

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.07.001

· 基础研究 ·

冷刺激对小鼠脂肪组织褐色化和脂代谢的影响*

郁 苗 陆 叶 汪文敏 宋海昭 徐 俐 周林康[△]

(清华大学生命科学院 北京 100084)

摘要 目的:探讨 4 摄氏度冷刺激对小鼠脂肪组织褐色化的影响。**方法:**野生型小鼠在 4 摄氏度环境下饲养一周,称取小鼠重量并取不同的脂肪组织固定,进行 H&E 染色;对血液中甘油三酯、脂肪酸的水平进行检测;检测不同脂肪组织中脂肪含量和相关蛋白的表达水平。**结果:**野生型小鼠在 4℃ 环境下饲养一周后体重明显降低。血液中甘油三酯、脂肪酸和甘油的水平明显下降。皮下白色脂肪组织(subcutaneous white adipose tissue, SWAT),腹腔生殖腺旁白色脂肪(gonadal visceral white adipose tissue, GWAT)和褐色脂肪(brown adipose tissue, BAT)中的脂肪含量明显降低,其中 SWAT 和 BAT 中脂肪含量降低近 50%。SWAT 发生明显的褐色化现象,组织中出现含有多个脂滴的脂肪细胞,同时褐色化的标志蛋白 UCP1(uncoupling protein 1)和 Cidea 明显增加。GWAT 中脂滴仍呈现单室大脂滴,脂肪细胞变小,脂肪积累降低约 14%,低于 SWAT 和 BAT 中的相应变化。BAT 组织中脂滴明显变小,UCP1 的表达明显增加。同时我们在三种脂肪组织中都观察到线粒体相关蛋白 CPT1 (Carnitine palmitoyltransferase I) 的明显增加。**结论:**冷刺激能明显改变小鼠的脂代谢状态,全身的脂肪积累明显降低。SWAT 发生明显的褐色化现象,Cidea 和 UCP1 的表达明显增加。SWAT, GWAT 和 BAT 脂肪组织中有明显的线粒体活性的增加。

关键词:冷刺激;脂肪组织;脂肪积累;褐色化;线粒体

中图分类号:Q95-3;Q493.5;Q591.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)07-1201-05

The Effect of Cold Stimulation on Fat Tissue Browning and Lipid Metabolism in Mice*

YU Miao, LU Ye, WANG Wen-min, SONG Hai-zhao, XU Li, ZHOU Lin-kang[△]

(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

ABSTRACT Objective: Here, we wanted to investigate the role of cold stimulation in regulating fat tissue browning and whole body lipid metabolism in mice. **Methods:** The mice were maintained at 4℃ for 1 week. Mice body weight was measured. Fat tissues were collected and fixed for H&E staining. Serum levels of TAG, FFA and glycerol were measured. Fat tissue TAG content and protein expression profile were analyzed. **Results:** Compared to control mice, the body weight of mice was reduced after cold-stimulation for 1 week. The serum levels of triglyceride, free fatty acids and glycerol were decreased. The TAG contents in SWAT (subcutaneous white adipose tissue), GWAT (gonadal visceral white adipose tissue) and BAT (brown adipose tissue) were dramatically reduced in cold-stimulated mice, especially nearly 50% reduction in SWAT and BAT. Browning phenotype was observed in SWAT of cold-stimulated mice with the appearance of adipocytes with multilocular lipid droplets and high expression of UCP1 (uncoupling protein 1) and Cidea. Lipid droplets in GWAT were still unilocular under cold stimulation. The size of lipid droplet was reduced in GWAT with 14% reduction in TAG content under cold stimulation. The expression of UCP1 and Cidea was not significant induced in GWAT, indicating that browning did not occur in GWAT. The BAT of cold-stimulated mice had smaller lipid droplets and higher expression of UCP1. Higher expression of CPT1 (Carnitine palmitoyltransferase I) in SWAT, GWAT and BAT of cold-stimulated mice was observed. **Conclusion:** Cold stimulation could dramatically affect the lipid metabolism status of mice. Whole body fat accumulation was dramatically reduced in cold-stimulated mice. Browning occurred in SWAT with the induction expression of UCP1 and Cidea. All fat tissue showed elevated expression of CPT1, a mitochondrial related protein.

