蛋白的表达水平。此外小檗碱处理使线粒体呼吸链复合物I，II和IV的表达水平明显提高，改善了棕色脂肪组织线粒体功能。这些结果说明小檗碱处理改善了 ob/ob 肥胖小鼠脂质代谢障碍，提高了棕色脂肪的脂质代谢能力。

第三节 Trib1 敲低对小檠碱调控能量代谢的影响

我们前面的研究结果表明，小檠碱提高 *ob/ob* 小鼠 BAT 中 *Trib1* 的表达水平，并提高小鼠 BAT 产热代谢相关蛋白和基因的表达水平。因此本研究在细胞水平上，通过 siRNA 干扰 3T3-L1 脂肪细胞中 *Trib1* 的表达水平，探究小檠碱功能与 *Trib1* 表达的关系。

1 实验材料

1.1 实验动物

6 周龄 *ob/ob* 和对照 *ob/ob*^(+/+) 小鼠（雄）购于江苏集萃药康生物科技有限公司，合格证号：202016589。所有动物实验程序均由中国医学科学院北京协和医学院动物伦理委员会批准（SLXD-20180706）。

1.2 实验试剂

与前期实验材料重复部分不再列举。

名称	厂家	货号
BODIPY 493/503	宏叶生物科技有限公司	GC42959
Trib1 siRNA	Thermo Scientific 公司	s102503/4

1.3 实验仪器

与前期实验仪器重复部分不再列举。

2 实验方法

2.1 敲低 Trib1 的 3T3-L1 脂肪细胞 Bodipy 染色

3T3-L1 细胞培养和转染步骤同第三章第三节实验方法 2.2，在分化过程中使用 5 μmol/L 的小檠碱处理。诱导分化 8 天细胞成熟后，用 PBS 配置 2 μmol/L 的 BODIPY 染色溶液。用 PBS 洗涤细胞三次，每孔加入 1 mL 的 BODIPY 染色溶液，37℃ 避光染色 30 min。回收染色液，避光保存。细胞使用 PBS 洗涤两次后，荧光显微镜观察。

2.2 Seahorse 能量代谢仪检测敲低 Trib1 的脂肪细胞呼吸代谢水平

同第三章第三节实验方法 2.5。

2.3 PCR 检测敲低 *Trib1* 的脂肪细胞脂肪合成分解基因的表达

同第一章第二节实验方法 2.2。

2.4 统计学分析

使用软件 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析，实验数据均采用 mean ± SD 表示。数据进行方差齐性检验，在两组间，采用双尾 T 检验（Two-tailed Student’s t-test）；多组间采用单因素方差分析（One-Way ANOVA），在组间差异有统计学意义后采用 Turkey 进行两两比较，当 $P<0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 *Trib1* 敲低对小檗碱处理的脂肪细胞脂滴的影响

在观察到小檗碱处理提高棕色脂肪组织中 *Trib1* 的蛋白和基因水平后，本研究对小檗碱和 *Trib1* 的关系进行探究。通过诱导 3T3-L1 脂肪细胞分化成熟并给与小檗碱处理，结果显示，与模型组相比小檗碱能明显减少脂肪细胞中的脂滴蓄积，而使用 siRNA 干扰 *Trib1* 后小檗碱减少脂滴的功能被抑制。

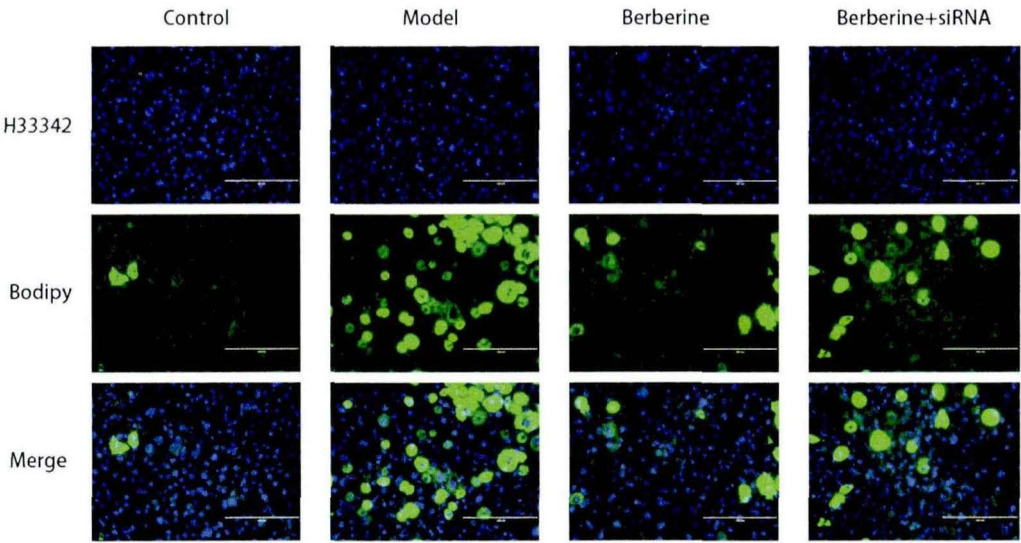


Figure 4-15 Effects of *Trib1* knockdown on lipid droplets in berberine-treated adipocytes. After berberine treatment and induced differentiation of 3T3-L1 cells, the H333342 and BODIPY lipid droplet staining results were obtained. Scale bar: 200 μm.

3.2 Trib1 敲低对小檗碱处理的脂肪细胞呼吸代谢水平的影响

进一步本研究采用 Seahorse 能量代谢仪测定细胞的呼吸代谢水平。三氟甲氧基羰基氰化物苯腙（Trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenylhydrazine, FCCP）加入后使线粒体呼吸链氧化和磷酸化解偶联，使线粒体不受底物影响进行代谢产热，测定数值代表线粒体最大呼吸代谢能力。结果显示，小檗碱提高脂肪细胞最大呼吸代谢水平，而干扰 Trib1 也能抑制小檗碱的功能。

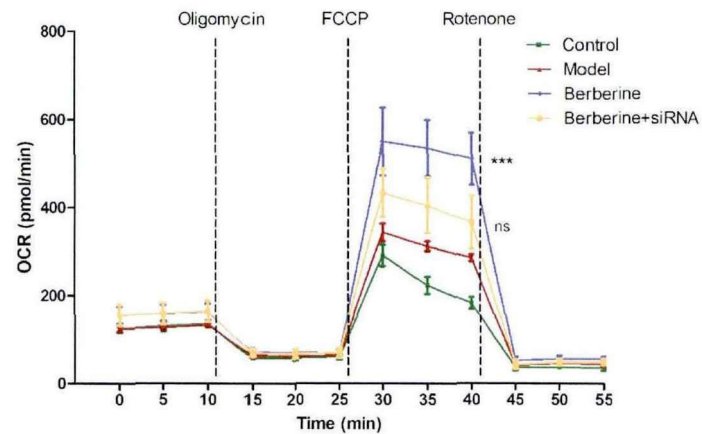


Figure 4-16 Effects of *Trib1* knockdown on respiratory metabolic levels in berberine-treated adipocytes. Measurement of cell respiratory metabolism level. Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 8). ### P < 0.001 vs. the Control group; *** P < 0.001 vs. the ob/ob group.

3.3 Trib1 敲低对小檗碱处理的脂肪细胞呼吸脂肪合成分解的影响

RT-PCR 结果显示，小檗碱可以提高脂肪甘油三酯脂肪酶(Adipose triglyceride lipase, ATGL)及激素敏感性脂肪酶(Hormone sensitive lipase, HSL)脂肪分解相关基因的表达，并促进脂肪代谢相关基因的表达，而这些功能是与 *Trib1* 的表达是相关的。

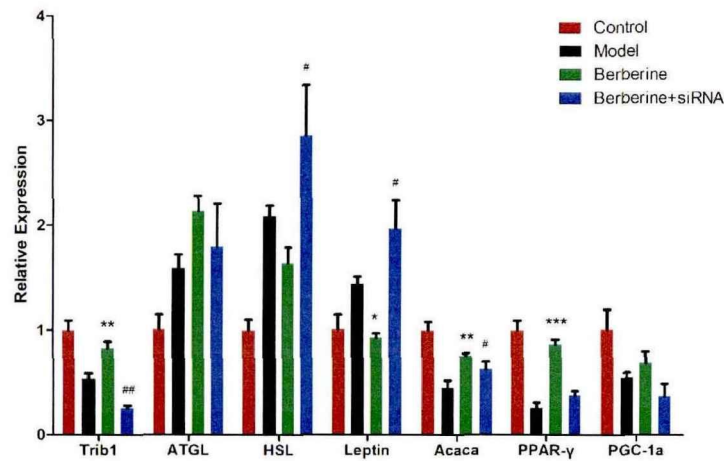


Figure 4-17 Effects of *Trib1* knockdown on berberine-treated adipocytes exhaled

lipolysis. Expression of genes related to lipolysis and lipo-metabolism. Data are presented as mean $\pm$ SD ($n = 8$). $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ vs. the Control group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs. the ob/ob group.

4 小结

通过 RT-PCT 和细胞呼吸代谢水平测定, 在 3T3-L1 细胞上对小檗碱与 *Trib1* 的关系进行探究。结果显示小檗碱处理能提高脂肪细胞 *Trib1* 和脂肪代谢相关基因的表达, 并减少脂质的蓄积提高细胞的呼吸代谢水平, 但加入 siRNA 敲低 *Trib1* 后, 小檗碱提高细胞呼吸代谢的作用被抑制。这些结果提示我们小檗碱抑制肥胖提高棕色脂肪细胞代谢水平的作用与 *Trib1* 相关。

讨论

为了探究小檗碱对棕色脂肪能量代谢的作用, 我们选用褪黑素作为阳性对照药物。褪黑素是松果体分泌的一种吲哚杂环类激素, 在调节昼夜节律中起主要作用, 目前关于褪黑素与能量代谢和肥胖的关系已有非常充分的研究。褪黑素调节能量平衡和抗肥胖的作用取决于多种机制。对幼年动物给与褪黑素补充疗法可以减少体重增加和内脏脂肪的沉积^[18], 对肥胖动物在饮用水中给与褪黑素治疗, 也表现出体重和内脏脂肪的显著减少。除此之外, 接受褪黑素治疗的大鼠显示核心体温升高, 表现出产热增大和能量消耗增加, 进一步研究发现褪黑素可以激活棕色脂肪组织中的营养和代谢并促进白色脂肪组织的棕色化^[19,20]。我们的结果显示阳性药褪黑素和小檗碱治疗后, 肥胖小鼠棕色脂肪细胞脂滴变小, 且明显减少脂质在肝细胞的堆积, 改善肝脏组织空泡。但褪黑素对肥胖小鼠的炎症水平和线粒体动力学无明显作用, 显示出与小檗碱不同的药物作用机理。

目前已有研究支持小檗碱在治疗非酒精性脂肪肝、肥胖症和糖尿病等代谢性疾病中的作用, 其中涉及到的主要分子靶标包括 LDLR、AMPK 和 PPAR 等^[10]。小檗碱还可以通过 C/EBP α 和 PPAR γ 途径抑制前脂肪细胞的增殖和脂质蓄积。C/EBP α 对于脂肪发育是至关重要的。C/EBP α 和 PPAR γ 通过共同作用, 在脂肪发生的最后阶段诱导脂肪特异性基因的表达, 建立成熟的脂肪细胞表型^[21]。有趣的是, *Trib1* 可以作为分子支架, 连接 C/EBP α 到 COP1 中以促进泛素化降解^[22], 从而调控肝脏脂肪生成和血脂水平^[23]。而 Amar Bahadur Singh 等人发现, 小檗碱降低 LDLR 缺陷小鼠的血浆甘油三酯水平并上调肝脏 TRIB1^[12], 提示我们小檗碱存在非 LDLR 依赖性的降血脂机制。我们的研究结果显示, 小檗碱的处理可以提高棕色脂肪组织中 *Trib1* 的表达, 并提高 BAT 脂质代谢水平和产热能力, 降低肥胖小鼠血脂水平。

AMPK 是细胞能量代谢的中心,由 AMPK 介导的脂肪甘油三酯脂肪酶(adipose triglyceride lipase, ATGL)表达增加被认为是小檗碱减肥的主要作用机制^[24]。有人提出小檗碱的药理作用与二甲双胍相似,通过抑制线粒体呼吸链复合物I活性,调节 AMP/ATP 的比例以促进 AMPK 的激活^[25,26]。而线粒体呼吸链活性缺陷将诱导二型糖尿病中胰岛素抵抗和高血糖的发展^[27,28],因此小檗碱对线粒体呼吸链的具体作用是个很有趣的问题。我们采用 100mg/kg 的剂量给与 *ob/ob* 小鼠,发现小檗碱增加小鼠产热,在 3T3-L1 细胞中 2.5 μ M 的小檗碱使细胞呼吸代谢水平上升。同样的有研究发现,小檗碱可以促进白色脂肪的棕色化和棕色脂肪的激活,提高人类和小鼠的代谢和产热水平治疗肥胖。其中小檗碱在下丘脑会抑制 AMPK 活性,但依然可以诱导产热使小鼠体重减轻^[11,29],因此可以说明小檗碱治疗肥胖的作用并非 AMPK 依赖性的。除此之外,我们发现文献报道 12.5 μ M、25 μ M 和 50 μ M 的小檗碱可以剂量依赖性的抑制线粒体复合物I活性,从而降低细胞的 ATP 和代谢水平,该浓度与提高 3T3-L1 细胞代谢的药物浓度相差 5-20 倍。有研究发现二甲双胍对线粒体复合物和线粒体功能的调节与浓度相关^[30],这也提示我们小檗碱的处理浓度可能是线粒体表现出不同反应的原因,但仍待进一步的实验探究。

总体而言,我们的研究结果表明,小檗碱可以提高棕色脂肪的代谢和产热能力抑制肥胖,而这些益处在于干扰 *Trib1* 后被抑制。这提示我们小檗碱的作用机制可能是多途径的,这为小檗碱治疗复杂疾病,如肥胖和糖尿病等代谢疾病提供了基础。

结论

小檗碱处理 *ob/ob* 自发性肥胖小鼠 8 周可以降低小鼠的体重和血脂水平,减少脂质在肝脏的堆积并提高棕色脂肪的产热能力,这与 *Trib1* 的表达呈正相关。本研究表明,小檗碱可以提高 *ob/ob* 小鼠棕色脂肪中 *Trib1* 和线粒体呼吸链复合物I, II 和III的表达水平,并增加线粒体拷贝数和线粒体脂肪酸氧化相关基因的表达水平,提高了肥胖小鼠棕色脂肪的线粒体功能。而在 3T3-L1 脂肪细胞中加入 siRNA 干扰 *Trib1* 的表达后,小檗碱减少脂滴和增加细胞呼吸代谢的能力受到抑制。这些研究结果表明,小檗碱通过促进 *Trib1* 的表达提高棕色脂肪细胞代谢水平,进而抑制肥胖。

参考文献

- [1] YUE S J, LIU J, WANG W X, et al. Berberine treatment-emergent mild diarrhea associated with gut microbiota dysbiosis [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 116: 109002.
- [2] QIN S, TANG H, LI W, et al. AMPK and its Activator Berberine in the Treatment of Neurodegenerative Diseases [J]. Curr Pharm Des, 2020, 26(39): 5054-66.

- [3] RAUF A, ABU-IZNEID T, KHALIL A A, et al. Berberine as a Potential Anticancer Agent: A Comprehensive Review [J]. *Molecules*, 2021, 26(23).
- [4] FATAHIAN A, HAFTCHESHMEH S M, AZHDARI S, et al. Promising Anti-atherosclerotic Effect of Berberine: Evidence from In Vitro, In Vivo, and Clinical Studies [J]. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 2020, 178: 83-110.
- [5] LIU D Q, CHEN S P, SUN J, et al. Berberine protects against ischemia-reperfusion injury: A review of evidence from animal models and clinical studies [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 148: 104385.
- [6] FENG X, SUREDA A, JAFARI S, et al. Berberine in Cardiovascular and Metabolic Diseases: From Mechanisms to Therapeutics [J]. *Theranostics*, 2019, 9(7): 1923-51.
- [7] KONG W, WEI J, ABIDI P, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins [J]. *Nat Med*, 2004, 10(12): 1344-51.
- [8] HABTEMARIAM S. The Quest to Enhance the Efficacy of Berberine for Type-2 Diabetes and Associated Diseases: Physicochemical Modification Approaches [J]. *Biomedicines*, 2020, 8(4).
- [9] ZHANG L, WU X, YANG R, et al. Effects of Berberine on the Gastrointestinal Microbiota [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 588517.
- [10] XU X, YI H, WU J, et al. Therapeutic effect of berberine on metabolic diseases: Both pharmacological data and clinical evidence [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 110984.
- [11] ZHANG Z, ZHANG H, LI B, et al. Berberine activates thermogenesis in white and brown adipose tissue [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5493.
- [12] SINGH A B, LIU J. Berberine decreases plasma triglyceride levels and upregulates hepatic TRIB1 in LDLR wild type mice and in LDLR deficient mice [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 15641.
- [13] SURIANO F, VIEIRA-SILVA S, FALONY G, et al. Novel insights into the genetically obese (ob/ob) and diabetic (db/db) mice: two sides of the same coin [J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 147.
- [14] WAGNER M, SAMDAL STEINSKOG E S, WIIG H. Adipose tissue macrophages: the inflammatory link between obesity and cancer? [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2015, 19(4): 527-38.
- [15] BOUTENS L, HOOVELD G J, DHINGRA S, et al. Unique metabolic activation of adipose tissue macrophages in obesity promotes inflammatory responses [J].