Key words: Cold stimulation; Fat tissues; Lipid accumulation; Browning; Mitochondria

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; Q493.5; Q591.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)07-1201-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31771303);中国博士后科学基金项目(2013T60103,2012M520249);

中国科学技术协会 2016-2018 年度青年人才托举计划项目

作者简介:郁苗(1988-),博士研究生,主要研究方向:代谢生物学,电话:01062797133, E-mail: yumiao918@163.com

△ 通讯作者:周林康,博士,助理研究员,主要研究方向:代谢生物学,电话:01062797133, E-mail: zhoulinkang@mail.tsinghua.edu.cn

(收稿日期:2018-06-30 接受日期:2018-07-25)

前言

代谢性疾病如肥胖、糖尿病、脂肪肝等近年来发展迅速,严重威胁人类健康。其中脂肪组织的脂代谢稳态在代谢性疾病的发生发展中起到关键作用^[1]。脂肪组织是储存脂类的重要器官,脂肪组织里的细胞类型很多,不仅仅是脂肪细胞,还包括内皮细胞、巨噬细胞、泡沫细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和成骨纤维细胞等。各个种类的细胞的数量,和脂肪组织的生理状态有关^[2]。根据脂肪细胞的形态、功能,脂肪细胞主要可以分为白色脂肪细胞(White Adipocytes)、褐色脂肪细胞(Brown Adipocyte)和米色脂肪细胞(Brite Adipocyte or Beige Adipocyte)^[3,4]。白色脂肪细胞的典型特征是细胞内有唯一的脂滴,UCP1(uncoupling protein 1,解偶联蛋白1)几乎不表达,线粒体活性较低,主要负责能量储存。褐色脂肪细胞中 UCP1 蛋白表达较高,含有多个较小的脂滴,线粒体活性较高,主要负责产热,维持体温。米色脂肪组织中 UCP1 也有表达,线粒体活性介于白色和褐色脂肪之间^[5,6]。调控脂肪细胞类型的分化和功能转化是调节机体能量代谢的重要手段之一。

白色脂肪组织可以分为皮下白色脂肪组织(Subcutaneous White Adipose Tissue)和内脏白色脂肪组织(Visceral White Adipose Tissue),两者虽然都是白色脂肪组织,但是过量的内脏白色脂肪组织往往与代谢疾病有关,而过量的皮下白色脂肪组织则被认为是在脂毒性中是起保护性作用的^[3]。这两种解剖分布上不同的白色脂肪组织有不同代谢性质的原因仍不清楚。在代谢领域的研究中,大部分工作会将腹股沟皮下脂肪组织(inguinal scWAT,简称 SWAT)和生殖腺周边内脏脂肪组织(gonadal visceral WAT,简称 GWAT)作为两种不同白色脂肪组织的代表来进行研究。

白色脂肪组织的“再编程”,也就是米黄色脂肪组织的形成,称作白色脂肪组织的褐色化(Browning),在寒冷刺激下小鼠的皮下脂肪组织会发生明显的褐色化,UCP1 的表达明显增加^[7]。之前的研究主要关注于皮下脂肪组织的褐色化,本研究主要关注冷刺激下皮下脂肪组织、内脏脂肪组织和褐色脂肪组织中 UCP1 以及线粒体相关蛋白的变化情况,以系统阐述机体在冷刺激下脂肪组织脂代谢的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用小鼠为野生型二月龄 C57BL/6J 品系。小鼠购自于清华大学实验动物平台。甲醇等有机溶剂购买自京纯。甘油三酯检测试剂盒货号 TR0100,购自 sigma。脂肪酸检测试剂盒货号为 294-63601,购自 wako。Cidea 一抗为本实验室自制;tubulin 一抗(T0198)购自 Sigma-Aldrich;CPT1 一抗(sc-393070)和 CPT2(sc-20671)一抗购自 Santa Cruz;UCP1 一抗(ab10983)购自 Abcam。二抗采用的是 GE Health 的 HRP-conjugated 二抗系列,鼠二抗货号 NA931V,兔二抗货号 NA934V。

1.2 方法

1.2.1 小鼠实验 实验中使用的小鼠均为 C57BL/6J 野生型小鼠。小鼠购自于清华大学实验动物平台,并由清华大学实验动物平台在已被 AAALAC (Association for Assessment and Ac-

creditation of Laboratory Animal)认证的饲养条件下饲养。小鼠饲养使用的饲料为华阜康公司的大小鼠繁殖饲料,由平台统一购买,正常饲养温度为 22 ℃。小鼠两个月大时进行 4 ℃ 冷刺激实验,实验一周后进行称重、处死、解剖、取相应组织进行固定和冻存。所有的动物实验均符合清华大学的相关规定,并且受到清华大学实验动物伦理委员会的监督。

1.2.2 血液生化指标的测定 对小鼠进行麻醉后心脏取血。取出的血液置于离心管中,室温 4000 rpm 离心 30 min,上清即为血清。使用 Sigma-Aldrich 的检测试剂盒检测血清中的 TAG 和甘油,使用 Wako 的 FFA 检测试剂盒检测游离脂肪酸。

1.2.3 H&E 染色 剪下约黄豆大小的组织小块,将其在 10 % 的福尔马林溶液中固定 1 h 后脱水透明处理。然后组织块用石蜡包埋,使用自动切片机切出 5 μm 薄的切片。用苏木精-伊红对切片进行染色(H&E 染色),在显微镜下观察并使用尼康相机拍照。

1.2.4 组织脂类抽提与薄层层析 脂类抽提:取 50 mg 组织,加入 1.25 mL PBS 缓冲液后进行匀浆。匀浆后加入 5 mL 体积比 2:1 的甲醇-氯仿,剧烈震荡,1000 rpm 离心 10 min。收集离心后中间的蛋白层,用 0.2 M 氢氧化钾溶液溶解,使用 Bradford 法测定蛋白浓度作为内参。将离心后的下层有机相用玻璃注射器转移至玻璃管中,在氮气保护下挥发干净有机溶剂,加入一定体积的甲苯重悬脂类,制得脂类样品液。

薄层层析:将一定量的样品液用上样针点在层析板上,将板下沿浸入层析液(配方为正己烷:乙醚:乙酸=70:30:1)中,等待样品在层析液的作用下展开。使用染色液(10 % w/v 的磷酸铜,10 % v/v 的磷酸溶液)对层析板染色 30 s,随后在 120 ℃ 显色 10 min 左右。扫描显色后的 TLC 板,利用 Quantity One 4.6 软件进行定量分析。

1.2.5 蛋白免疫印迹法(western blot) 小鼠组织在匀浆后 10000 rpm 离心 20 min 得到上清。使用 Bio-Rad 试剂盒测定蛋白浓度作为内参,在保证蛋白量一致的情况下确定组织上清液体积。在组织上清液中加入 5× 上样缓冲液(5× loading buffer)后 95 ℃ 加热 30 min,即可获得组织样品。

使用 Bio-rad 的 western blot 电泳系统进行实验。将样品和标准分子量指示蛋白样品加到双层 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的上样孔中,恒压 60 V 跑胶。当溴酚蓝指示剂从浓缩胶进入下层分离胶时,调到恒压 100 V 跑胶。溴酚蓝指示剂到达底部时停止跑胶,使用恒流 300 mA,1 h 将胶上的蛋白转移到 PVDF 膜(Millipore)上。转膜完毕后,将膜转移到盒子中,使用(0.05 g/mL PBST)脱脂高蛋白奶粉(伊利)溶液封闭 1 h,用 PBST 洗三次,每次 5 min。加入用 Solution I (TOYOBO)1:1000 稀释的蛋白一抗,4 ℃ 孵育过夜。次日吸去一抗,用 PBST 洗三次,每次 5 min,加入用 PBST 溶液 1:3000 稀释的二抗,室温结合 1 h。随后吸去二抗,用 PBST 洗三次,每次 10 min。最后用 1:1 混合的 ECL-A 溶液和 ECL-B 溶液室温孵育 1 min,在暗室用显影液和定影液在胶片(柯达)上显影。扫描胶片,利用 Quantity One 4.6 软件进行定量分析。

1.3 数据分析

将来自至少四次独立平行实验的数据进行统计学分析,使用 Graphpad Prism 5.0 和 Adobe illustrator CS6 软件作图,并展

示平均值和标准差。不同组数据之间的差异使用 t-检验进行比较,当 P 值 <0.05 时认为存在明显差异。P<0.05 时用一个 * 表示, P<0.01 时用两个 ** 表示, P<0.001 时用三个 *** 表示。