Diabetologia, 2018, 61(4): 942-53.

[16]LYNES M D, LEIRIA L O, LUNDH M, et al. The cold-induced lipokine 12,13-diHOME promotes fatty acid transport into brown adipose tissue [J]. Nat Med, 2017, 23(5): 631-7.

[17]WADE G, MCGAHEE A, NTAMBI J M, et al. Lipid Transport in Brown Adipocyte Thermogenesis [J]. Front Physiol, 2021, 12: 787535.

[18]TAN D X, MANCHESTER L C, FUENTES-BROTO L, et al. Significance and application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism: relation to human obesity [J]. Obes Rev, 2011, 12(3): 167-88.

[19]JIMENEZ-ARANDA A, FERNANDEZ-VAZQUEZ G, CAMPOS D, et al. Melatonin induces browning of inguinal white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats [J]. J Pineal Res, 2013, 55(4): 416-23.

[20]HELDMAIER G, HOFFMANN K. Melatonin stimulates growth of brown adipose tissue [J]. Nature, 1974, 247(5438): 224-5.

[21]MOSETI D, REGASSA A, KIM W K. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(1).

[22]JAMIESON S A, RUAN Z, BURGESS A E, et al. Substrate binding allosterically relieves autoinhibition of the pseudokinase TRIB1 [J]. Sci Signal, 2018, 11(549).

[23]ISHIZUKA Y, NAKAYAMA K, OGAWA A, et al. TRIB1 downregulates hepatic lipogenesis and glycogenesis via multiple molecular interactions [J]. J Mol Endocrinol, 2014, 52(2): 145-58.

[24]ZHU X, BIAN H, WANG L, et al. Berberine attenuates nonalcoholic hepatic steatosis through the AMPK-SREBP-1c-SCD1 pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 141: 192-204.

[25]TURNER N, LI J Y, GOSBY A, et al. Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action [J]. Diabetes, 2008, 57(5): 1414-8.

[26]HOU W L, YIN J, ALIMUJIANG M, et al. Inhibition of mitochondrial complex I improves glucose metabolism independently of AMPK activation [J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(2): 1316-28.

[27]MADAMANCHI N R, RUNGE M S. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis [J]. Circ Res, 2007, 100(4): 460-73.

[28]XU D, JIANG Z, SUN Z, et al. Mitochondrial dysfunction and inhibition of

myoblast differentiation in mice with high-fat-diet-induced pre-diabetes [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 7510-23.

[29] WU L, XIA M, DUAN Y, et al. Berberine promotes the recruitment and activation of brown adipose tissue in mice and humans [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 468.

[30] WANG Y, AN H, LIU T, et al. Metformin Improves Mitochondrial Respiratory Activity through Activation of AMPK [J]. Cell Rep, 2019, 29(6): 1511-23 e5.

讨论

本研究通过 RNA-Sequencing 对 db/db 小鼠心肌组织进行测序, 筛选调控脂质代谢抑制肥胖的新靶点。在 40 个共同差异基因中, *Trib1* 同时参与多种炎症反应和血脂水平调控。值得注意的是, TRIB1 通过与 COP1 直接相互作用参与 C/EBP α 的泛素化, 从而影响小鼠脾脏、骨髓和其他器官中 M2 型巨噬细胞的极化^[1]。而慢性炎症反应是肥胖的核心特征, 在肥胖动物中 M1/M2 型巨噬细胞的平衡被破坏, 细胞极化状态由抗炎的 M2 型转化为促炎的 M1 型巨噬细胞, 导致炎症反应与全身胰岛素抵抗^[2]。这提示着 *Trib1* 可能通过调节 M2 型巨噬细胞参与肥胖相关的炎症反应。

进一步的, 有研究发现 *Trib1* 在白色脂肪组织的急性和慢性炎症中升高。该研究采用了 *Trib1* 单倍体不足小鼠 (*Trib1* 杂合敲除小鼠), 并给与小鼠高脂饮食喂养。结果显示 *Trib1* 敲除抑制了高脂饮食诱导的促炎因子表达, *Trib1* 单倍体不足可防止高脂饮食诱导的肥胖^[3]。但本研究结果显示, 喂食正常饮食和高脂饮食的野生型和 *Trib1* 单倍体不足小鼠之间的体重或体脂没有显著差异 (见附录三)。在 8 周龄的 *Trib1* 敲除小鼠中, 血清炎症因子反而显著上升, 表明 *Trib1* 敲除诱导了小鼠的炎症反应, 也表现出高脂血症和肥胖。这与先前的研究一致, 该研究表明造血细胞中缺乏 *Trib1* 的小鼠表现出更高的促炎细胞因子基因表达^[1]。

线粒体是一个高度动态的细胞器, 它的功能由线粒体动力学维持^[4,5]。研究发现氧化磷酸化与线粒体动力学关系密切。线粒体复合物酶活性的抑制, 可以通过调节 ATP 水平, 影响融合分裂蛋白的加工和水解, 进而调控线粒体动力学^[6-8]。在本研究中发现 TRIB1 与线粒体呼吸链复合物 III 亚基 UQCRC2 结合, 并且 *Trib1* 敲除降低了线粒体呼吸链复合物 III 的酶活性和脂肪组织 ATP 水平, 导致线粒体动力学失衡和线粒体功能障碍, 最终 *Trib1* 敲除小鼠表现出棕色脂肪产热降低和脂质代谢异常。同样, Tomašić 等人发现编码线粒体呼吸链复合物 III 的基因 BCS1L 的突变可以诱导肝脏脂肪的积累^[9]。此外, 本研究发现在 3T3-L1 脂肪细胞中过表达 *Trib1* 显著提高细胞基础呼吸代谢水平, 而加入线粒体呼吸链复合物 III 的抑制剂后, 细胞呼吸代谢降低。有研究发现, UQCRC1 过表达可以加快复合物 III 的催化速率, 提高细胞内线粒体的呼吸能力^[10]。染色质免疫沉淀测定表明, TRIB1 可以与 3T3-L1 脂肪细胞中的染色质结合, 这表明 TRIB1 是一种潜在的转录调节因子。然而, TRIB1 对 UQCRC2 的具体调控作用需要进一步研究。此外, 小鼠 BAT 中 *Trib1* 的特异性过表达是否可以通过增强线粒体功能来增强产热和预防肥胖, 仍需进一步研究。

有研究发现小檗碱可以通过提高小鼠肝脏 LDLR 和 TRIB1 的蛋白表达, 从而降低小鼠血清甘油三酯水平^[11]。在我们前面的研究中已经明确 *Trib1* 调控棕色脂肪脂质代谢和产热功能, 但对于小檗碱在 BAT 能量代谢中的作用是否与 *Trib1* 有关仍需探究。因此通过灌胃给与 ob/ob 小鼠小檗碱 8 周后, 对其体重、体脂和代谢表型进

行测定。观察到小檗碱显著降低 ob/ob 小鼠体重并提高代谢水平后, 采用 siRNA 敲低脂肪细胞中的 *Trib1*, 检测 *Trib1* 敲低对小檗碱调控能量代谢的影响。证明 *Trib1* 调节 ob/ob 小鼠棕色脂肪能量代谢的功能, 是小檗碱提高 BAT 产热抑制肥胖的新靶点。

总之, 本研究结果表明 *Trib1* 是调节小鼠棕色脂肪细胞代谢产热和线粒体功能的重要靶点, 也作为小檗碱调节棕色脂肪功能抑制肥胖的新机制, 有望成为治疗高脂血症、脂肪肝和肥胖等脂质代谢疾病的新靶点。

参考文献

- [1] SATOH T, KIDOYA H, NAITO H, et al. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages [J]. *Nature*, 2013, 495(7442): 524-8.
- [2] SUN K, KUSMINSKI C M, SCHERER P E. Adipose tissue remodeling and obesity [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(6): 2094-101.
- [3] OSTERTAG A, JONES A, ROSE A J, et al. Control of adipose tissue inflammation through TRB1 [J]. *Diabetes*, 2010, 59(8): 1991-2000.
- [4] KALINKOVICH A, LIVSHITS G. Sarcopenic obesity or obese sarcopenia: A cross talk between age-associated adipose tissue and skeletal muscle inflammation as a main mechanism of the pathogenesis [J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 35: 200-21.
- [5] YAU W W, SINGH B K, LESMANA R, et al. Thyroid hormone (T3) stimulates brown adipose tissue activation via mitochondrial biogenesis and MTOR-mediated mitophagy [J]. *Autophagy*, 2019, 15(1): 131-50.
- [6] BOUTANT M, KULKARNI S S, JOFFRAUD M, et al. Mfn2 is critical for brown adipose tissue thermogenic function [J]. *EMBO J*, 2017, 36(11): 1543-58.
- [7] FAVARO G, ROMANELLO V, VARANITA T, et al. DRP1-mediated mitochondrial shape controls calcium homeostasis and muscle mass [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 2576.
- [8] TEZZE C, ROMANELLO V, DESBATS M A, et al. Age-Associated Loss of OPA1 in Muscle Impacts Muscle Mass, Metabolic Homeostasis, Systemic Inflammation, and Epithelial Senescence [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(6): 1374-89 e6.
- [9] TOMASIC N, KOTARSKY H, DE OLIVEIRA FIGUEIREDO R, et al. Fasting reveals largely intact systemic lipid mobilization mechanisms in respiratory chain complex III deficient mice [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(1): 165573.
- [10] WANG Q, LI M, GAN Y, et al. Mitochondrial Protein UQCRC1 is Oncogenic and a

Potential Therapeutic Target for Pancreatic Cancer [J]. *Theranostics*, 2020, 10(5): 2141-57.

[11] SINGH A B, LIU J. Berberine decreases plasma triglyceride levels and upregulates hepatic TRIB1 in LDLR wild type mice and in LDLR deficient mice [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 15641.

结语与展望

本研究利用不同月龄的自发性肥胖小鼠、C57BL/6J 小鼠和 3T3-L1 脂肪细胞,通过 RNA-Sequencing 和 RT-PCR 探究 *Trib1* 的表达变化,并明确 *Trib1* 在脂肪分化和脂质代谢中的作用。结果发现,*Trib1* 除了调节血脂和肝脏脂质外,还可以直接参与脂肪组织功能,影响脂肪组织的脂质代谢能力。我们进一步建立 *Trib1* 敲除小鼠并对其表型进行测定,结果显示 *Trib1* 敲除小鼠血脂水平上升,棕色脂肪细胞脂滴增大和 UCP1 表达降低,并伴随着瘦素和胰岛素抵抗,提示我们 *Trib1* 对棕色脂肪功能具有调控作用。利用 β_3 -肾上腺素受体激动剂处理 *Trib1* 敲除小鼠,结果表明 *Trib1* 敲除损害棕色脂肪的脂质代谢和产热功能,这是 *Trib1* 敲除使小鼠棕色脂肪线粒体肿胀,线粒体膜结构破坏导致的。

为阐明 *Trib1* 敲除使小鼠线粒体结构损伤的原因,本研究利用原核质粒构建 TRIB1-GST 融合蛋白进行 Pull down 实验,并对 *Trib1* 敲除小鼠和野生型小鼠棕色脂肪组织进行 RNA-Sequencing,检测 *Trib1* 调控棕色脂肪功能的关键分子。结果表明 *Trib1* 通过呼吸链复合物调控线粒体功能。我们在 3T3-L1 前脂肪细胞中对 *Trib1* 靶点进行验证。通过真核质粒在 3T3-L1 脂肪细胞上过表达 *Trib1*,利用 RNA-Sequencing,细胞油红染色, Mitotracker 线粒体染色和 Seahorse 能量代谢仪检测验证 *Trib1* 调控棕色脂肪功能的靶点和机制。

在确定 *Trib1* 调节小鼠线粒体和棕色脂肪细胞的功能后,本研究通过灌胃给与 ob/ob 小鼠小檗碱,并利用 siRNA 在 3T3-L1 脂肪细胞中干扰 *Trib1* 的表达,从体内外两方面验证小檗碱提高棕色脂肪功能治疗肥胖的分子机制。结果表明小檗碱处理可以提高 ob/ob 小鼠棕色脂肪中 *Trib1* 和线粒体呼吸链复合物 I, II 和 III 的表达水平,增加线粒体拷贝数和线粒体脂肪酸氧化相关基因的表达水平,提高了肥胖小鼠棕色脂肪的线粒体功能。在 3T3-L1 脂肪细胞中加入 siRNA 干扰 *Trib1* 的表达后,小檗碱减少脂滴和增加细胞呼吸代谢的能力受到抑制。这些研究结果表明,小檗碱通过提高 *Trib1* 的表达促进棕色脂肪细胞代谢抑制肥胖。

本课题从体内外两方面探明 *Trib1* 对棕色脂肪组织能量代谢的调控作用,并阐明小檗碱提高棕色脂肪功能治疗肥胖的分子机制,为代谢性疾病的治疗提供科学依据。

但本研究仍存在一些不足之处,虽然通过 Pull down 实验在体外确定了 TRIB1 与线粒体复合物 III 亚基 UQCRC2 结合,但缺少体内结合验证和蛋白共定位实验,对 TRIB1 和 UQCRC2 的结合方式仍需进一步探究。此外,虽然我们在 3T3-L1 脂肪细胞对 *Trib1* 进行过表达验证了 *Trib1* 提高脂肪细胞呼吸代谢的作用,但 *Trib1* 对棕色脂肪经典产热通路和脂肪因子分泌的影响还需在脂肪特异性过表达小鼠上进行。

创新点

- 1、本研究通过体内外多种模型证实了 *Trib1* 调控棕色脂肪组织代谢产热的作用，为治疗高血脂、肥胖和脂肪等代谢性疾病提供了新靶点。
- 2、本研究证明 *Trib1* 敲除通过影响电子呼吸链酶活性破坏了线粒体动力学稳态，进而导致线粒体结构损伤和功能障碍。阐明 *Trib1* 调控线粒体结构和功能的作用。
- 3、首次证明了小檗碱通过提高脂肪细胞 *Trib1* 和脂肪代谢相关基因的表达，减少脂质的蓄积提高细胞的呼吸代谢水平。

文献综述一

TRIB1 在脂质代谢中的作用：从疾病到通路

摘要：

Tribbles homolog 1 (*Trib1*) 是 Tribbles 假蛋白激酶家族的成员，广泛表达于多种组织中，例如骨髓、骨骼肌、肝脏、心脏和脂肪组织。*Trib1* 可作为分子支架干扰细胞周期，促进肿瘤细胞增殖，抑制细胞凋亡。最近，全基因组关联分析发现 *Trib1* 与血脂水平密切相关。*Trib1* 可以通过调控血脂水平、炎症反应和儿茶酚胺抵抗等参与代谢性疾病的发展。鉴于 *Trib1* 的重要生物学功能，迄今为止发表的评论还不够全面。因此，本文回顾了 *Trib1* 研究的进展，旨在探索其在脂肪代谢性疾病中的作用。

关键词：TRIB1，假激酶家族，急性髓系白血病，心血管疾病

Abstract: Tribbles homolog 1 (*Trib1*) is a member of the Tribbles pseudoprotein kinase family and is widely expressed in various tissues, such as bone marrow, skeletal muscle, liver, heart and adipose tissue. *Trib1* can act as a molecular scaffold to interfere with the cell cycle, promote tumor cell proliferation, and inhibit apoptosis. Recently, genome-wide association analysis found that *Trib1* was associated with all circulating lipid levels. *Trib1* can participate in the development of metabolic diseases by regulating blood lipid levels, inflammatory response and catecholamine resistance. Given the important biological functions of *Trib1*, the reviews published to date are not comprehensive enough. Therefore, this article reviews the progress of *Trib1* research, aiming to explore its role in fat metabolism diseases.