2 结果

2.1 小鼠冷刺激 1 周对体重及血液中指标的影响

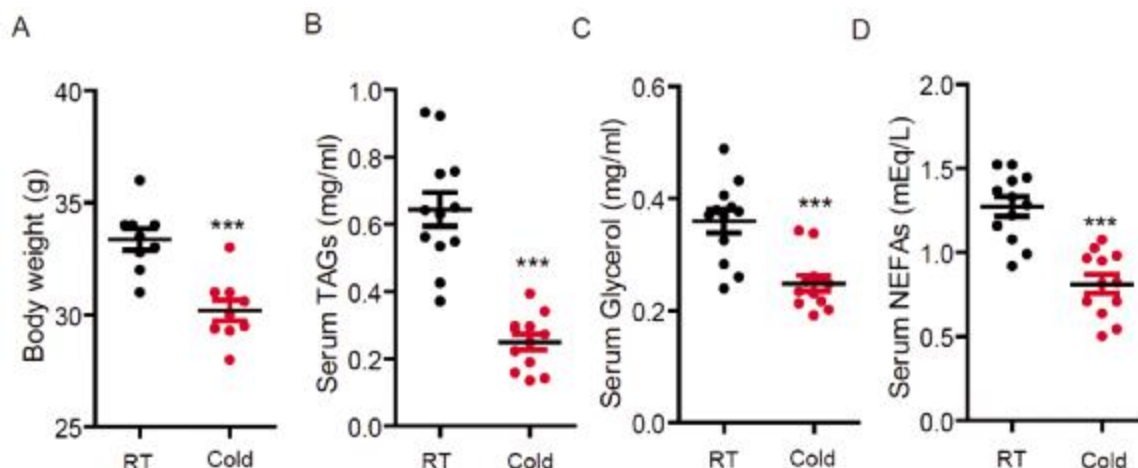


图 1 小鼠冷刺激 1 周后的体重及血液指标变化

注:测量两个月大的小鼠的在常温(22℃)和冷刺激(4℃)一周的体重(A)和血液指标(甘油三酯 TAG、甘油 Glycerol、非酯化脂肪酸 NEFAs),(B)血清中的甘油三酯含量;(C)血清中的甘油含量;(D)血清中的非酯化脂肪酸含量。每个实验组 12 只小鼠。结果数据以散点图呈现,并展示有平均值和标准差。*** 表示 t 检验 P<0.001。

Fig.1 Body weight and serum levels of TAG, Glycerol and NEFA of mice under cold stimulation

Note: Mice were treated under 4 degree centigrade for one week. Mice body weight was measured and serum parameters were determined. (A) Body weight. (B-D) Serum levels of TAG, glycerol and NEFA. (n=12). Significance was established using a two-tailed Student's t-test. ***P<0.001.

4℃冷刺激一周后,小鼠的体重显著下降(图 1A),从 33.4 克下降到 30.2 克。血液中的甘油三酯 TAG、甘油 Glycerol 和非酯化脂肪酸 NEFAs 均有显著下降,分别达到 61%、31% 和 38% (图 1B-D)。小鼠血液中的 TAG 在冷刺激时被机体充分利用,来维持机体的能量需求。NEFA 可以被细胞摄入进行 β 氧化,来维持冷刺激时机体对能量的需求。体重和血液指标水平的显著降低暗示了小鼠在冷刺激下脂肪分解代谢水平的明显提高。

2.2 冷刺激对脂肪组织形态和脂肪储存的影响

由图 2 的 A 图中可以看出,小鼠的皮下白色脂肪组织 (SWAT) 在常温时,每个脂肪细胞中有一个大的单室脂滴,而当受到冷刺激之后,有些脂肪细胞发生了明显的形态学变化,其中产生了很多新生的、多个的脂滴,呈现出明显的褐色化的现象。而其他有单室脂滴的细胞中,其单室脂滴的大小也明显变小。小鼠的腹腔内性腺旁白色脂肪组织 (GWAT) 不论是常温还是冷刺激时,细胞内都只存在有一个大的单室脂滴。但是在冷刺激条件下,脂滴的大小会有所减小。棕色脂肪组织 (BAT) 在冷刺激时,其脂肪细胞内的脂滴会发生明显的减小, BAT 中的脂滴减小较 GWAT 更为显著。

由脂含量检测的结果(图 2B)可以看出,冷刺激条件下, SWAT、GWAT 和 BAT 中的甘油三酯 (TAG) 含量均有显著减少,其中 SWAT 和 BAT 的 TAG 减少较 GWAT 更为显著。常温下 SWAT 中的 TAG 含量为 330 μg/mg 组织,而在冷刺激下 TAG 含量下降到 177.5 μg/mg 组织,降幅达到 46%。GWAT 中的 TAG 含量由 442.5 μg/mg 降低到 382.5 μg/mg,降低了 14%。而 BAT 组织在冷刺激下 TAG 含量降低了 46%。结合小鼠血液中 TAG 下降的结果,可以看出冷刺激能够明显的降低全身的脂肪积累。

2.3 冷刺激对脂肪组织中线粒体相关蛋白的影响

解偶联蛋白 (UCP1) 和细胞凋亡诱导因子 DFF45 类似因子 α (Cidea) 是脂肪组织褐色化的标记蛋白,它们表达量的升高表明组织有褐色化现象。从图 3 可以看出,在冷刺激条件下, SWAT 的 UCP1 和 Cidea 的表达量都有非常显著的提高,表明 SWAT 有明显的褐色化表型。GWAT 的 UCP1 和 Cidea 在常温 and 冷刺激时都没有表达 (数据没有展示)。冷刺激时, BAT 的 Cidea 没有发生明显变化,但是 UCP1 的表达量显著提高,为常温组的 15 倍。

肉毒碱棕榈酰转移酶 (CPT) 家族蛋白, CPT1 和 CPT2, 是脂肪酸 β 氧化的必需蛋白,负责将活化形式的脂肪酸即脂酰 CoA 运输进线粒体进行 β 氧化,代表了细胞中线粒体活性的强弱。图 3 的结果表明,冷刺激条件下, SWAT 和 GWAT 中的 CPT1 和 CPT2 的表达量都有显著增加,均约为常温组的 2 至 3 倍,说明其线粒体活性显著增强。冷刺激时, BAT 中 CPT1 的表达量显著上升,增加了一倍,但是 CPT2 的表达量没有明显变化,其线粒体活性有一定的增强。

3 讨论

在本研究中,我们发现冷刺激能明显降低小鼠血液中甘油三酯、脂肪酸的水平。在冷刺激时,小鼠的皮下脂肪组织发生明显的褐色化现象,UCP1 和 Cidea 的表达明显增加,这和已知的结果类似^[89]。同时我们也观察到褐色脂肪组织中 UCP1 的表达也有明显增加, BAT 内的脂肪积累明显变少,说明在冷刺激时 BAT 大量地消耗脂肪,来维持机体的体温和能量需求。非常有趣的是,我们在三种脂肪组织中都观察到了线粒体相关蛋白的增加,说明相对于 UCP1 和 Cidea 在皮下脂肪组织中明显被诱导,线粒体相关蛋白的变化可能是冷刺激下更普遍的机体的反应。

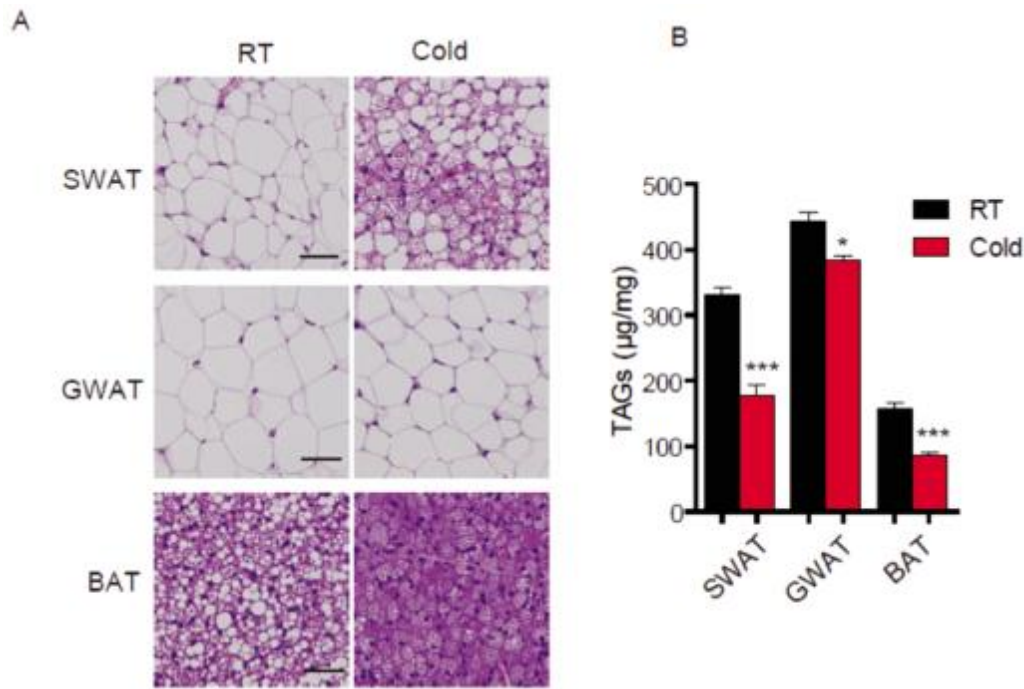


图2 小鼠冷刺激一周后的脂肪组织形态变化及其脂含量变化

Fig.2 Fat tissue morphology and TAG content of mice under cold stimulation for one week

注:两个月大的小鼠分为两组,每组四只,分别在常温(22℃)和冷刺激(4℃)条件下饲养一周。一周后分离小鼠的皮下白色脂肪组织(SWAT)、腹腔内性腺旁白色脂肪组织(GWAT)和棕色脂肪组织(BAT)。对三个组织进行H&E染色(A)和脂含量测定(B)。标尺:50µm。

*表示t检验 $P < 0.05$, ***表示t检验 $P < 0.001$ 。

Note: Two months old mice were maintained under 4 degree centigrade for 1 week. (A) The morphology of fat tissues. SWAT: subcutaneous white adipose tissue; GWAT: gonadal white adipose tissue; BAT: brown adipose tissue. Scale bar: 50 µm. (B) TAG content of fat tissue. Significance was established using a two-tailed Student's t-test. *** $P < 0.001$.