Keywords: *Trib1*, pseudokinase family, acute myeloid leukemia, prostate cancer, tumor drug resistance, cardiovascular disease

经基因组测序证实，几乎所有酶家族都包括假激酶同系物。在人类激酶组中约有 10% 的激酶因缺乏必需催化基团，被命名为假激酶^[1]。Val-Ala-Ile-Lys (VAIK) 是激酶催化核心基序，假激酶蛋白缺失一个或多个催化基序，因此不具有或者只有较低的激酶活性^[2]。但假激酶仍在各种细胞过程中起着关键作用。目前的研究将假激酶功能主要分为四类^[3-6]：(1) 变构激活剂。假酶的变构结合可以正向或负向调节相关蛋白的催化活性。(2) 竞争性抑制剂。假酶缺乏催化基序，但可以高亲和力结合

底物以拮抗活性激酶，或隔离底物免受酶促水解或去磷酸化。(3) 蛋白质复合物组装分子支架。作为蛋白质相互作用域，假酶可以使蛋白质复合物组装成核，促使酶和底物靠近，或调节特定运输途径或细胞器中的蛋白质定位等。(4) 蛋白质开关。假酶结构域可以作为翻译后修饰的受体，例如泛素化、磷酸化或水解，这可以促进构象转换诱导下游效应器功能。

Tribbles 是一个假性蛋白激酶家族，是人类 CAMK 亚家族激酶 (Ca^{2+} /calmodulin-activated protein kinase) 的分支，有三个同源蛋白序列，包括 TRIB1、TRIB2 和 TRIB3^[2]。由序列分类学得出，TRIB2 基因序列是 Tribbles 家族中最原始的序列。TRIB2 的直系同源物可以追溯到最古老的后生动物，如刺胞动物和海绵，而 TRIB1 和 TRIB3 直系同源物仅限于后来的后生动物谱系^[7]。虽然蛋白起源时间不同，但 Tribbles 蛋白家族都由三个独立的结构域组成，一个富含 PEST 序列的非结构化 N 端结构域、一个中央保守的假激酶结构域和一个 C 末端^[8-10]。Tribbles 家族相似的 C 末端可结合 COP1 泛素连接酶，作为分子支架与 C/EBP 底物之间形成三元复合物，从而调节肿瘤相关转录因子 C/EBPs 的泛素化降解^[10]。更广泛地说，Tribbles 蛋白家族包含额外的保守序列基序，允许它们调节 MAPK 和 AKT 等信号通路的传导，参与癌症、炎症、代谢和神经系统疾病等^[11]。

人类 *Trib1* 基因位于 8 号染色体 q24 区域，氨基酸序列高度保守，在人和小鼠之间序列同源性达 97.5%。TRIB1 蛋白在多种器官组织如心、肝、脾、脂肪和骨髓中广泛表达，且具有重要的调节功能。*Trib1* 基因和 MYC 原癌基因位于同一基因座，8q24 基因座在几种癌症类型中被扩增，它与多种癌症的关系已有报道^[12]。研究发现 *Trib1* 的过表达通过增加 MEK1/ERK 活性^[13]，促进急性髓性白血病的发展。在三阴性乳腺癌中，*Trib1* 的敲低使 NF- κ B 活性和 AKT1 的磷酸化受到抑制，增加癌细胞对凋亡信号的敏感性^[14]。在结直肠癌中，*Trib1* 通过激活 FAK/Src 和 ERK 通路促进细胞迁移和侵袭^[15]。除此之外，*Trib1* 还通过 C/EBPs、FOXP3 蛋白影响巨噬细胞和调节性 T 细胞的功能^[16]。

之前已有文献对 Tribbles 家族在肿瘤和免疫方面的发展做出综述，但单独关于 TRIB1 蛋白在炎症，心血管疾病和脂代谢方面的综述仍有欠缺。因此我们将回顾总结 *Trib1* 实验研究取得的最新进展，并通过概述它们在脂质代谢相关疾病中的生物学意义，为疾病治疗提供新的策略。

1. *Trib1* 与高血脂症

1.1 全基因组关联分析

在超过 8000 例个体的全基因组关联分析 (Genome-wide association analysis,

GWAS) 发布数据^[17, 18], 在过去十年中, 超过 175 个基因位点与血清 TG、CHO、LDL 和 HDL 水平密切相关。其中大多数基因特异相关于一种或两种脂质, 而一些基因, 如 *Sugpl*, *Zpr1*, *Trib1*, *Herpud1* 和 *Fads1* 与所有血脂水平相关^[19]。在 2013 年进一步的研究中, 使用全基因组和定制基因分型阵列检查了 188577 例个体^[20]。研究确定了 157 个与血脂水平相关的基因座, 其中仅有 *Cetp*, *Trib1*, *Fads1* 和 *Apoa1* 四个基因座与所有脂质性状相关, 且在这四个基因座中, 只有两个 *Trib1* 和 *Apoa1* 基因座与冠状动脉疾病相关。

除了血浆脂质特征外, GWAS 发现 *Trib1* 基因座还与脂联素^[21], ALT^[22]和糖化血红蛋白^[23]相关。脂联素是由脂肪组织分泌的脂肪因子, 主要靶向肝脏和骨骼肌发挥胰岛素增敏剂作用。进一步的研究已将脂联素与肝脏脂肪含量^[24]和血脂水平^[25]联系起来, 并降低动脉粥样硬化的风险^[26]。最新研究发现 *Trib1* 脂肪特异性敲除小鼠的代谢表型得到改善, 血浆脂联素水平升高, 血浆脂质降低。且 *Trib1* 调节脂联素的分泌, 与已知的蛋白酶体调控方式无关^[27]。另外还有研究发现, 小鼠肝脏中 *Trib1* 的特异性敲除会导致肝脏脂肪变性和 ALT 升高^[28]。这些研究证实了 GWAS 数据与体内的遗传关联, 但 *Trib1* 影响血脂的机制仍待体内的进一步探明。

1.2 昼夜节律

近来研究发现, 昼夜节律紊乱或缺乏昼夜节律基因的小鼠表现出甘油三酯和胆固醇代谢改变, 并发展为糖尿病, 肥胖和代谢综合征, 这些研究表明睡眠稳态在脂质代谢调节中起重要作用^[29, 30]。虽然 *Trib1* 在小鼠中表现出的昼夜节律性较弱, 但有研究发现, 在睡眠限制后 *Trib1* 的表达对睡眠稳态的恢复起到了重要的作用。明暗节律的紊乱会破坏 PCSK9/LDL 受体调节轴, 肝脏 BMAL1 节律基因紊乱的高脂血症模型中, 腺病毒介导的 *Trib1* 过表达可以恢复血浆 PCSK9 水平, 增加 LDL 受体蛋白表达, 并恢复缺乏 BMAL1 肝脏时钟基因的小鼠血浆胆固醇稳态^[31]。有研究发现 COP1 是一种高度保守的 E3 泛素连接酶, 可在细胞核和细胞质之间穿梭。在植物中, COP1 定位受光控制, 表现出明暗节律^[32]。我们已知 TRIB1 蛋白 C 末端可结合 COP1 泛素连接酶, 作为分子支架参与蛋白的调节^[33]。而在哺乳动物中, *Trib1* 可以模拟光对植物中 COP1 定位的调控。*Trib1* 通过破坏 COP1 内的分子内相互作用来阻断 COP1 的核输出^[34]。这可能与 *Trib1* 恢复睡眠稳态, 调节昼夜节律紊乱带来的高脂血症相关, 但其原理仍待探究。

2. *Trib1* 与脂肪肝

肥胖症中脂肪组织的快速扩张会导致炎症和纤维化反应, 降低脂肪组织的脂质

储存能力。当脂肪组织达到储存极限时,脂肪组织对脂肪酸的摄取和储存减少,过量的游离脂肪酸会通过门静脉系统堆积在肝脏,主要以甘油三酯的形式造成脂肪在肝脏组织的异位堆积^[35,36]。在血浆脂质 GWAS 中鉴定出 *Trib1* 与所有血脂指标相关后,有研究立即在体内证实这种关联。通过腺病毒在小鼠肝脏特异性过表达 *Trib1*,结果显示过表达 *Trib1* 使血浆胆固醇和 TG 水平降低,并减少肝脏极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)的合成和分泌^[37]。同样的,在人原代肝细胞中敲除 *Trib1* 可导致甘油三酯转运蛋白和 APOB 的表达降低。APOB 蛋白是 VLDL 和 LDL 的主要载脂蛋白成分, *Trib1* 通过控制小鼠脂质转运蛋白代谢的作用影响血脂水平^[38]。

除此之外, *Trib1* 还与肝脏脂肪的从头合成。碳水化合物反应元件结合蛋白(carbohydrate response element binding protein, ChREBP)是一种葡萄糖敏感分子,参与肝脂异生。*Trib1* 的过表达可以下调 ChREBP 的 mRNA 和蛋白水平从而影响脂肪生成^[39]。另外,肝脏特异性敲除 *Trib1* 的小鼠肝脏中脂肪合成基因表达增加,导致肝脏脂肪变性和急性肝损伤指标升高。且 *Trib1* 肝脏特异性敲除小鼠 C/EBP α 蛋白表达升高,从而促进脂肪在肝细胞的生成和累积,增加 VLDL 生成。值得注意的是,虽然用腺病毒过表达 C/EBP α 治疗的野生型小鼠增加了肝脏脂肪的从头生成和脂肪变性,但它们的血浆脂质水平并未升高^[28,40]。因此 *Trib1* 升高血脂的作用可能是独立于 C/EBP α 影响的脂肪生成的, *Trib1* 影响血脂的机制仍待进一步探究。

3. *Trib1* 与肥胖

3.1 巨噬细胞和炎症反应

Trib1 在巨噬细胞极化中的关键作用已被报道。研究发现 *Trib1* 通过募集 COP1 泛素连接酶,介导 C/EBP α 的降解,从而影响 M2 型巨噬细胞的分化^[41]。*Trib1* 还参与 TOLL 样受体介导的巨噬细胞信号传导,影响巨噬细胞功能^[42]。另外, *Trib1* 通过 JAK/STAT 信号通路调控 M1 和 M2 型巨噬细胞极化^[43]。但值得注意的是, Takashi Satoh 等人还将 *Trib1* 在 M2 型巨噬细胞分化中的作用扩展到脂肪组织。造血细胞中敲除 *Trib1* 的小鼠脂肪组织中 M2 型巨噬细胞数量减少,伴随着脂肪组织质量减少,脂肪分解增,并表现出高 TG 血症和胰岛素抵抗,同时促炎细胞因子增加^[41]。促炎性巨噬细胞的募集是肥胖的核心特征,研究发现减轻巨噬细胞炎症或促进 M2 巨噬细胞分化的药物,可以抑制脂肪炎症和肥胖的全身并发症^[44,45]。另有文献报道, *Trib1* 的表达在小鼠 WAT 的急性和慢性炎症期间被特异性上调, *Trib1* 的敲除会降低白色脂肪细胞中的细胞因子基因表达,并防止高脂肪饮食诱导的肥胖。这些研究提示 *Trib1* 可能通过影响巨噬细胞和炎症反应参与肥胖,但其具体的生理机制还待进一

步探究。

3.2 儿茶酚胺抵抗

肥胖症中能量稳态的失调涉及多激素抵抗,除了瘦素抵抗和胰岛素抵抗外,有研究观察到肥胖患者的肾上腺素刺激的脂肪分解作用减弱,表现出儿茶酚胺抵抗^[46,47]。3种 β -肾上腺素能受体亚型都在脂肪细胞中表达,其中 β_3 肾上腺素能受体(β_3 -adrenergic receptor, β_3 AR)在人类和小鼠中都表现出高效的脂肪分解和产热作用^[48]。C/EBP α 是脂肪生成过程中 β_3 AR基因的关键转录调节因子^[49]。最新研究发现,*Trib1*通过介导C/EBP α 的降解,从而降低脂肪细胞 β_3 AR的表达,诱导儿茶酚胺抵抗。另外,在炎症因子TNF- α 可以通过EPAC/RAP2A/PI-PLC(exchange protein directly activated by cAMP/Ras-related protein/phosphoinositide-phospholipase C)信号通路诱导 β_3 AR表达下调,且通过该通路诱导*Trib1*的表达加剧儿茶酚胺抵抗的发生^[50]。

也有研究发现,*Trib1*敲除小鼠对 β_3 肾上腺素能受体诱导的产热响应降低,肾上腺素的处理反而增加了脂质在小鼠肝脏的堆积^[51]。在*Trib1*敲除小鼠中肾上腺素处理促进了脂肪分解,但*Trib1*敲除诱导的棕色脂肪线粒体功能障碍使小鼠脂质利用能力降低,进而加速了脂肪在肝脏的异位堆积^[51]。这些研究说明,*Trib1*参与肥胖和儿茶酚胺抵抗,但*Trib1*对肾上腺素信号的作用或许还应该在肝脏或者脂肪特异性敲除的小鼠上进一步观察。

4. *Trib1*与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化主要是一种脂质代谢紊乱疾病,是多种心脑血管疾病的基础。动脉粥样硬化始于内皮功能障碍,随后是新内膜形成、脂质积累、泡沫细胞形成和斑块破裂。内皮细胞功能障碍会导致炎性细胞因子和趋化因子的产生和释放,随后单核细胞被募集到病变部位,通过摄取氧化低密度脂蛋白分化为巨噬细胞并转化为泡沫细胞,聚集成血管斑块^[52,53]。GWAS确定了*Trib1*基因与甘油三酯水平升高相关,而升高的甘油三酯水平增加了心血管疾病患病风险^[54]。除此之外,在动脉粥样硬化的发展中,M2型巨噬细胞将逐渐被M1型炎性巨噬细胞取代^[55],而*Trib1*的敲除会通过调控M2型巨噬细胞的分化影响心血管疾病的发展^[41]。除此之外,在致病条件下,MAPK与炎性因子介导的血管平滑肌细胞迁移和增殖相关。*Trib1*通过结合MAPKK来调节MAPK级联的活性^[11]。最近的研究发现*Trib1*是MAPKK4在血管平滑肌细胞中JNK的负调节剂,可以减少炎性因子的趋化并抑制血管平滑肌的迁移和增生^[56]。

以上研究说明*Trib1*的表达可以降低甘油三酯水平升高带来的心血管疾病风险,

维持组织损伤修复的 M2 型巨噬细胞的分化, 抑制炎症因子的趋化和心血管重构, 由此可以推测 *Trib1* 可能是心血管疾病中的一个有利因素。但有趣的是, Johnston JM 等最新的实验数据发现, 髓样特异性 *Trib1* 表达减少会抑制早期动脉粥样硬化的形成, 而 *Trib1* 转录水平的增加会带来动脉粥样硬化的发生。研究发现 *Trib1* 增加巨噬细胞脂质的积累和关键受体的表达, 促进氧化低密度脂蛋白的摄取并形成富含脂质的泡沫细胞^[57]。这与前期推测不一致的结果或许说明特异性沉默巨噬细胞中 *Trib1* 表达的药物治, 可能需要在动脉粥样硬化的早期采用。

5. 结语与展望

近年来, 除了肿瘤和心血管疾病外, 慢性低度炎症和脂代谢障碍等长期疾病也受到人们的关注。作为假激酶蛋白, *Trib1* 在肿瘤发展中的调控作用是极为重要的。同时 *Trib1* 还参与巨噬细胞的极化, 血脂水平的调控和炎症反应, 在慢性代谢性疾病中也发挥着重要的作用。但这只是基于目前文献的推测, *Trib1* 和脂肪代谢、炎症和心血管疾病之间的联系还待进一步的研究。

参考文献:

- [1] BOUDEAU J, MIRANDA-SAAVEDRA D, BARTON G J, et al. Emerging roles of pseudokinases [J]. Trends Cell Biol, 2006, 16(9): 443-52.
- [2] MANNING G, WHYTE D B, MARTINEZ R, et al. The protein kinase complement of the human genome [J]. Science, 2002, 298(5600): 1912-34.
- [3] MACE P D, MURPHY J M. There's more to death than life: Noncatalytic functions in kinase and pseudokinase signaling [J]. J Biol Chem, 2021, 296: 100705.
- [4] TAYLOR S S, SHAW A, HU J, et al. Pseudokinases from a structural perspective [J]. Biochem Soc Trans, 2013, 41(4): 981-6.
- [5] KUNG J E, JURA N. Structural Basis for the Non-catalytic Functions of Protein Kinases [J]. Structure, 2016, 24(1): 7-24.
- [6] EYERS P A, MURPHY J M. Dawn of the dead: protein pseudokinases signal new adventures in cell biology [J]. Biochem Soc Trans, 2013, 41(4): 969-74.
- [7] NEUWALD A F. Rapid detection, classification and accurate alignment of up to a million or more related protein sequences [J]. Bioinformatics, 2009, 25(15): 1869-75.
- [8] KANNAN N, NEUWALD A F. Did protein kinase regulatory mechanisms evolve through elaboration of a simple structural component? [J]. J Mol Biol, 2005, 351(5): 956-72.