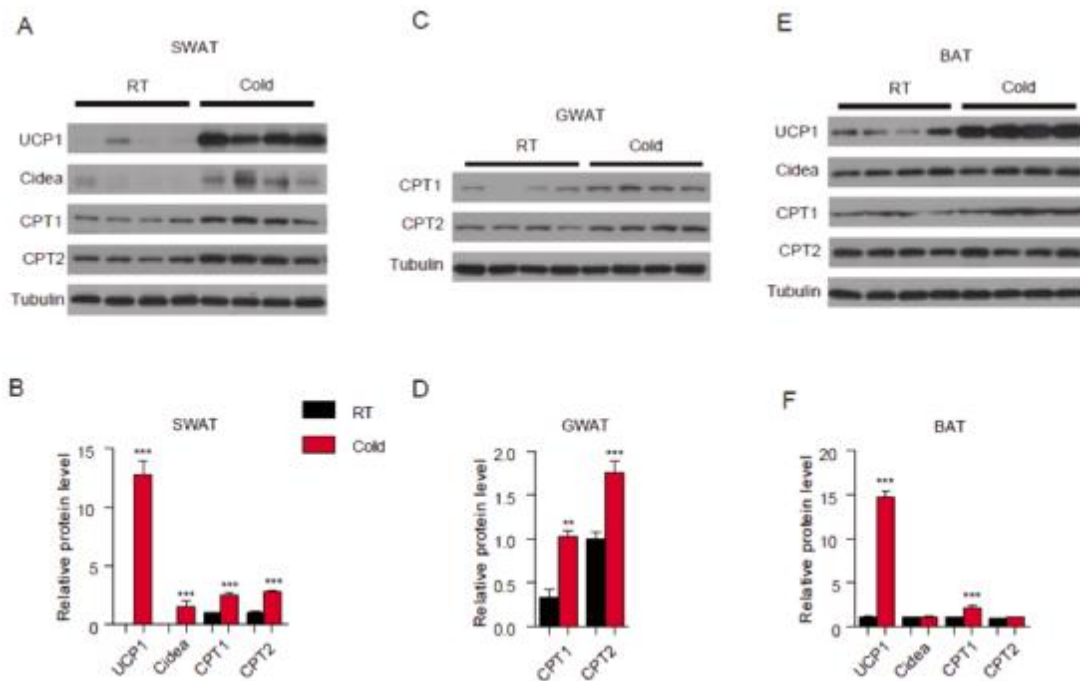


图3 小鼠冷刺激1周后的脂肪组织中蛋白表达变化

Fig.3 Protein expression in the fat tissues of mice under cold stimulation

注:两个月大的小鼠分为两组,每组四只,分别在常温(22℃)和冷刺激(4℃)条件下饲养一周。一周分离小鼠的皮下白色脂肪组织(SWAT)、腹腔内性腺旁白色脂肪组织(GWAT)和棕色脂肪组织(BAT)。提取三个组织中的蛋白,使用western blot检测其解偶联蛋白(UCP1)、细胞凋亡诱导因子 DFF45 类似因子 a(Cidea)和肉毒碱棕榈酰转移酶(CPT)家族蛋白的表达(A)并进行表达量分析(B)。**表示t检验 $P < 0.01$, ***表示t检验 $P < 0.001$ 。

Note: 2 months old mice were maintained under 4 degree centigrade for 1 week. Fat tissues were collected and western blot was performed to see the expression level of UCP1, Cidea and CPT. (A) Protein expression level of UCP1, Cidea, CPT1 and CPT2 in fat tissues. (B) Quantitative analysis of protein expression level. Significance was established using a two-tailed Student's t-test. ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$.

长期以来,UCP1 被认为是褐色化的标志蛋白^[10]。白色脂肪褐色化的一个明显特征就是是否有 UCP1 的表达。UCP1 的主要功能是解耦联 ATP 的生成过程,使能量以热量的形式释放出来。对于褐色脂肪组织的产热功能的研究已经有了较多的工作,但是米黄色脂肪组织的功能与褐色脂肪组织不完全相同^[9]。有相关工作显示,在寒冷刺激下的小鼠的腹股沟皮下脂肪组织中表达的 UCP1 的总量仍远远小于褐色脂肪组织中的总量^[11],这暗示着主要的产热中心仍是在褐色脂肪组织。近期有研究表明,在 UCP1 缺失的米色脂肪细胞内依然可以发生产热增加的现象,这主要是依靠细胞内 SECRA2b 介导的钙信号通路^[12]。这说明米色脂肪细胞内的能量代谢过程是非常复杂的^[13]。