- [9] KANNAN N, HASTE N, TAYLOR S S, et al. The hallmark of AGC kinase functional divergence is its C-terminal tail, a cis-acting regulatory module [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(4): 1272-7.
- [10] MURPHY J M, NAKATANI Y, JAMIESON S A, et al. Molecular Mechanism of CCAAT-Enhancer Binding Protein Recruitment by the TRIB1 Pseudokinase [J]. *Structure*, 2015, 23(11): 2111-21.
- [11] KISS-TOTH E, BAGSTAFF S M, SUNG H Y, et al. Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(41): 42703-8.
- [12] ROTH LISBERGER B, HEIZMANN M, BARGETZI M J, et al. TRIB1 overexpression in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007, 176(1): 58-60.
- [13] YOKOYAMA T, KANNO Y, YAMAZAKI Y, et al. Trib1 links the MEK1/ERK pathway in myeloid leukemogenesis [J]. *Blood*, 2010, 116(15): 2768-75.
- [14] GENDELMAN R, XING H, MIRZOEVA O K, et al. Bayesian Network Inference Modeling Identifies TRIB1 as a Novel Regulator of Cell-Cycle Progression and Survival in Cancer Cells [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(7): 1575-85.
- [15] WANG Y, WU N, PANG B, et al. TRIB1 promotes colorectal cancer cell migration and invasion through activation MMP-2 via FAK/Src and ERK pathways [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(29): 47931-42.
- [16] DUGAST E, KISS-TOTH E, DOCHERTY L, et al. Identification of tribbles-1 as a novel binding partner of Foxp3 in regulatory T cells [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(14): 10051-60.
- [17] WILLER C J, SANNA S, JACKSON A U, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(2): 161-9.
- [18] KATHIRESAN S, MELANDER O, GUIDUCCI C, et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(2): 189-97.
- [19] VAN DER LAAN S W, HARSHFIELD E L, HEMERICH D, et al. From lipid locus to drug target through human genomics [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(9): 1258-70.
- [20] WILLER C J, SCHMIDT E M, SENGUPTA S, et al. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(11): 1274-83.
- [21] ISHIZUKA Y, NAKAYAMA K, OGAWA A, et al. TRIB1 downregulates hepatic

- lipogenesis and glycogenesis via multiple molecular interactions [J]. *J Mol Endocrinol*, 2014, 52(2): 145-58.
- [22] SERPER M, VUJKOVIC M, KAPLAN D E, et al. Validating a non-invasive, ALT-based non-alcoholic fatty liver phenotype in the million veteran program [J]. *PLoS One*, 2020, 15(8): e0237430.
- [23] CHEN J, SPRACKLEN C N, MARENNE G, et al. The trans-ancestral genomic architecture of glycemic traits [J]. *Nat Genet*, 2021, 53(6): 840-60.
- [24] XU A, WANG Y, KESHAW H, et al. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(1): 91-100.
- [25] IZADI V, FARABAD E, AZADBAKHT L. Epidemiologic evidence on serum adiponectin level and lipid profile [J]. *Int J Prev Med*, 2013, 4(2): 133-40.
- [26] PISCHON T, GIRMAN C J, HOTAMISLIGIL G S, et al. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men [J]. *JAMA*, 2004, 291(14): 1730-7.
- [27] HA E E, QUARTUCCIA G I, LING R, et al. Adipocyte-specific tribbles pseudokinase 1 regulates plasma adiponectin and plasma lipids in mice [J]. *Mol Metab*, 2022, 56: 101412.
- [28] BAUER R C, SASAKI M, COHEN D M, et al. Tribbles-1 regulates hepatic lipogenesis through posttranscriptional regulation of C/EBPalpha [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(10): 3809-18.
- [29] ECKEL-MAHAN K, SASSONE-CORSI P. Metabolism and the circadian clock converge [J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(1): 107-35.
- [30] MAURY E, RAMSEY K M, BASS J. Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease [J]. *Circ Res*, 2010, 106(3): 447-62.
- [31] MA D, LIU T, CHANG L, et al. The Liver Clock Controls Cholesterol Homeostasis through Trib1 Protein-mediated Regulation of PCSK9/Low Density Lipoprotein Receptor (LDLR) Axis [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(52): 31003-12.
- [32] YI C, DENG X W. COP1 - from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis [J]. *Trends Cell Biol*, 2005, 15(11): 618-25.
- [33] ULJON S, XU X, DURZYNSKA I, et al. Structural Basis for Substrate Selectivity of the E3 Ligase COP1 [J]. *Structure*, 2016, 24(5): 687-96.
- [34] KUNG J E, JURA N. The pseudokinase TRIB1 toggles an intramolecular switch to regulate COP1 nuclear export [J]. *EMBO J*, 2019, 38(4).
- [35] BREDELLA M A, GILL C M, GERWECK A V, et al. Ectopic and serum lipid levels

are positively associated with bone marrow fat in obesity [J]. *Radiology*, 2013, 269(2): 534-41.

[36]BRAILLON A, CAPRON J P, HERVE M A, et al. Liver in obesity [J]. *Gut*, 1985, 26(2): 133-9.

[37]BURKHARDT R, TOH S A, LAGOR W R, et al. Trib1 is a lipid- and myocardial infarction-associated gene that regulates hepatic lipogenesis and VLDL production in mice [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(12): 4410-4.

[38]QUIROZ-FIGUEROA K, VITALI C, CONLON D M, et al. TRIB1 regulates LDL metabolism through CEBPalpha-mediated effects on the LDL receptor in hepatocytes [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(22).

[39]IWAMOTO S, BOONVISUT S, MAKISHIMA S, et al. The role of TRIB1 in lipid metabolism; from genetics to pathways [J]. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43(5): 1063-8.

[40]QUIROZ-FIGUEROA K, VITALI C, CONLON D M, et al. TRIB1 regulates LDL metabolism through CEBPalpha-mediated effects on the LDL receptor in hepatocytes [J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(22).

[41]SATO T, KIDOYA H, NAITO H, et al. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages [J]. *Nature*, 2013, 495(7442): 524-8.

[42]YAMAMOTO M, UEMATSU S, OKAMOTO T, et al. Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(9): 2233-9.

[43]ARNDT L, DOKAS J, GERICKE M, et al. Tribbles homolog 1 deficiency modulates function and polarization of murine bone marrow-derived macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(29): 11527-36.

[44]HAN M S, JUNG D Y, MOREL C, et al. JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation [J]. *Science*, 2013, 339(6116): 218-22.

[45]ODEGAARD J I, RICARDO-GONZALEZ R R, GOFORTH M H, et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance [J]. *Nature*, 2007, 447(7148): 1116-20.

[46]COLLINS S, DANIEL K W, ROHLFS E M. Depressed expression of adipocyte beta-adrenergic receptors is a common feature of congenital and diet-induced obesity in rodents [J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1999, 23(7): 669-77.

[47]HOROWITZ J F, KLEIN S. Whole body and abdominal lipolytic sensitivity to epinephrine is suppressed in upper body obese women [J]. *Am J Physiol Endocrinol*

Metab, 2000, 278(6): E1144-52.

[48]CHAMBERLAIN P D, JENNINGS K H, PAUL F, et al. The tissue distribution of the human beta3-adrenoceptor studied using a monoclonal antibody: direct evidence of the beta3-adrenoceptor in human adipose tissue, atrium and skeletal muscle [J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 1999, 23(10): 1057-65.

[49]DIXON T M, DANIEL K W, FARMER S R, et al. CCAAT/enhancer-binding protein alpha is required for transcription of the beta 3-adrenergic receptor gene during adipogenesis [J]. J Biol Chem, 2001, 276(1): 722-8.

[50]VALENTINE J M, AHMADIAN M, KEINAN O, et al. beta3-Adrenergic receptor downregulation leads to adipocyte catecholamine resistance in obesity [J]. J Clin Invest, 2022, 132(2).

[51]ZHANG X, ZHANG B, ZHANG C, et al. Trib1 deficiency causes brown adipose respiratory chain depletion and mitochondrial disorder [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(12): 1098.

[52]MURPHY A J, TALL A R. Disordered haematopoiesis and athero-thrombosis [J]. Eur Heart J, 2016, 37(14): 1113-21.

[53]ROCHA V Z, LIBBY P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis [J]. Nat Rev Cardiol, 2009, 6(6): 399-409.

[54]NORDESTGAARD B G, BENN M, SCHNOHR P, et al. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women [J]. JAMA, 2007, 298(3): 299-308.

[55]KHALLOU-LASCHET J, VARTHAMAN A, FORNASE G, et al. Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis [J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8852.

[56]SUNG H Y, GUAN H, CZIBULA A, et al. Human tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signaling pathways [J]. J Biol Chem, 2007, 282(25): 18379-87.

[57]JOHNSTON J M, ANGYAL A, BAUER R C, et al. Myeloid Tribbles 1 induces early atherosclerosis via enhanced foam cell expansion [J]. Sci Adv, 2019, 5(10): eaax9183.

文献综述二

小檗碱作为抗肥胖药物及其机理分析

摘要:

超重或肥胖个体的患病率在全球范围内迅速上升。目前治疗肥胖症的药物大多无效或副作用明显;因此,选择非常有限。因此,有必要寻找更有效、更安全的抗肥胖药物。从中药黄连(*Coptis chinensis* Franch.)中分离出的有效成分小檗碱在体内和体外均具有抗肥胖作用。小檗碱可通过减少脂质合成、抑制脂肪生成、促进白色脂肪组织褐变、增加能量消耗和提高胰岛素敏感性来治疗肥胖。虽然小檗碱是治疗肥胖的潜在药物,但其作用和机制尚未深入分析。本综述分析了小檗碱的抗肥胖的作用机制和临床研究为肥胖的早期预防和治疗提供关键意义。

关键词: 小檗碱, 抗肥胖, 脂肪形成, 白色脂肪棕色化, 胰岛素敏感性

Abstract: The prevalence of individuals who are overweight or obese is rising rapidly globally. Currently, majority of drugs used to treat obesity are ineffective or are accompanied by obvious side effects; hence, the options are very limited. Therefore, it is necessary to find more effective and safer anti-obesity drugs. It has been proven *in vivo* and *in vitro* that the active ingredient notoginsenosides isolated from traditional Chinese medicine *Coptis chinensis* Franch. exhibits anti-obesity effects. Berberine can treat obesity by reducing lipid synthesis, inhibiting adipogenesis, promoting white adipose tissue browning, increasing energy consumption, and improving insulin sensitivity. Although berberine are potential drugs for the treatment of obesity, their effects and mechanisms have not been analyzed in depth. In this review, the anti-obesity potential and mechanism of action of berberine were analyzed; thus laying emphasis on the timely prevention and treatment of obesity.

Keywords: Berberine, anti-obesity, adipogenesis, white fat browning, insulin sensitivity

可损害健康的过量脂肪堆积即为超重和肥胖。世界卫生组织指出, 身体素质指数(Body mass index, BMI) 等于或大于 25 时为超重; 大于或等于 30 时为肥胖。而 1975 年至 2016 年间, 全球肥胖患病率几乎增加了两倍, 年龄在 18 岁及以上的成年人中有 13% 为肥胖。且肥胖往往会提高心血管疾病、糖尿病和癌症等非传染性疾病的患病风险, 严重危害人体健康。虽然人们可以通过选择更健康的食物和定期进行体育锻炼在中短期内干预肥胖, 达到减重的目的, 但长期来看生活环境和遗传因素

很容易导致肥胖的再次发生^[1]。因此，在运动和饮食管理之外增加药物治疗，对于减重患者是十分有益的。但现在用于治疗肥胖的药物十分有限，目前美国 FDA 批准可长期控制体重的药物仅有 Orlistat(奥利司他)、Liraglutide(利拉鲁肽)、Lorcaserin(氯卡色林)和 Qsymia(芬特明/托吡酯复方缓释片)四种。其中奥利司他是肠道脂肪酶抑制剂，通过抑制甘油三酯水解，减少食物中脂肪的吸收到达减重的目的。但该药物的长期使用会造成脂溶性维生素的缺乏，以及胃肠道功能紊乱^[2,3]。Liraglutide 为 GLP-1 类似物，伴有低血糖和急性胰腺炎的风险，且单一的注射剂型不利于长期使用。Lorcaserin 作用于 5-羟色胺受体 (5-HT_{2C})，为拟交感神经类药物，可以减少食欲，但其长期使用有潜在的心脏瓣膜病和癌症风险^[4,5]。Qsymia 为中枢神经类减肥药，伴有头痛、失眠、便秘和眩晕等副作用^[6,7]。此外，还有更多的减肥药物因为强烈的副作用被撤回，如：氟苯丙胺(心脏病)、阿米雷司(阻塞性肺高压)、芬特明(失眠，致死性肺高压)、利莫那班(精神反应，抑郁和焦虑，自杀风险)等^[8]。因此开发安全有效的新型抗肥胖药物具有极大的临床意义及经济价值。

小檗碱是中药黄连 (*Coptis chinensis* Franch) 中分离得到的异喹啉生物碱，最初用于治疗腹泻^[9]。随着传统医药发展，利用现代物理、化学技术和现代医药学理论对小檗碱进行了系统的研究。除了腹泻，体外和体内研究表明，小檗碱可用于神经退行性疾病、肿瘤、动脉粥样硬化、高血脂和 2 型糖尿病等多种疾病^[10,11]。小檗碱是一种阳离子生物碱，但其水溶性低，肠道吸收和生物利用度差^[12]。尽管如此，在大量动物模型中小檗碱已被证明存在良好药理作用。研究发现小檗碱可以通过激活 AMPK 活性、抑制炎症反应和改善肠道菌群等多种机制治疗疾病。更重要的是，在大多数动物研究和临床试验中小檗碱显示出低毒性^[13,14]，这使其临床使用安全，支持其在疾病中的应用前景。

研究发现小檗碱在肥胖等脂质代谢类疾病中具有多靶标活性。小檗碱可以上调大脑中的血清素水平^[15]，并增加 GLP-1、食欲素 A 和 NPY 的表达上调，减少小鼠的食物摄入量和体重^[16]。在高脂喂养的小鼠中，小檗碱通过减少脂质积累和增强线粒体数目、产热标志物(包括 PGC-1 α 、Cidea 和 UCP1)和棕色脂肪活性，提高产热抑制肥胖^[17]；特别的是，小檗碱可以刺激腹股沟白色脂肪组织棕色化，增加产热标志物的表达以及线粒体生物发生^[18]。另外，小檗碱可以调节肠道拟杆菌门、厚壁菌门、双歧杆菌和乳杆菌属物种比例，降低体重和血脂水平^[19]。除此之外，小檗碱还具有明显的降血糖、降血脂、保肝、抗炎等作用。因此，小檗碱被认为是治疗代谢疾病最有前景的天然产物之一。在这篇综述中，我们全面地总结了小檗碱在肥胖治疗中的药理学进展和临床数据。为小檗碱在代谢性疾病治疗中的基础研究、药物开发和临床应用提供有价值的参考信息。

1 脂肪形成

由于机体摄入和消耗的能量长期失衡,过多的能量以甘油三酯的形式存储在白色脂肪细胞中^[20]。这一过程伴随着前脂肪细胞的增殖分化和脂质储存增多带来的细胞肥大,最终导致脂肪组织体积增生,表现为肥胖^[21]。在哺乳动物细胞中,PPAR γ 和C/EBPs被认为是脂肪形成的关键早期调节剂^[22-24],而SREBP1,CREB等可以通过诱导和影响PPAR γ 调节脂肪分化和代谢^[25-27]。除此之外,4型葡萄糖转运蛋白(Glucose transporter type 4, GLUT4),脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL),硬脂酰辅酶A去饱和酶(stearoyl-CoA desaturase, SCD)和脂肪酸合酶(Fatty acid synthase, FAS)等蛋白也参与脂肪的形成和脂质的储存^[28]。

体外研究表明,小檗碱可以通过降低PPAR γ 和C/EBP α 的基因和蛋白水平,抑制3T3-L1脂肪细胞的增殖分化,减少脂肪细胞的数目并抑制脂质蓄积,从而达到抗肥胖的作用^[29]。此外,小檗碱也能通过甾醇调节元件结合蛋白1c(Sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c),乙酰辅酶A羧化酶(Acetyl-CoA carboxylase, ACC),酰基辅酶A合酶(Acyl-CoA synthase, ACS)等蛋白减少脂肪和胆固醇的合成^[30]。体内研究表明,小檗碱可降低高脂喂养小鼠体内脂肪生成相关酶的表达,包括ACC和FAS^[31]。另外,AMPK通路作为细胞能量传感器的中央调节器,可以调控细胞器的生物发生,细胞代谢,细胞增殖和分化^[32]。目前研究发现AMPK信号通路的激活可以增加机体能量消耗并减少脂质蓄积和脂肪形成^[33,34]。小檗碱可以通过激活AMPK通路提高胰岛素敏感性并抑制肥胖的发生^[35]。除此之外,小檗碱通过降低半乳糖凝集素(galectin-3, Gal-3)启动子活性,来抑制脂肪细胞的分化和增殖^[36]。这些结果表明,小檗碱可以通过抑制脂肪生成,减少脂肪堆积。

2 增加机体能量消耗

2.1 促进脂肪棕色化

哺乳动物的脂肪主要有两种类型,即储能型的白色脂肪组织和耗能的棕色脂肪组织。其中WAT将机体多余的能量转化为甘油三酸酯存储在细胞中,而BAT包含大量线粒体,其中高水平的UCP1蛋白会以非战栗性产热的方式消耗生物能散发能量,以维持人体温度和能量消耗^[37,38]。最近,在WAT中发现了第三种类型的脂肪细胞,称为米色脂肪细胞,它与经典褐色脂肪细胞相似,具有高水平的UCP1^[39]。通过冷暴露,药物或激素刺激,可以诱导WAT中米色脂肪细胞的生物发生^[40]。在过去的几年中,米色脂肪的发育和转录调控受到广泛关注。有研究发现,通过遗传和药理学方法诱导米色脂肪细胞,可以保护小鼠免受高脂饮食诱导的肥胖和胰岛素抵抗,也可以有效地增加能量消耗并改善代谢紊乱。最近的研究还确定了米色脂肪细胞发

育和功能的几个主要转录调节因子, 包括 PPARs, PGC1 α 和 PRDM16 等^[41, 42]。

小檗碱通过介导的 WAT 棕色化涉及多种调节方式。在 3T3-L1 细胞中, 小檗碱通过 SP1/MYC-c13orf25-miR-92a-RBM4a 通路, 调控 PRDM16 促进 WAT 棕色化^[43]。在高脂饮食诱导的肥胖小鼠中, 小檗碱可以激活能量代谢传感通路 AMPK/SIRT1 轴, 以增加 PPAR γ 去乙酰化水平, 从而促进 WAT 棕色化并增加产热蛋白 UCP1 的表达^[18]。在高脂诱导的金黄地鼠模型中, 通过诱导 FGF21/SIRT1/PRDM16 信号通路, 促进棕色脂肪特异性基因表达, 并抑制白色脂肪特异性基因表达。除此之外, 有研究发现小檗碱还通过涉及 AMPK 和 PGC-1 α 的机制增加 WAT 和原代脂肪细胞中 UCP1 和其他产热基因的表达, 诱导体重减轻和产热程序的激活^[17]。有趣的, 该研究发现小檗碱处理抑制 db/db 小鼠下丘脑中的 AMPK 活性。小檗碱通常被认为是 AMPK 激活剂^[44], 研究证明激活 AMPK 可以增加 BAT 和米色脂肪的活动和能量消耗, 靶向 AMPK 可能具有治疗肥胖症和相关疾病的治疗潜力^[45, 46]。因此, 小檗碱对 AMPK 的具体调控作用还需进一步探究, 确认其是否受药物处理浓度的影响或者是否存在组织特异性。

2.1 提高棕色脂肪功能

除了诱导 WAT 棕色化, 小檗碱还能直接提高 BAT 活性。研究发现小檗碱在调节 BAT 适应性产热中发挥作用。在 db/db 小鼠中, 小檗碱处理可以减少脂质积累, 增加全身能量消耗。通过正电子发射断层扫描在人类和啮齿动物的 BAT 中都观察到了氟代脱氧葡萄糖的摄取增加, 这与 BAT 中线粒体含量和产热蛋白的增加相关^[17]。小檗碱还能浓度依赖性的增加 C3H10-T1/2 细胞中 UCP1 和 PRDM16 的表达, 并通过 PRDM16 选择性地促进棕色前脂肪细胞和间充质祖细胞中的棕色脂肪生成, 并提高细胞的呼吸代谢水平^[47]。另外, 小檗碱通过介导 AMPK α 蛋白磷酸化, 刺激棕色脂肪细胞表达成纤维细胞生长因子 21 (Fibroblast growth factor 21, FGF21), 从而增加 BAT 产热。值得注意的是, 在 C3H10-T1/2 细胞中, 节律基因 Bmal1 的敲低阻止了小檗碱诱导的 FGF21 表达, 这表明 Bmal1 是小檗碱调控 FGF21 和 BAT 的重要靶点^[48]。Bmal1 是所有细胞维持生物节律所必需的, 并且与多种生理功能有关^[49, 50]。在该研究中 Bmal1 参与了 FGF21 表达的调节, 但其调节 FGF21 的确切机制尚未详细阐明。此外, Bmal1 和 AMPK 信号通路在小檗碱调节 FGF21 表达中的作用机制也需进一步研究。

2.3 线粒体保护作用

线粒体是能量代谢必不可少的细胞器。脂肪细胞线粒体在全身能量平衡, 肌肉

和脂肪组织分化和胰岛素敏感性和糖代谢之间发挥实质性的调控作用^[51]。各种研究证据表明,在2型糖尿病,肥胖和胰岛素抵抗的脂肪组织中,线粒体功能和生物发生受到损害^[51,52]。脂肪细胞中线粒体的主要功能是产生ATP,以支持各种代谢途径,包括甘油三酸酯合成,糖异生和脂肪酸氧化,这是脂质清除的关键途径。此外,响应于冷暴露,药物或肾上腺激素,棕色和米色脂肪细胞中线粒体的激活通过增加线粒体内膜UCP1来加速能量消耗^[53]。肥胖和代谢性疾病患者的棕色脂肪细胞中线粒体功能障碍导致的脂肪酸氧化和能量消耗减少,这说明线粒体功能在抗肥胖中的作用^[54]。

肥胖小鼠体内脂肪组织中的ROS过量产生,线粒体mtDNA,呼吸蛋白表达显著降低,表现出线粒体功能障碍^[55,56]。研究发现小檗碱给药后,对叔丁基过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide, t-BHP)诱导的ROS和氧化应激被明显抑制。小檗碱处理可以通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路抑制线粒体自噬,恢复线粒体和溶酶体的功能^[57]。在db/db小鼠中,小檗碱通过调节PGC-1 α 促进线粒体生物合成并增加能量输出,从而改善db/db小鼠线粒体ROS的过度生成、线粒体功能障碍和脂肪酸氧化缺陷^[58]。值得注意的是,在KGN人卵巢颗粒瘤细胞系中,小檗碱处理可以剂量依赖性的(12 μ M、25 μ M和50 μ M)增加细胞内ROS水平和线粒体凋亡通路相关因子的表达。此外,小檗碱通过促进SIRT3泛素化来促进KGN细胞的葡萄糖摄取并抑制线粒体功能,并且可能通过激活AMPK通路来促进细胞自噬^[59]。

从这些研究看出,小檗碱对线粒体功能的作用值得深入探究。小檗碱已被认为是AMPK激活剂^[35],AMPK可以促进线粒体生物合成、线粒体抗氧化,并增加葡萄糖转运蛋白的表达和糖酵解酶的活性^[60]。因此小檗碱可以通过AMPK靶向线粒体来对抗肥胖,脂肪肝和肿瘤等多种疾病。但小檗碱对线粒体的具体作用是存疑的,在肿瘤等恶性疾病中,小檗碱处理会抑制线粒体功能,诱导异常的细胞能量代谢和肿瘤细胞凋亡^[59,61,62];而在肥胖等代谢性疾病中,小檗碱处理可以介导AMPK促进线粒体功能,提高棕色脂肪和白色脂肪细胞的能量代谢水平^[17,18,47]。这些不同的实验结论是由于药物处理浓度不同或是肿瘤等恶病质的代偿结果仍待进一步研究。

3 改善胰岛素敏感性

3.1 胰岛素抵抗

已证明,肥胖引起的脂肪组织代谢障碍在胰岛素敏感组织中引起原发性胰岛素抵抗^[63,64]。肥胖带来的脂质过载和脂毒性通过干扰胰岛素信号转导途径,影响各器官胰岛素敏感性^[65,66]。研究发现小檗碱可以通过不同的途径改善胰岛素抵抗。研究发现小檗碱处理降低了2型糖尿病大鼠的空腹血糖和血清胰岛素水平,小檗碱通过

蛋白激酶 C 上调胰岛素受体表达,增加了胰岛素敏感性^[67]。此外,小檗碱还改善了脂肪细胞、肌管细胞和心肌细胞的胰岛素抵抗。小檗碱通过促进 3T3-L1 脂肪细胞和 L6 肌管细胞中 AMPK 的磷酸化,增加 GLUT4 的转运,并减少脂肪细胞的脂质积累来减轻胰岛素抵抗^[68, 69]。有趣的是,小檗碱还可以通过减少外周支链氨基酸 (branched-chain amino acids, BCAAs) 来减轻高脂喂养小鼠的胰岛素抵抗。小檗碱可以通过激活多酶支链 α -酮酸脱氢酶复合物来促进小鼠肝脏和附睾白色脂肪组织中 BCAA 的分解代谢,并减少肠道产生 BCAA 的细菌的相对丰度^[70]。这些研究说明小檗碱可以作用于多种组织和器官改善胰岛素抵抗。

此外,还有研究发现小檗碱能直接促进葡萄糖刺激的胰岛素分泌。在体内模型中,小檗碱可以提高 BALB/c 小鼠的血清胰岛素水平;在体外模型中,小檗碱可以剂量依赖性的促进 HIT-T15 细胞的胰岛素分泌^[71]。小檗碱通过介导胰岛素受体底物 2 (insulin receptor substrate 2, IRS2) 发挥促胰岛素作用并增加 Min6 细胞中葡萄糖刺激的胰岛素分泌和增殖^[72]。小檗碱增加链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠胰岛素分泌,并提供抗氧化作用保护胰腺 β 细胞数量、胰岛面积和胰腺体重比^[73]。

3.1 糖代谢

脂肪组织在控制正常和疾病状态下的全身葡萄糖稳态方面均具有重要作用。肥胖伴随着的胰岛素抵抗表明机体激活胰岛素信号通路的能力降低,该信号通路负责刺激葡萄糖的摄取和代谢^[74]。在胰岛素抵抗的肥胖患者的脂肪细胞中,胰岛素调节的葡萄糖转运蛋白 GLUT4 的水平降低引发高血糖^[75],进而激活氧化应激,炎症和内质网应激反应等^[76, 77]。

研究发现,小檗碱促进葡萄糖摄取和糖酵解。小檗碱通过 AMPK 途径激活 GLUT1 蛋白,增加 3T3-L1 脂肪细胞中的葡萄糖摄取^[78]。还有研究提出,小檗碱刺激的葡萄糖摄取不会随着胰岛素浓度的增加而变化。小檗碱通过激活 AMPK/p38 MAPK 信号通路刺激葡萄糖摄取,这提示我们小檗碱可以在没有胰岛素的情况下增加葡萄糖摄和利用^[79]。除此之外,小檗碱可以通过独立于 AMPK 的途径激活糖酵解增强葡萄糖代谢。在 HepG2 肝细胞和 C2C12 肌管细胞中,小檗碱抑制线粒体呼吸链复合物 I,从而刺激糖酵解促进葡萄糖代谢,与 AMPK 活化无关^[80]。而研究发现,线粒体呼吸链活性缺陷或低活性将诱导 2 型糖尿病和肥胖的发展^[81-83],因此小檗碱对线粒体复合物的具体作用是个很有趣的问题。

4 肠道菌群

小檗碱的口服生物利用度与其确切的药效之间出现的联系是肠道菌群。研究发

现, 肠道菌群已被证明是小檗碱抗肥胖的关键。且有研究发现, 高脂喂养会使金黄地鼠粪便中产生硝基还原酶(Nitroreductases, NRs)的细菌的比例增加, 从而增加小檗碱在肥胖动物中的生物利用度^[84]。

研究表明, 小檗碱处理可以调节肥胖动物的肠道微生物群多样性, 增加异杆菌属(*Allobaculum*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、布劳氏菌属(*Blautia*)、酪球菌属(*Butyricoccus*)和芽孢杆菌属(*Phascolarctobacterium*)等产生短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFA)的菌群比例, 减轻高脂喂养的大鼠体重^[85, 86]。此外, 小檗碱处理可以调节高脂饮食喂养的 C57BL/6J 小鼠肠道厚壁菌门(*Bacteroidetes*)和拟杆菌门(*Firmicutes*)的比例, 减少膳食多糖的降解吸收, 并激活内脏脂肪组织中线粒体能量代谢相关基因的表达^[19]。法尼醇 X 受体(Farnesoid X receptor, FXR)是调节胆固醇代谢, 维持胆汁酸稳态的一种核受体。小檗碱通过激活肠道 FXR 信号通路, 调节肠道微生物水解胆汁酸的能力发挥其降脂作用^[87]。还有研究发现, 小檗碱通过调节微生物群-肠-脑轴改善了高脂饮食引起的代谢紊乱。小檗碱可以调节大鼠肠道微生物群的结构和多样性, 提高了血浆 GLP-1 和食欲素 A 水平, 并降低了 NPY 水平^[16]。

5 结语与展望

由于遗传, 饮食结构和运动习惯等因素的影响, 肥胖已在世界范围内流行。据统计, 与肥胖相关的糖尿病, 心血管疾病以及癌症等, 使肥胖患者的寿命缩短了 4-7 年^[88]。目前治疗肥胖的药物和策略, 大多有明显的副作用或无法有效治疗肥胖。而肥胖涉及的多种病理变化, 包括高血脂症, 慢性炎症, 脂肪功能障碍, 糖脂代谢障碍, 线粒体损伤和胰岛素抵抗等多因素相互作用, 使肥胖的治疗更为不易。例如响应于脂质水平升高, 出现线粒体功能的下调和氧化磷酸化基因的表达降低^[89, 90]。而线粒体功能降低的结果是通过氧化代谢消耗脂肪酸的能力受损, 这反过来可能进一步加剧脂毒性和糖脂代谢障碍, 继发炎症和胰岛素抵抗等^[91]。

近年来小檗碱作为热门药物, 通过调控 AMPK、SIRT1、LDLR、PPAR、NF- κ B 和调节肠道微生物群等途径, 在糖尿病、肥胖、非酒精性脂肪肝、肿瘤和动脉粥样硬化等疾病中都具有良好的治疗作用。但小檗碱的直接蛋白质组学靶点在很大程度上仍然未知。有研究通过化学探针对小檗碱的蛋白作用靶点进行探究, 结果显示小檗碱生化水平和细胞水平上调节肌动蛋白组装^[92]。但小檗碱靶蛋白对于目前明确的 AMPK 等通路之间的联系仍不明确。且小檗碱在不同的组织中的药理学作用, 也要求对小檗碱的蛋白靶点分别进行探究。

小檗碱在脂肪组织中显示出多种调节作用, 包括促进 WAT 棕色化产热和直接激活 BAT 产热。其中有研究发现, 小檗碱会选择性的诱导腹股沟部位的 iWAT 棕色化

和产热,对腹腔部位的 eWAT 不具有调节作用^[17]。除此之外,小檗碱还能调控脂肪组织的 PRDM16 的表达,选择性地促进棕色前脂肪细胞和间充质祖细胞中的棕色脂肪生成,提高细胞的呼吸代谢水平^[47]。其中,PRDM16 是调控 BAT 形成的关键蛋白。PRDM16 与多种转录因子和辅助因子相互作用,从而决定 Myf5⁺的前体细胞的分化方向。PRDM16 通过与 PPAR- γ 结合并激活其转录功能来刺激棕色脂肪生成。缺乏 PRDM16 的棕色脂肪表现出异常的形态、产热基因表达降低和骨骼肌特异性基因表达升高^[93]。此外,PRDM16 和米色脂肪的缺失导致代谢功能障碍和腹股沟部位的 iWAT 产热减少,表现出了 eWAT 的特征^[94]。小檗碱对棕色脂肪前体细胞或者间充质干细胞的分化作用仍是空白,这些研究表明小檗碱对脂肪细胞的从头分化调控还需进一步的阐明。

目前已经进行了几项临床试验来研究小檗碱在治疗代谢性病症中的作用。用小檗碱治疗 12 周的肥胖人类受试者的血清 TC 和 TG 分别降低了 12.2%和 23%,体重轻度减轻^[95]。另一项临床研究发现,使用小檗碱治疗 12 周可通过下调 PPAR γ 、C/EBP α 、脂联素和瘦素的表达来抑制脂肪储存并改善胰岛素敏感性^[96]。除此之外,一项临床研究表明,小檗碱通过增加 BAT 募集和激活来减轻超重 NAFLD 患者的体重并改善胰岛素敏感性^[47]。然而,目前的研究仍然存在一些差距和局限性。首先,小檗碱在人体中的分子机制尚未完全揭示。例如降低血糖和改善胰岛素抵抗,已在人体临床试验中得到证实,但对人体的具体靶点和机制尚不清楚。未来需要更深入的临床研究来支持 BBR 的临床应用。其次,尽管大多数临床研究表明小檗碱仅具有轻微的胃肠道副作用,但仍需要额外的长期临床试验来更好地确定小檗碱对人体的安全性。另外,针对小檗碱极低的口服生物利用度,对其化学结构的改造是迫切的。

目前,通过单靶标策略治疗复杂疾病很难获得显著的治疗效果。虽然小檗碱的部分疗效还需要进一步确证,以及治疗肥胖的详细机理还待进一步阐明,但小檗碱表现出在多种途径上抵御肥胖的可能,为此类复杂疾病的多靶标治疗提供了新思路和新方法。

参考文献

- [1] DULLOO A G, MONTANI J P. Pathways from dieting to weight regain, to obesity and to the metabolic syndrome: an overview [J]. *Obes Rev*, 2015, 16 Suppl 1: 1-6.
- [2] HALPERN B, HALPERN A. Safety assessment of FDA-approved (orlistat and lorcaserin) anti-obesity medications [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2015, 14(2): 305-15.
- [3] FILIPPATOS T D, DERDEMEZIS C S, GAZI I F, et al. Orlistat-associated adverse effects and drug interactions: a critical review [J]. *Drug Saf*, 2008, 31(1): 53-65.