关于褐色化脂肪细胞来源的研究一直是脂肪细胞领域的研究热点。有研究认为褐色化的脂肪细胞来源于已有的脂肪细胞的脱分化。而更多的研究认为褐色化的脂肪细胞由白色脂肪组织内的前体脂肪细胞分化而来,在冷刺激下,小鼠皮下白色脂肪中出现明显的褐色化脂肪细胞,这些褐色化的细胞表现出明显的产热能力以及 UCP1 和 Cidea 等基因的上调^[14-17]。将小鼠维持在室温时,这些细胞丧失了产热能力和相关基因的上调表达。而第二次将小鼠置于冷刺激时,这些细胞再一次获得了产热能力和 UCP1 等基因的表达。这些结果提示前体的白色脂肪细胞中有一些可以在特殊条件下(冷刺激)分化为米色脂肪细胞,而在不需要产热的时候,这些米色脂肪细胞又变成了储存脂肪的经典白色脂肪细胞^[14-17]。这种细胞的转化在哺乳期的哺乳小鼠的脂肪组织中也会发生。哺乳发生时,脂肪细胞可以转化为具有分泌功能的上皮细胞,而在哺乳结束时又可以转化为脂肪细胞^[18]。小鼠在冷刺激下皮下脂肪组织发生明显的褐色化现象,而腹腔内白色脂肪组织几乎没有发生褐色化的现象(图 2),这可能是由于皮下脂肪组织内含有较多的具有向褐色化分化能力的前体细胞,而腹腔内脂肪组织中该类细胞较少。而有报道显示皮下脂肪组织的褐色化需要其中的巨噬细胞的参与^[19]。但值得注意的是,尽管腹腔内脂肪组织并没有发生明显的褐色化的转变(无 UCP1, Cidea 蛋白的增加),但是我们依然检测到了线粒体相关蛋白如 CPT1 和 CPT2 的表达。说明腹腔内脂肪组织调控线粒体活性的能力依然存在。

本研究主要涉及的是小鼠的脂肪组织的代谢变化,但是值得指出的是人类的褐色脂肪组织分布与小鼠有很显著的不同。和小鼠不同,人类只有在婴儿时期在皮下区域有活跃的褐色脂肪组织,当成年以后,该块脂肪组织退化。在很长的一段时间内,成年人是被认为没有显著的褐色脂肪组织的。但是,Cannon 和 Nedergaard 等人^[20]于 2007 年打破了长久以来成年人缺少明显的褐色脂肪组织的认识,他们报道了部分成年人的脂肪有褐色脂肪组织的性质。随后多个实验组发现人体内存在褐色脂肪细胞^[21-23]。随着人们对褐色脂肪组织在人体中的功能的不断发现,利用激活产热脂肪作为治疗肥胖成为研究脂肪代谢领域的热点之一。

参考文献(References)

- [1] Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health[J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10(1): 24-36
- [2] Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat[J]. Cell, 2014, 156(1-2): 20-44
- [3] Sanchez-Gurmaches J, Hung CM, Guertin DA. Emerging Complexities in Adipocyte Origins and Identity [J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(5): 313-326
- [4] Wang W, Seale P. Control of brown and beige fat development[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016, 17(11): 691-702
- [5] Kajimura S, Spiegelman BM, Seale P. Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation [J]. Cell Metab, 2015, 22(4): 546-559
- [6] Wu J, Bostrom P, Sparks LM, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human [J]. Cell, 2012, 150(2): 366-376
- [7] Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, et al. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency [J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1504(1): 82-106
- [8] Jiang H, Ding X, Cao Y, et al. Dense Intra-adipose Sympathetic Arborizations Are Essential for Cold-Induced Beiging of Mouse White Adipose Tissue[J]. Cell Metab, 2017, 26(4): 686-692 e683
- [9] Cohen P, Levy JD, 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): 304-316
- [10] Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria [J]. Cell, 2012, 151(2): 400-413
- [11] Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JMA, et al. UCP1 in Brite/Beige Adipose Tissue Mitochondria Is Functionally Thermogenic [J]. Cell Rep, 2013, 5(5): 1196-1203
- [12] Ikeda K, Kang Q, Yoneshiro T, et al. UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis [J]. Nat Med, 2017, 23(12): 1454-1465
- [13] Shinoda K, Ohyama K, Hasegawa Y, et al. Phosphoproteomics Identifies CK2 as a Negative Regulator of Beige Adipocyte Thermogenesis and Energy Expenditure[J]. Cell Metab, 2015, 22(6): 997-1008
- [14] Lee YH, Petkova AP, Mottillo EP, et al. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding[J]. Cell Metab, 2012, 15(4): 480-491
- [15] Schulz TJ, Huang TL, Tran TT, et al. Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(1): 143-148
- [16] Rosenwald M, Perdikari A, Rulicke T, et al. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes [J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(6): 659-667
- [17] Wang QA, Tao C, Gupta RK, et al. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration[J]. Nat Med, 2013, 19(10): 1338-1344
- [18] Morroni M, Giordano A, Zingaretti MC, et al. Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(48): 16801-16806
- [19] Huang Z, Zhong L, Lee JTH, et al. The FGF21-CCL11 Axis Mediates Beiging of White Adipose Tissues by Coupling Sympathetic Nervous System to Type 2 Immunity[J]. Cell Metab, 2017, 26(3): 493-508 e494