- [4] GREENWAY F L, SHANAHAN W, FAIN R, et al. Safety and tolerability review of lorcaserin in clinical trials [J]. *Clin Obes*, 2016, 6(5): 285-95.
- [5] Lorcaserin [M]. *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. Bethesda (MD). 2012.
- [6] SIEBENHOFER A, JEITLER K, HORVATH K, et al. Long-term effects of weight-reducing drugs in people with hypertension [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, 3: CD007654.
- [7] HALPERN B, MANCINI M C. Safety assessment of combination therapies in the treatment of obesity: focus on naltrexone/bupropion extended release and phentermine-topiramate extended release [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2017, 16(1): 27-39.
- [8] CHEUNG B M, CHEUNG T T, SAMARANAYAKE N R. Safety of antiobesity drugs [J]. *Ther Adv Drug Saf*, 2013, 4(4): 171-81.
- [9] YUE S J, LIU J, WANG W X, et al. Berberine treatment-emergent mild diarrhea associated with gut microbiota dysbiosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 116: 109002.
- [10] JIN Y, KHADKA D B, CHO W J. Pharmacological effects of berberine and its derivatives: a patent update [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2016, 26(2): 229-43.
- [11] HABTEMARIAM S. Berberine pharmacology and the gut microbiota: A hidden therapeutic link [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 155: 104722.
- [12] FENG X, WANG K, CAO S, et al. Pharmacokinetics and Excretion of Berberine and Its Nine Metabolites in Rats [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 594852.
- [13] LAN J, ZHAO Y, DONG F, et al. Meta-analysis of the effect and safety of berberine in the treatment of type 2 diabetes mellitus, hyperlipemia and hypertension [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 161: 69-81.
- [14] MOHAMMADZADEH N, MEHRI S, HOSSEINZADEH H. Berberis vulgaris and its constituent berberine as antidotes and protective agents against natural or chemical toxicities [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017, 20(5): 538-51.
- [15] KULKARNI S K, DHIR A. On the mechanism of antidepressant-like action of berberine chloride [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 589(1-3): 163-72.
- [16] SUN H, WANG N, CANG Z, et al. Modulation of Microbiota-Gut-Brain Axis by Berberine Resulting in Improved Metabolic Status in High-Fat Diet-Fed Rats [J]. *Obes Facts*, 2016, 9(6): 365-78.
- [17] ZHANG Z, ZHANG H, LI B, et al. Berberine activates thermogenesis in white and brown adipose tissue [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5493.
- [18] XU Y, YU T, MA G, et al. Berberine modulates deacetylation of PPARgamma to

promote adipose tissue remodeling and thermogenesis via AMPK/SIRT1 pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(12): 3173-87.

[19] XIE W, GU D, LI J, et al. Effects and action mechanisms of berberine and *Rhizoma coptidis* on gut microbes and obesity in high-fat diet-fed C57BL/6J mice [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24520.

[20] KOPELMAN P G. Obesity as a medical problem [J]. *Nature*, 2000, 404(6778): 635-43.

[21] ARNER P, SPALDING K L. Fat cell turnover in humans [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(1): 101-4.

[22] WU Z, ROSEN E D, BRUN R, et al. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity [J]. *Mol Cell*, 1999, 3(2): 151-8.

[23] ROSEN E D, WALKEY C J, PUIGSERVER P, et al. Transcriptional regulation of adipogenesis [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(11): 1293-307.

[24] LEFTEROVA M I, LAZAR M A. New developments in adipogenesis [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2009, 20(3): 107-14.

[25] REUSCH J E, COLTON L A, KLEMM D J. CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20(3): 1008-20.

[26] FAJAS L, SCHOONJANS K, GELMAN L, et al. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(8): 5495-503.

[27] KIM J B, SPIEGELMAN B M. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism [J]. *Genes Dev*, 1996, 10(9): 1096-107.

[28] MOSETI D, REGASSA A, KIM W K. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(1).

[29] HUANG C, ZHANG Y, GONG Z, et al. Berberine inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through the PPARgamma pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(2): 571-8.

[30] HAO M, LI Y, LIU L, et al. The design and synthesis of a novel compound of berberine and baicalein that inhibits the efficacy of lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25(20): 5506-12.

[31] GUO T, WOO S L, GUO X, et al. Berberine Ameliorates Hepatic Steatosis and

- Suppresses Liver and Adipose Tissue Inflammation in Mice with Diet-induced Obesity [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22612.
- [32]HARDIE D G. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function [J]. *Genes Dev*, 2011, 25(18): 1895-908.
- [33]DESJARDINS E M, STEINBERG G R. Emerging Role of AMPK in Brown and Beige Adipose Tissue (BAT): Implications for Obesity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes [J]. *Curr Diab Rep*, 2018, 18(10): 80.
- [34]FERNANDEZ-VELEDO S, VAZQUEZ-CARBALLO A, VILA-BEDMAR R, et al. Role of energy- and nutrient-sensing kinases AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in adipocyte differentiation [J]. *IUBMB Life*, 2013, 65(7): 572-83.
- [35]ZHU X, BIAN H, WANG L, et al. Berberine attenuates nonalcoholic hepatic steatosis through the AMPK-SREBP-1c-SCD1 pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 141: 192-204.
- [36]WANG C, WANG Y, MA S R, et al. Berberine inhibits adipocyte differentiation, proliferation and adiposity through down-regulating galectin-3 [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 13415.
- [37]CONTRERAS C, NOGUEIRAS R, DIEGUEZ C, et al. Hypothalamus and thermogenesis: Heating the BAT, browning the WAT [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 438: 107-15.
- [38]LEE J H, PARK A, OH K J, et al. The Role of Adipose Tissue Mitochondria: Regulation of Mitochondrial Function for the Treatment of Metabolic Diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19).
- [39]GIORDANO A, SMORLESI A, FRONTINI A, et al. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ [J]. *Eur J Endocrinol*, 2014, 170(5): R159-71.
- [40]DE JONG J M A, WOUTERS R T F, BOULET N, et al. The beta3-adrenergic receptor is dispensable for browning of adipose tissues [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2017, 312(6): E508-E18.
- [41]LIZCANO F. The Beige Adipocyte as a Therapy for Metabolic Diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20).
- [42]SU S, GUNTUR A R, NGUYEN D C, et al. A Renewable Source of Human Beige Adipocytes for Development of Therapies to Treat Metabolic Syndrome [J]. *Cell Rep*, 2018, 25(11): 3215-28 e9.

- [43] LIN Y C, LEE Y C, LIN Y J, et al. Berberine Promotes Beige Adipogenic Signatures of 3T3-L1 Cells by Regulating Post-transcriptional Events [J]. *Cells*, 2019, 8(6).
- [44] QIN S, TANG H, LI W, et al. AMPK and its Activator Berberine in the Treatment of Neurodegenerative Diseases [J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(39): 5054-66.
- [45] FERNANDEZ-MARCOS P J, AUWERX J. Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis [J]. *Am J Clin Nutr*, 2011, 93(4): 884S-90.
- [46] VAN DAM A D, KOOIJMAN S, SCHILPEROORT M, et al. Regulation of brown fat by AMP-activated protein kinase [J]. *Trends Mol Med*, 2015, 21(9): 571-9.
- [47] WU L, XIA M, DUAN Y, et al. Berberine promotes the recruitment and activation of brown adipose tissue in mice and humans [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6): 468.
- [48] HIRAI T, MITANI Y, KURUMISAWA K, et al. Berberine stimulates fibroblast growth factor 21 by modulating the molecular clock component brain and muscle Arnt-like 1 in brown adipose tissue [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 164: 165-76.
- [49] EARLY J O, MENON D, WYSE C A, et al. Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1beta in macrophages via NRF2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(36): E8460-E8.
- [50] CURTIS A M, BELLET M M, SASSONE-CORSI P, et al. Circadian clock proteins and immunity [J]. *Immunity*, 2014, 40(2): 178-86.
- [51] BHATTI J S, BHATTI G K, REDDY P H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders - A step towards mitochondria based therapeutic strategies [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(5): 1066-77.
- [52] DAI W, JIANG L. Dysregulated Mitochondrial Dynamics and Metabolism in Obesity, Diabetes, and Cancer [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 570.
- [53] HARMS M, SEALE P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential [J]. *Nat Med*, 2013, 19(10): 1252-63.
- [54] BOURNAT J C, BROWN C W. Mitochondrial dysfunction in obesity [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2010, 17(5): 446-52.
- [55] SPARKS L M, XIE H, KOZA R A, et al. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle [J]. *Diabetes*, 2005, 54(7): 1926-33.
- [56] FURUKAWA S, FUJITA T, SHIMABUKURO M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(12): 1752-61.
- [57] LI Z, JIANG T, LU Q, et al. Berberine attenuated the cytotoxicity induced by t-BHP via inhibiting oxidative stress and mitochondria dysfunction in PC-12 cells [J]. *Cell Mol*

Neurobiol, 2020, 40(4): 587-602.

[58]QIN X, JIANG M, ZHAO Y, et al. Berberine protects against diabetic kidney disease via promoting PGC-1 α -regulated mitochondrial energy homeostasis [J]. Br J Pharmacol, 2020, 177(16): 3646-61.

[59]LI W, LI D, KUANG H, et al. Berberine increases glucose uptake and intracellular ROS levels by promoting Sirtuin 3 ubiquitination [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109563.

[60]HARDIE D G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(10): 774-85.

[61]RAVERA S, GHIOTTO F, TENCA C, et al. Berberine affects mitochondrial activity and cell growth of leukemic cells from chronic lymphocytic leukemia patients [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 16519.

[62]CHENG Y, JI Y. Mitochondria-targeting nanomedicine self-assembled from GSH-responsive paclitaxel-ss-berberine conjugate for synergetic cancer treatment with enhanced cytotoxicity [J]. J Control Release, 2020, 318: 38-49.

[63]SMITH U, KAHN B B. Adipose tissue regulates insulin sensitivity: role of adipogenesis, de novo lipogenesis and novel lipids [J]. J Intern Med, 2016, 280(5): 465-75.

[64]CZECH M P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes [J]. Nat Med, 2017, 23(7): 804-14.

[65]CHEN X J, LIU W J, WEN M L, et al. Ameliorative effects of Compound K and ginsenoside Rh1 on non-alcoholic fatty liver disease in rats [J]. Sci Rep, 2017, 7: 41144.

[66]ENGİN A B. What Is Lipotoxicity? [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 960: 197-220.

[67]KONG W J, ZHANG H, SONG D Q, et al. Berberine reduces insulin resistance through protein kinase C-dependent up-regulation of insulin receptor expression [J]. Metabolism, 2009, 58(1): 109-19.

[68]CHANG W, ZHANG M, LI J, et al. Berberine improves insulin resistance in cardiomyocytes via activation of 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase [J]. Metabolism, 2013, 62(8): 1159-67.

[69]LIU L Z, CHEUNG S C, LAN L L, et al. Berberine modulates insulin signaling transduction in insulin-resistant cells [J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 317(1-2): 148-53.

[70]YUE S J, LIU J, WANG A T, et al. Berberine alleviates insulin resistance by reducing peripheral branched-chain amino acids [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2019, 316(1): E73-E85.

- [71] LENG S H, LU F E, XU L J. Therapeutic effects of berberine in impaired glucose tolerance rats and its influence on insulin secretion [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(4): 496-502.
- [72] KO B S, CHOI S B, PARK S K, et al. Insulin sensitizing and insulinotropic action of berberine from *Coptidis rhizoma* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(8): 1431-7.
- [73] ZHOU J, ZHOU S, TANG J, et al. Protective effect of berberine on beta cells in streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 606(1-3): 262-8.
- [74] VILLALOBOS-LABRA R, SUBIABRE M, TOLEDO F, et al. Endoplasmic reticulum stress and development of insulin resistance in adipose, skeletal, liver, and foetoplacental tissue in diabetes [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 66: 49-61.
- [75] BRANNMARK C, NYMAN E, FAGERHOLM S, et al. Insulin signaling in type 2 diabetes: experimental and modeling analyses reveal mechanisms of insulin resistance in human adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(14): 9867-80.
- [76] MOTA M, BANINI B A, CAZANAVE S C, et al. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Metabolism*, 2016, 65(8): 1049-61.
- [77] MOZZINI C, GARBIN U, STRANIERI C, et al. Endoplasmic reticulum stress and Nrf2 repression in circulating cells of type 2 diabetic patients without the recommended glycemic goals [J]. *Free Radic Res*, 2015, 49(3): 244-52.
- [78] KIM S H, SHIN E J, KIM E D, et al. Berberine activates GLUT1-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(11): 2120-5.
- [79] CHENG Z, PANG T, GU M, et al. Berberine-stimulated glucose uptake in L6 myotubes involves both AMPK and p38 MAPK [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760(11): 1682-9.
- [80] XU M, XIAO Y, YIN J, et al. Berberine promotes glucose consumption independently of AMP-activated protein kinase activation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103702.
- [81] CAO K, LV W, WANG X, et al. Hypermethylation of Hepatic Mitochondrial ND6 Provokes Systemic Insulin Resistance [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2021, 8(11): 2004507.
- [82] ZHANG R, HOU T, CHENG H, et al. NDUFB1 protects against obesity and insulin resistance by enhancing mitochondrial metabolism [J]. *FASEB J*, 2019, 33(12): 13310-22.
- [83] 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.
- [84] WANG Y, TONG Q, SHOU J W, et al. Gut Microbiota-Mediated Personalized Treatment of Hyperlipidemia Using Berberine [J]. *Theranostics*, 2017, 7(9): 2443-51.
- [85] ZHANG X, ZHAO Y, XU J, et al. Modulation of gut microbiota by berberine and metformin during the treatment of high-fat diet-induced obesity in rats [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14405.
- [86] ZHANG X, ZHAO Y, ZHANG M, et al. Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42529.
- [87] SUN R, YANG N, KONG B, et al. Orally Administered Berberine Modulates Hepatic Lipid Metabolism by Altering Microbial Bile Acid Metabolism and the Intestinal FXR Signaling Pathway [J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 91(2): 110-22.
- [88] BRAY G A, HEISEL W E, AFSHIN A, et al. The Science of Obesity Management: An Endocrine Society Scientific Statement [J]. *Endocr Rev*, 2018, 39(2): 79-132.
- [89] KOVES T R, USSHER J R, NOLAND R C, et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance [J]. *Cell Metab*, 2008, 7(1): 45-56.
- [90] RICHARDSON D K, KASHYAP S, BAJAJ M, et al. Lipid infusion decreases the expression of nuclear encoded mitochondrial genes and increases the expression of extracellular matrix genes in human skeletal muscle [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(11): 10290-7.
- [91] MORINO K, PETERSEN K F, SHULMAN G I. Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction [J]. *Diabetes*, 2006, 55 Suppl 2: S9-S15.
- [92] YI C M, YU J, KIM H, et al. Identification of actin as a direct proteomic target of berberine using an affinity-based chemical probe and elucidation of its modulatory role in actin assembly [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2017, 53(52): 7045-7.
- [93] SEALE P, BJORK B, YANG W, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch [J]. *Nature*, 2008, 454(7207): 961-7.
- [94] COHEN P, LEVY J D, ZHANG Y, et al. Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch [J]. *Cell*, 2014, 156(1-2): 304-16.
- [95] XU X, YI H, WU J, et al. Therapeutic effect of berberine on metabolic diseases: Both pharmacological data and clinical evidence [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133:

110984.

[96] YANG J, YIN J, GAO H, et al. Berberine improves insulin sensitivity by inhibiting fat store and adjusting adipokines profile in human preadipocytes and metabolic syndrome patients [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012: 363845.

附录一

不同月龄 db/db 小鼠心脏转录组共同差异基因

Associated Gene Name	log ₂ FoldChange (M1vsCK)	log ₂ FoldChange (M6vsCK)	log ₂ FoldChange (M12vsCK)
Gm26992	7.97	7.60	7.58
Ptgds	0.78	2.39	2.14
Myh7	1.99	1.40	1.63
Slc41a3	1.74	2.10	1.51
Zfp608	1.75	1.28	1.46
Gm14327	-1.03	1.20	0.98
Ddx3x	0.78	0.86	0.95
Acsn5	-1.06	1.17	0.86
Actc1	-0.80	-0.86	-0.38
Plxna2	-1.14	-1.06	-0.55
Sec14l1	-0.79	-1.15	-0.60
Snrk	-1.01	-0.76	-0.69
Adamts9	-1.29	-1.06	-0.75
Rbm38	-0.84	-0.87	-0.76
Siah2	-0.87	-1.58	-0.77
Zfp366	-0.81	-2.12	-0.78
Rapgef2	-0.73	-1.28	-0.80
Plod1	-0.78	-1.14	-0.88
Fgfr3	-1.15	-1.67	-0.89
Coq10b	-1.64	-0.87	-0.91
Irf2bp2	-0.60	-1.35	-0.95
Ccr12	-1.09	-0.86	-1.00
Cntfr	-1.35	-1.76	-1.01
Plekhg2	-0.72	-1.21	-1.05
Trib1	-1.35	-1.35	-1.12
1810011O10Rik	-0.88	-2.26	-1.13
Mylk4	-1.28	-2.29	-1.18
Tinag11	-1.14	-1.18	-1.19
Ppargc1a	-1.85	-1.42	-1.19
Fam131a	-0.78	-1.17	-1.22
Mcf2l	-1.69	-1.39	-1.25
Banp	-1.18	-1.58	-1.27
Slc4a8	-1.14	-1.63	-1.35
Rgcc	-1.20	-1.40	-1.36
Per2	-3.78	-1.41	-1.39
Cys1	-1.32	-1.42	-1.42
Rin3	-1.55	-1.36	-1.42
Slc25a33	-1.69	-1.48	-1.78
Eno3	-0.63	-1.82	-1.97
Nr4a3	-4.02	-2.08	-2.35

附录二

过表达 *Trib1* 细胞测序产热基因变化

Gene ID	Gene	C1 FPKM	C2 FPKM	C3 FPKM	OE1 FPKM	OE2 FPKM	OE3 FPKM
ENSMUSG000000064351	mt-Co1	1700.504	1682.717	1868.665	2925.79	2721.997	3420.504
ENSMUSG000000064370	mt-Cytb	582.8285	546.0423	538.2312	901.0624	891.1548	1118.955
ENSMUSG000000041697	mt-Nd1	553.0393	542.0296	611.7601	606.5512	650.0468	668.4827
ENSMUSG000000064341	mt-Nd4	424.921	416.4039	450.4299	1240.41	1127.675	1530.578
ENSMUSG000000064345	Scd1	404.4047	394.5141	390.7116	765.2601	757.7668	982.5922
ENSMUSG000000064367	mt-Nd2	297.9795	291.4868	308.7309	538.0649	554.8749	671.4329
ENSMUSG000000025393	Fasn	226.1684	227.4687	242.134	265.7624	277.1232	293.7131
ENSMUSG000000062825	Fabp4	185.7357	193.6541	192.6567	225.5852	219.4	230.4798
ENSMUSG000000064363	Lpl	199.5069	185.0342	197.3903	341.2833	341.3016	429.466
ENSMUSG000000064368	Eef1a1	188.6397	174.366	198.6894	407.1495	447.0466	548.599
ENSMUSG000000036751	Aldoa	140.6713	140.5266	146.6215	160.4517	177.5738	182.3863
ENSMUSG000000029580	mt-Rnr2	122.7986	121.7719	138.254	303.0783	294.8071	313.3337
ENSMUSG000000014294	mt-Nd5	122.3204	119.6655	119.9857	126.2278	141.7381	140.3973
ENSMUSG000000026895	C3	92.72103	100.5891	99.0291	106.17	111.3676	114.3986
ENSMUSG000000020163	Fth1	78.66462	82.56881	88.877	128.8081	126.4808	137.798
ENSMUSG000000036199	Fnl	74.48027	82.05958	82.33821	95.3842	96.94782	105.8211
ENSMUSG000000018770	Atp5b	81.27788	79.55569	91.89724	103.3059	111.4552	118.1525
ENSMUSG000000044894	mt-Rnr1	78.5804	76.99827	86.78573	103.5084	103.8094	109.2269
ENSMUSG000000025509	Bsg	77.44777	70.86534	86.77573	87.10038	96.43567	115.5379
ENSMUSG000000013593	Eef2	73.4845	70.51319	80.18936	86.33256	90.72602	96.21374
ENSMUSG000000071014	Coll1a1	57.41073	64.21081	70.43595	81.32545	87.12374	90.37842

ENSMUSG000000031231	Colla2	63.87686	63.44079	68.72222	79.14241	84.09991	88.54812
ENSMUSG00000028648	Gpd1	61.10899	62.61554	69.71219	74.16906	81.80756	83.17221
ENSMUSG000000061518	mt-Co2	62.24383	62.04863	70.20592	73.15095	82.6302	83.67535
ENSMUSG00000032330	Mdm2	55.47226	59.03372	58.32458	62.23166	70.59587	71.6231
ENSMUSG00000029632	Pkm	60.84692	58.65658	67.33347	90.73794	90.93662	94.23612
ENSMUSG000000000171	Vim	58.59323	55.95215	60.69147	73.02602	75.47036	78.83389
ENSMUSG000000016427	Ucp1	60.32135	54.11317	72.63738	115.7458	133.8813	126.545
ENSMUSG000000021520	mt-Atp6	50.23238	52.3301	53.72978	53.04207	63.95763	67.95411
ENSMUSG00000026032	Ero1l	53.44389	50.27557	56.77622	59.47176	66.01855	75.86586
ENSMUSG000000050856	Ldha	42.09797	43.9229	45.12475	60.4648	75.57806	62.49301
ENSMUSG000000000399	Hsp90ab1	41.6348	40.53172	46.18774	54.15117	55.76079	60.13828
ENSMUSG000000059734	Psap	35.12441	38.94435	40.29961	45.69341	48.99328	45.61517
ENSMUSG000000031565	Col4a1	38.08106	36.85014	42.14949	44.53076	46.83976	46.45978
ENSMUSG000000035674	Pgk1	33.80152	35.92219	36.51405	42.46727	46.36857	46.2263
ENSMUSG00000022956	P4hb	29.88989	31.71888	31.73971	38.54461	40.74324	45.73617
ENSMUSG000000017188	Bgn	27.43087	27.74812	27.10111	37.93503	39.70344	39.31427
ENSMUSG000000014313	Sparc	27.19253	25.73988	29.95986	34.78499	39.60305	40.76946
ENSMUSG00000026260	Col6a3	26.63689	25.4661	26.4695	28.40553	30.36944	32.17701
ENSMUSG000000038690	Eno1	22.07317	23.5354	24.6573	29.88465	33.73666	35.57257
ENSMUSG000000000088	B2m	23.5528	23.15202	25.47787	27.1846	28.43355	29.35517
ENSMUSG000000058076	Tkt	25.06505	22.71398	25.65863	29.21038	31.82017	34.11583
ENSMUSG00000022820	Thrsp	22.70483	22.60104	24.18623	25.4015	27.08694	28.44813
ENSMUSG00000022890	Col3a1	22.1036	21.28949	22.22028	25.85756	26.94415	28.74462
ENSMUSG00000022994	H2-D1	20.47159	20.88999	20.4931	23.96021	23.25389	24.19933
ENSMUSG000000064354	Col4a2	21.65791	19.6577	30.01783	58.55549	47.21908	53.3716
ENSMUSG000000002379	Glul	16.7495	19.07317	22.19871	29.80876	27.70242	32.96785
ENSMUSG000000027230	Cox6a1	17.57874	18.90228	19.12485	29.68484	31.01317	29.38383

ENSMUSG000000025204	Gpi1	17.9593	18.12241	21.3416	25.39845	27.51286	27.51432
ENSMUSG00000018796	Rplp0	20.70424	18.08893	27.32218	59.70768	74.85013	79.43886
ENSMUSG00000025369	Pnpla2	19.36582	18.03889	19.74419	22.22975	21.07613	21.53474
ENSMUSG00000037152	Cox4i1	13.88941	14.3285	15.4986	21.21801	22.76417	23.48941
ENSMUSG00000018932	mt-Nd6	15.65018	13.92208	15.87549	21.81298	21.73195	24.36614
ENSMUSG00000028466	Cfd	14.39207	13.89357	13.08888	17.10256	16.59989	17.05465
ENSMUSG00000027305	mt-Co3	9.91116	10.912	11.51381	12.37856	14.37585	14.0331
ENSMUSG00000032187	Aco2	10.46233	10.83589	10.65266	15.11699	13.76411	14.46084
ENSMUSG00000033938	Tpt1	8.512025	9.430446	9.334685	12.66209	12.83481	14.17666
ENSMUSG00000025499	Col6a1	9.044246	9.260747	7.968613	10.75217	11.0868	11.96189
ENSMUSG00000038717	Pck1	8.730312	8.649361	8.984603	11.00636	11.3772	12.70934
ENSMUSG00000064357	Atp1a2	8.784111	8.323574	10.21846	18.79172	15.07886	18.7809
ENSMUSG00000025968	Tpi1	8.160981	7.808908	8.629592	10.89785	10.98752	11.26732
ENSMUSG00000031309	Ftl1	7.52686	7.377576	7.37409	8.717359	9.216902	8.708903
ENSMUSG00000006057	Hspa9	6.618363	7.111743	8.079791	11.94235	12.30308	12.68461
ENSMUSG00000027673	Aplp2	6.658871	6.696673	7.356124	7.708907	7.695347	8.478163
ENSMUSG00000064358	Rpsa	7.030856	6.179165	9.071059	12.41563	17.30153	15.70931
ENSMUSG00000032481	Gpx3	5.394496	5.886723	5.243155	7.661691	6.480307	6.773998
ENSMUSG00000024900	Fbln2	5.484513	5.679084	4.952767	12.72326	10.27839	11.33933
ENSMUSG00000020516	Uqcrrq	6.200187	5.492591	6.297426	7.44658	7.913588	8.473056
ENSMUSG00000024981	Rplp1	3.747494	3.882304	4.103345	8.870043	8.936788	8.82986
ENSMUSG000000042148	Cd36	3.547523	3.353067	4.14202	5.712601	5.505873	6.675729
ENSMUSG00000027671	Gm13394	3.014258	3.324389	3.729044	4.877095	4.23155	4.69714
ENSMUSG00000007880	Hspa5	3.261286	2.963587	3.088519	4.807255	4.171694	4.683575
ENSMUSG00000069729	Acly	2.816248	2.780297	2.873694	3.571807	3.422351	3.543948
ENSMUSG00000007783	Cidea	2.749167	2.757565	3.09018	4.479505	4.091191	4.636953
ENSMUSG00000028261	Acadl	2.13504	2.221248	2.439907	3.397033	3.369581	3.148262

ENSMUSG000000028495	Rps2-ps13	470.6184	485.0242	427.9861	372.1588	386.4194	378.4988
ENSMUSG000000031818	Mt1	284.9245	302.8296	297.0243	247.3729	259.9406	262.3563
ENSMUSG000000017778	Sdha	153.6333	161.8348	155.1036	115.5791	133.7665	125.7047
ENSMUSG000000040048	Rack1	110.634	108.0736	113.6368	88.8275	103.5901	101.6935
ENSMUSG0000000025781	Hadhb	104.7258	102.9947	102.3408	78.87977	86.60165	86.76151
ENSMUSG000000024248	Plod1	97.4542	98.08623	85.75713	73.58696	83.30201	74.16323
ENSMUSG000000024038	Gpx4	84.83873	87.47117	85.69862	66.28359	77.99333	74.43432
ENSMUSG000000021577	Dbi	85.99514	87.16527	91.28769	72.2039	78.46382	78.73503
ENSMUSG000000062683	Ctsb	80.64477	77.04712	74.96343	54.95057	62.07202	56.61728
ENSMUSG000000022450	Txnip	69.29888	71.18106	65.53662	37.80108	46.53794	40.73277
ENSMUSG000000022354	Hspa8	66.55724	63.86536	69.60922	51.84319	58.31279	57.0028
ENSMUSG000000000440	Cox8b	57.87648	59.07	63.8329	47.00079	53.8524	54.99986
ENSMUSG000000020153	Rps14	38.9759	41.66441	42.39679	35.27798	38.24554	35.69723
ENSMUSG000000050697	Lgals1	35.73962	38.61215	35.95158	18.00767	19.74923	18.92749
ENSMUSG000000053470	Gsn	22.23763	22.46987	21.12339	12.67681	12.98667	12.20571
ENSMUSG000000031278	Rpl4	21.30637	21.09643	20.85417	13.30017	13.28613	12.46246
ENSMUSG000000058881	Hspg2	15.22893	15.65778	14.3852	10.8224	10.62005	10.03102
ENSMUSG000000038205	Pgam1	14.08629	14.66703	12.95758	6.438152	8.141899	6.358086
ENSMUSG000000038648	Itm2b	13.09879	13.98676	13.12999	8.176342	8.750297	8.6028
ENSMUSG000000074218	Acaca	13.46436	12.38143	12.00651	6.742529	10.69927	7.850663
ENSMUSG000000005034	Dgat2	8.179713	8.76861	7.823966	7.091974	7.344077	7.07772
ENSMUSG000000034748	Lrp1	8.400536	8.519926	8.251073	7.134118	7.150075	5.783003
ENSMUSG000000000902	Ubb	6.840475	7.060716	7.338421	5.148164	5.512153	5.157094
ENSMUSG000000032883	Cav1	5.808117	6.376297	5.388178	2.832016	2.778829	2.232398
ENSMUSG000000030785	Acaa2	4.651832	5.912613	6.522442	2.989203	2.805936	2.322039
ENSMUSG000000026812	Sqstm1	5.240611	5.531118	4.885602	3.046049	2.817426	2.898301
ENSMUSG000000038773	Acs1l	4.566236	4.596709	3.993042	3.576847	3.179958	3.271118

ENSMUSG000000003644	Ghitm	4.148442	4.489013	4.301213	2.870967	3.096007	3.211373
ENSMUSG000000005580	Rpl8	4.091934	4.001337	3.965493	2.809464	2.696824	2.394153
ENSMUSG0000000048351	Acadm	3.399494	3.414506	3.038149	2.393803	2.657495	2.427318
ENSMUSG0000000021265	Cs	3.280952	3.110923	3.770681	2.438847	2.316321	2.387263
ENSMUSG0000000025958	Npc2	2.240346	2.438931	2.356647	2.12707	2.080181	2.003895
ENSMUSG0000000028944	Ctsd	2.43111	2.369951	2.637507	1.802566	2.055797	2.119936
ENSMUSG0000000030584	Cox8a	2.475946	2.200715	2.055416	1.613576	1.464841	1.597784
ENSMUSG0000000029167	Rps3	1.444335	1.529793	1.670461	1.224723	1.147264	1.106632
ENSMUSG0000000064351	mt-Co1	1700.504	1682.717	1868.665	2925.79	2721.997	3420.504
ENSMUSG0000000064370	mt-Cytb	582.8285	546.0423	538.2312	901.0624	891.1548	1118.955
ENSMUSG0000000041697	mt-Nd1	553.0393	542.0296	611.7601	606.5512	650.0468	668.4827
ENSMUSG0000000064341	mt-Nd4	424.921	416.4039	450.4299	1240.41	1127.675	1530.578

附录三

第一节 *Trib1* 敲除小鼠代谢表型

8 周龄野生型和 *Trib1* 敲除小鼠解剖图和血清炎症因子水平，及肾上腺素处理 8 周龄野生型和 *Trib1* 敲除小鼠 14 天后小鼠解剖图。

1 实验材料

1.1 实验动物

8 周龄野生型和 *Trib1* 敲除小鼠来源同第二章第二节实验动物。

1.2 实验试剂

同第二章第二节实验试剂。

1.3 实验仪器

同第二章第二节实验仪器。

2 实验方法

同第二章第二节实验方法。

3 实验结果

3.1 8 周龄 *Trib1* 敲除小鼠解剖图

分离 8 周龄野生型小鼠和 *Trib1* 敲除小鼠的脏器，并称重记录。各脂肪组织无明显差异，小鼠脾脏增大。

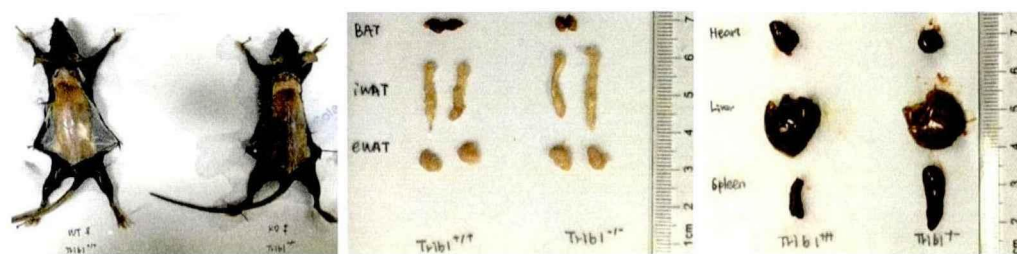


Figure 5-1 Organ anatomy of *Trib1* knockout mice. Anatomical diagram of adipose tissue and major organs of *Trib1* knockout mice.

3.2 *Trib1* 敲除对小鼠血清炎症因子的影响

对 8 周龄野生型小鼠和 *Trib1* 敲除小鼠的血清炎症因子水平进行测定，结果显示敲除小鼠血清促炎因子 CRP、IL-1 β 和 TNF- α 表达水平显著升高，而抗炎因子 IL-10 表达水平显著降低。

除此之外，M1 型巨噬细胞由 LPS 及 IFN- γ 激活，分泌高水平的 TNF- α 和 IL-1 β ，而 M2 型巨噬细胞由 IL-4 激活，主要分泌 IL-10 等抗炎细胞因子抑制 M1 巨噬细胞^[1-2]。本研究结果表明，*Trib1* 敲除小鼠炎症水平上升，且巨噬细胞向 M1 型极化增多，这也与以往研究发现 *Trib1* 敲除导致 M2 型巨噬细胞减少的结果一致^[3]。

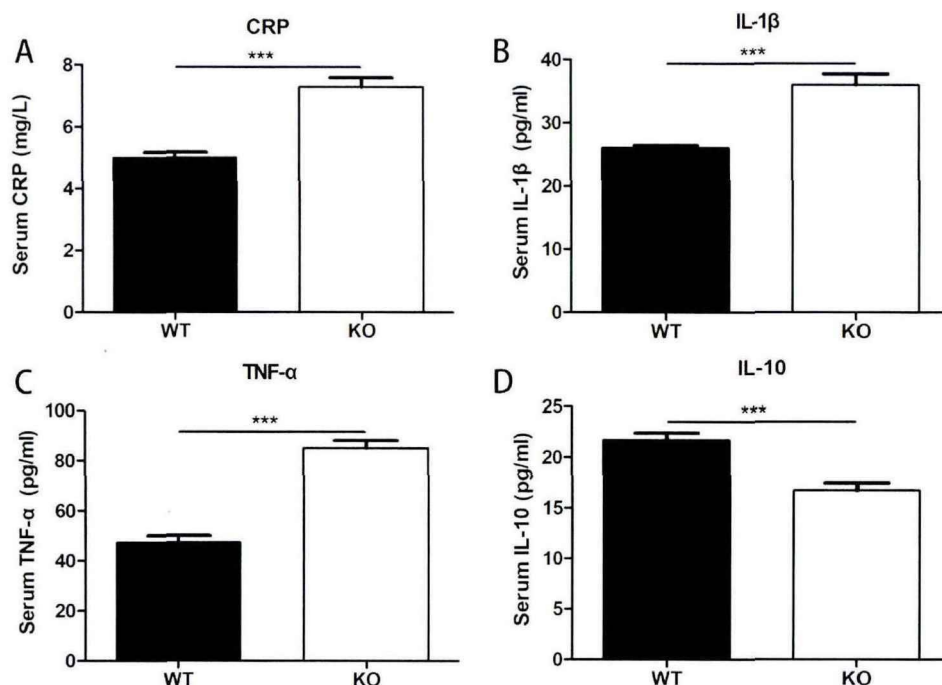


Figure 5-2 Serum inflammatory factor levels in wild-type mice and *Trib1* knockout mice. Inflammation-related serum CRP (A), interleukin-1 β (B), TNF- α (C) and interleukin-10 (D) expression levels in mice. Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 5). *** P < 0.001 vs. *Trib1* WT mice.