(下转第 1217 页)

- [11] Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, et al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses [J]. Science, 1998, 280(5370): 1763-1766
- [12] Pierro C, Cook S J, Foets T C F, et al. Oncogenic K Ras suppresses IP3 dependent Ca^{2+} release through remodelling of the isoform composition of IP (3)Rs and ER luminal Ca^{2+} levels in colorectal cancer cell lines[J]. J Cell Sci, 2014, 127(Pt 7): 1607-1619
- [13] Hedgepeth S C, Garcia MI, Wagner LE 2nd, et al. The BRCA1 tumor suppressor binds to inositol 1,4,5 trisphosphate receptors to stimulate apoptotic calcium release [J]. Biol Chem, 2015, 290 (11): 7304-7313
- [14] Sun X, Guo S, Wang W, et al. Potential involvement of the 18 kDa translocator protein and reactive oxygen species in apoptosis of THP-1 macrophages induced by sonodynamic therapy [J]. PLoS One, 2018,13(5): e0196541
- [15] Zhu P, Chen Y, Shi J. Nanoenzyme-Augmented Cancer Sonodynamic Therapy by Catalytic Tumor Oxygenation[J]. ACS Nano, 2018, 12(4): 3780-3795
- [16] Qian J, Gao Q. Sonodynamic Therapy Mediated by Emodin Induces the Oxidation of Microtubules to Facilitate the Sonodynamic Effect [J]. Ultrasound Med Biol, 2018, 44(4): 853-860
- [17] You DG, Deepagan VG, Um W, et al. ROS-generating TiO_2 nanoparticles for non-invasive sonodynamic therapy of cancer[J]. Sci Rep, 2016, 6: 23200
- [18] Sun X, Xu H, Shen J, et al. Real-time detection of intracellular reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in THP-1 macrophages during ultrasonic irradiation for optimal sonodynamic therapy[J]. Ultrason Sonochem, 2015, 22: 7-14
- [19] Sandra T Cooper. Ca^{2+} and mitochondrial ROS: Both hero and villain in membrane repair[J]. Sci signal, 2017, 10(495)
- [20] Tian J, Gan Y, Pan C, et al. Nerol-induced apoptosis associated with the generation of ROS and Ca^{2+} overload in saprotrophic fungus *Aspergillus flavus* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102 (15): 6659-6672
- [21] Huang RZ, Huang XC, Zhang B, et al. 16-O-caffeoyl-16-hydroxylhexadecanoic acid, a medicinal plant-derived phenylpropanoid, induces apoptosis in human hepatocarcinoma cells through ROS-dependent endoplasmic reticulum stress[J]. Phytomedicine, 2018, 41: 33-44
- [22] Feissner RF, Skalska J, Gaum WE, et al. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca^{2+} and ROS [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2009, 14: 1197-1218
- [23] Zhang J, Weng H, Ding W, Kang Z, et al. N-terminal engineering of glutamyl-tRNA reductase with positive charge arginine to increase 5-aminolevulinic acid biosynthesis [J]. Bioengineered, 2017, 8 (4): 424-427
- [24] Krammer B, Plaetzer K. ALA and its clinical impact, from bench to bedside [J]. Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology, 2008, 7(3): 283-289
- [25] Berridge M J. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease[J]. Physiol Rev, 2016, 96(4): 1261-1296
- [26] Giorgi C, Baldassari F, Bononi A, et al. Mitochondrial Ca^{2+} and apoptosis[J]. Cell Calcium, 2012, 52(1): 36-43
- [27] Gutierrez T, Simmen T. Endoplasmic reticulum chaperones tweak the mitochondrial calcium rheostat to control metabolism and cell death [J]. Cell Calcium, 2018, 70: 64-75

(上接第 1205 页)

- [20] Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans[J]. Am J Physiol-Endoc M, 2007, 293(2): E444-E452
- [21] Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans [J]. Nat Med, 2013, 19(5): 631-634
- [22] Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans [J]. N Engl J Med, 2009, 360(15): 1509-1517
- [23] Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, et al. A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans[J]. Cell Metab, 2013, 17(5): 798-805