3.3 8 周龄 *Trib1* 敲除小鼠解剖图

分离 β_3 肾上腺素受体激动剂处理的野生型小鼠和 *Trib1* 敲除小鼠的脏器，并称重记录。与野生型相比，*Trib1* 敲除小鼠白色脂肪无明显差异，棕色脂肪和肝脏偏白，脾脏明显增大。



Figure 5-3 Organ anatomy of CL316243-treated *Trib1* knockout mice. Anatomical diagram of adipose tissue and major organs of CL316243-treated *Trib1* knockout mice.

4 小结

第二章的结果表明，8 周龄 *Trib1* 敲除小鼠表现出高血脂、胰岛素抵抗和瘦素抵抗等肥胖小鼠的代谢表征。除此之外，*Trib1* 敲除小鼠表现出肥胖相关的血清炎症因子水平升高。而 β_3 肾上腺素受体激动剂处理的 *Trib1* 敲除小鼠肝脏重量增加，肝质发白，表现出蓄积脂质增多的脂肪肝特征。

第二节 Trib1 杂合敲除小鼠代谢表型

Trib1 纯合敲除小鼠出生率低，且相关文献报道 *Trib1* 杂合敲除抑制高脂饮食诱导的肥胖^[4]。因此本节通过 8 周龄野生型和 *Trib1* 杂合敲除小鼠，探究 *Trib1* 杂合敲除对小鼠体重、血脂、和产热的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物

8 周龄野生型和 *Trib1* 杂合小鼠来源同第二章第二节实验动物。

1.2 实验试剂

同第二章第二节实验试剂。

1.3 实验仪器

同第二章第二节实验仪器。

2 实验方法

同第二章第二节实验方法。

3 实验结果

3.1 Trib1 杂合敲除对小鼠胰岛素敏感性和葡萄糖耐量的影响

为了评估小鼠胰岛素敏感性，本研究进行了葡萄糖耐量测试（Glucose tolerance test, GTT）和胰岛素耐量测试（Insulin tolerance test, ITT）。结果显示 *Trib1* 杂合敲除小鼠和野生型小鼠的葡萄糖耐量和胰岛素敏感性无显著差异。

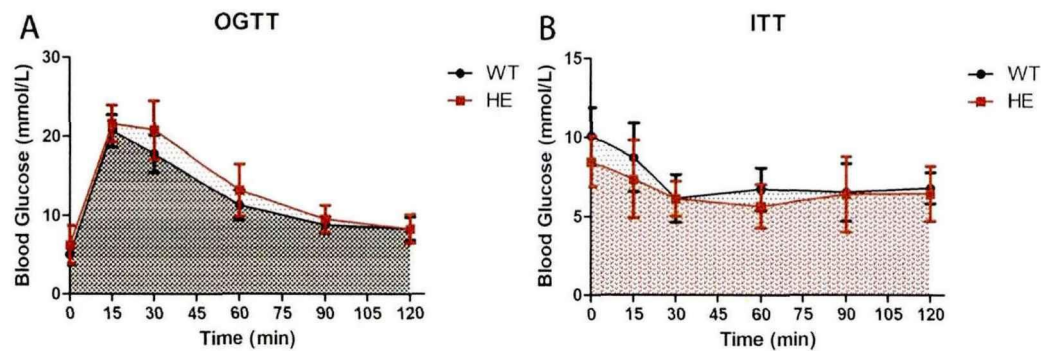


Figure 5-4 Effects of *Trib1* heterozygous knockout on insulin sensitivity and glucose

tolerance in mice. The oral glucose tolerance test (OGTT) was performed in various groups, and the values of the area under the curve (A). Insulin tolerance test (ITT) was performed in various groups, and the values of the area under the curve (B). Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 6). *ns* > 0.05 vs. control group.

3.2 Trib1 杂合敲除对小鼠体成分的影响

通过体脂仪对 8 周龄野生型小鼠和 Trib1 杂合敲除小鼠的脂肪、瘦肉和自由水含量进行测定，结果显示 Trib1 杂合敲除小鼠和野生型小鼠的体成分无显著差异。

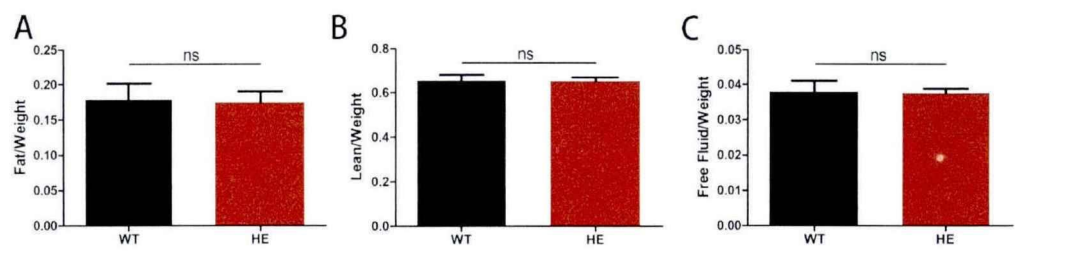


Figure 5-5 Effects of *Trib1* heterozygous knockout on body fat, lean and free fluid in mice. Fat mass-to-body weight ratio (A), lean -to-body weight ratio (B) and free fluid -to-body weight ratio (C). Data are presented as mean $\pm$ SD (n = 6). *ns* > 0.05 vs. control group.

3.3 Trib1 杂合敲除对高脂饮食处理的小鼠摄食和生长曲线的影响

高脂饮食喂养 8 周龄野生型小鼠和 Trib1 杂合敲除小鼠 12 周，记录每周小鼠摄食量和体重。结果显示 8 周龄野生型小鼠和 Trib1 杂合敲除小鼠和摄食和体重无显著差异。有文献提出 Trib1 的杂合敲除通过抑制高脂饮食诱导的促炎因子表达，防止高脂饮食诱导的肥胖。该研究提出 Trib1 在小鼠急性和慢性炎症中上调，抑制或敲低 Trib1 可以抑制肥胖⁴。本研究采用高脂饮食诱导 Trib1 杂合敲除小鼠，但并未观察到 Trib1 杂合敲除抑制肥胖。

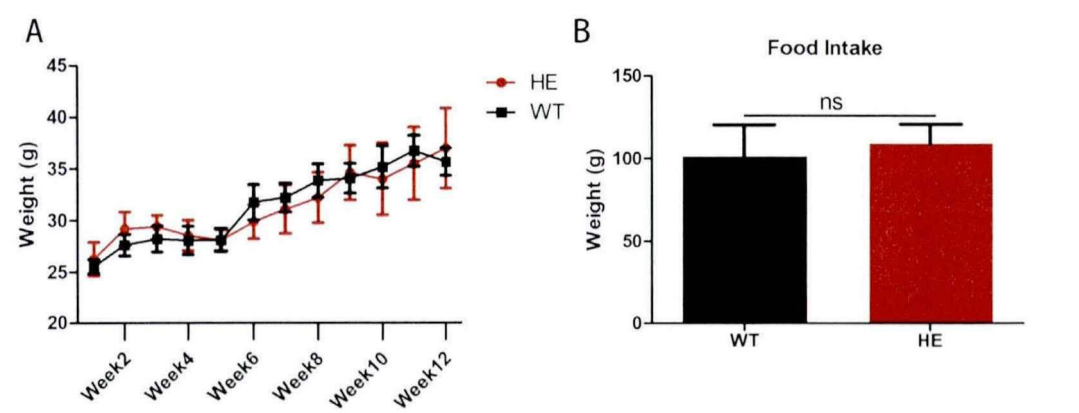


Figure 5-6 Effects of *Trib1* heterozygous knockout on body weight and food intake in mice treated with high-fat diet. Body weight curves (A) and food intake (B) in *Trib1* heterozygous knockout mice fed high-fat for 12 weeks. *ns* > 0.05 vs. control group.

3.4 *Trib1* 杂合敲除对高脂饮食处理的小鼠胰岛素敏感性和葡萄糖耐量的影响

在高脂饮食处理 12 周后，为了评估小鼠胰岛素敏感性，本研究进行了 GTT 和 ITT。结果显示高脂处理后 *Trib1* 杂合敲除小鼠和野生型小鼠的葡萄糖耐量和胰岛素敏感性无显著差异，与前期结果一致。

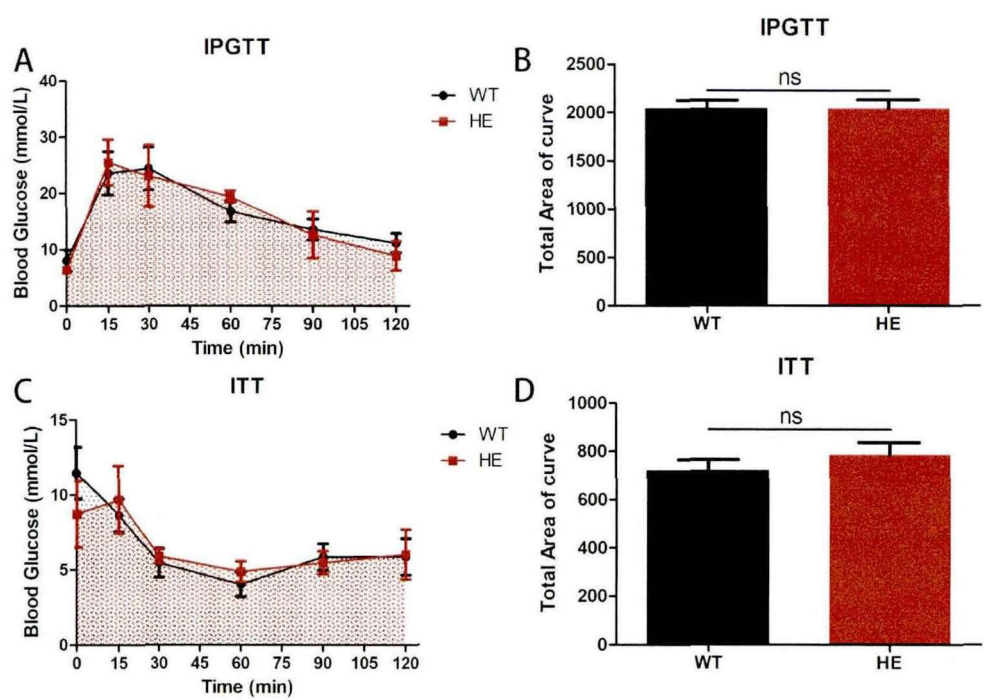


Figure 5-7 Effects of *Trib1* heterozygous knockout on insulin sensitivity and glucose tolerance in mice treated with high-fat diet. The oral glucose tolerance test (OGTT) was performed in various groups, and the values of the area under the curve (A, B). Insulin tolerance test (ITT) was performed in various groups, and the values of the area under the curve (C, D). Data are presented as mean $\pm$ SD (*n* = 6). *ns* > 0.05 vs. control group.

4 小结

已有文献报道 *Trib1* 的杂合敲除可以抑制高脂饮食诱导的肥胖，但本研究结果表明 *Trib1* 杂合敲除不能抑制小鼠体重增长，与野生型无显著差异。除此之外，8 周龄 *Trib1* 纯合敲除小鼠表现出高血脂、胰岛素抵抗和瘦素抵抗等肥胖小鼠的代谢表

征, 该结果表明 *Trib1* 敲除反而诱导小鼠肥胖的发生。

参考文献

- [1] SCHMIEDER A, MICHEL J, SCHONHAAR K, et al. Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages [J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22(4): 289-97.
- [2] SHAPOURI-MOGHADDAM A, MOHAMMADIAN S, VAZINI H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6425-40.
- [3] SATOH T, KIDOYA H, NAITO H, et al. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages [J]. *Nature*, 2013, 495(7442): 524-8.
- [4] OSTERTAG A, JONES A, ROSE A J, et al. Control of adipose tissue inflammation through TRB1 [J]. *Diabetes*, 2010, 59(8): 1991-2000.

主持及参加课题情况：

主持课题：

北京协和青年基金项目“Trib1 调控脂肪棕色化抑制肥胖的分子机制研究”。

参加课题：

国家重点研发计划项目“高品质道地灵芝、太子参质量评价”。

国家自然科学基金重点支持项目“基于肠道菌群与三七皂苷互作效应研究血塞通治疗缺血性脑卒中的质量表征及药理作用机制”。

致谢

星霜荏苒，五年时光悄然而逝。从科研楼前挺拔苍翠的梧桐树下走过的时候，才发觉药植园的春夏秋冬都印在了我的心里。晚归伴我的星子，晨起引我的旭阳，记忆像胶片一样因时光流逝而重叠褪色，但师长亲朋一路的陪伴在时光长河的打磨下越发闪烁珍贵。

首先我要感谢我的导师孙晓波研究员！我点点滴滴的进步都与孙老师的指导密不可分！孙老师渊博的知识，严谨的作风，求实的态度，以及对事业孜孜不倦的追求，深深地感染和激励着我。在求学路上，孙老师开阔的思维、敏锐的洞察力以及详细的修改意见让我顺利地完成了毕业课题。仰之弥高，钻之弥坚，孙老师的一言一行是我终身学习的榜样。

在生活上，我要感谢魏菲老师！我会记得科研学习艰难难眠时，魏老师的关怀劝慰；我会记得春节异地留守时，魏老师的温暖陪伴；我会记得头疼脑热时，放在桌上的一盒盒药。魏老师豁达坦率的处事风范和广博的胸襟，更使我明白了为人处事的道理。凯风自南，吹彼棘心，魏老师勉励我的每一句话像阳光抚慰我心。五年的相处，写来总是纸短情长，在以后的工作中唯有更加努力，才能不负恩师的教导和期望。

感谢罗云老师对我科研学习的帮助！教会我更完善的科研思路与计划，教会我更有逻辑的展示与演讲，教会我理解科研学习上的磨炼与坚持。感谢课题组的孙桂波老师、孙潇老师、董曦老师、陈荣昌老师、邢小燕老师、王敏老师和张彬老师在实验技术上的指导和帮助。

感谢课题组的师兄师姐和师弟师妹们！在五年的科研学习中，同门间的学习交流，加油鼓劲助我良多。在我科研学习遭遇困难或独木难支时，陪我分析实验问题，帮我实验取材。我感谢并喜欢我们融洽的学习生活氛围，火锅袅袅白烟中的直言快语，安河桥北骑行回归时的飒飒风声都深刻留存在我的脑海中。从最初见面时拘谨礼貌的微笑，到离别时的不舍挥别。时光送给我们一场最好的相遇，江湖人也道：相逢即是缘，愿我们聚是一团火，散是满天星！

感谢我的朋友张晨阳，陪我撑过一把伞，陪我走过一段灯火幽微的路，陪我站在雪松下笑得眉眼弯弯。感谢灵秀智慧的齐睿娟，惠心妍状的崔晟榕，温柔可亲的邱霄霄！感谢这五年学习生活中的包容和陪伴，很高兴能遇到你们。

感谢研究生处的林佳老师，刘俭老师、张翔老师在我生活、学习和找工作过程中的关心和帮助。感谢陶雪班长、秦家安班长、李西蒙班长和吴道顺班长在我五年硕博学习中的帮助和支持。

谢谢徐小涵对我的鼓励和支持，在你身上我看到了永远向上的心。谢谢范袁铭

同学帮忙进行的数据分析。感谢熊燕老师对细胞培养相关问题的解答。

感谢疫情期间奋战在一线的工作人员！感谢你们的逆流而上、负重前行！

感谢我的父亲母亲！我不怕摔跤，我勇敢奔跑，是因为我知道回头总会看见你们鼓励支持的目光。从我记事到懂事，回想起生活中的细节，总会更深的体会到你们对我的呵护。我记得精打细算的妈妈总会在早上掰碎喂我一颗热乎的鸡蛋和一杯牛奶，我记得爸爸粗糙的手总能为我扎一个好看的小辫。你们对我严格的要求，让我在多年的异地求学中仍能独立挺拔向阳生长。

最后由衷感谢每一位在百忙之中抽出时间来参与论文审阅、评议以及答辩的专家和老师。