基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003731

基于UHPLC-QTOF-MS探讨高原鼠兔棕色脂肪低氧环境代谢分子机制

薛　华[1]，何雨昕[1]，郭子旭[1]，林凯歌[1]，白振忠[2]，曹学锋[2]
（1.青海大学医学部，西宁　810001；2.青海大学高原医学研究中心，西宁　810001）

【摘　要】目的：基于超高效液相色谱—四极杆飞行时间质谱联用（ultra high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry，UHPLC-QTOF-MS）研究不同海拔下高原鼠兔棕色脂肪组织（brown adipose tissue，BAT）中的内源性差异代谢物及代谢通路，探讨BAT适应高原极端环境的代谢分子机制。**方法：**分别捕捉青海省果洛地区（4 360 m）（MD组）和海北州门源地区（2 900 m）（MY组）高原鼠兔各8只，利用UHPLC-QTOF-MS检测2组高原鼠兔BAT样本代谢产物，采用Simca软件对BAT代谢轮廓特征进行主成分分析（principal component analysis，PCA）和正交偏最小二乘判别分析（orthogonal projections to latent structures- discriminant analysis，OPLS-DA），结合*t*检验、火山图分析差异代谢物，并对差异代谢物进行KEGG代谢通路分析，构建气泡图。**结果：**PCA和OPLS-DA模式结果显示，2组BAT代谢组均表现出明显聚类型分布，这些代谢物参与体内糖代谢、脂代谢、氨基酸代谢、核苷酸代谢、胆汁酸代谢等多种生命活动。其中，葡萄糖-6-磷酸、胆酸、ADP-核糖、腺苷、脱氧胞苷、L-苯丙氨酸等代谢物水平在MD组高原鼠兔BAT中明显上调（$P<0.05$）；去甲肾上腺素、硬脂酸、尿素、鸟氨酸、丙硫氧嘧啶等代谢物水平明显下调（$P<0.05$）。富集通路分析发现BAT代谢与苯丙氨酸、磷酸戊糖途径、酪氨酸、色氨酸等代谢通路相关。**结论：**高原极端环境影响机体的能量相关代谢通路有效激活BAT非颤抖产热，促进机体脂肪组织分化与白色脂肪褐变，增加BAT比重，以此适应高原极端环境。

【关键词】超高效液相色谱—四极杆飞行时间质谱联用技术；高原低氧；高原鼠兔；棕色脂肪组织；代谢组学
【中图分类号】R339.5　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2023-09-22

Molecular mechanism of brown adipose tissue metabolism in the hypoxic environment in plateau pikas: a study based on ultra-performance liquid chromatography-quadruple time-of-flight mass spectrometry

Xue Hua[1]，*He Yuxin*[1]，*Guo Zixu*[1]，*Lin Kaige*[1]，*Bai Zhenzhong*[2]，*Cao Xuefeng*[2]
（*1. Qinghai University School of Medicine；2. Research Center for High Altitude Medicine，Qinghai University*）

【Abstract】*Objective*：To investigate the differentially expressed endogenous metabolites and metabolic pathways in the brown adipose tissue（BAT）of plateau pikas at different altitudes based on ultra-performance liquid chromatography-quadruple time-of-flight mass spectrometry（UHPLC-QTOF-MS），as well as the metabolic molecular mechanism for BAT to adapt to extreme high-altitude environments. ***Methods*：**Eight pikas captured from Guoluo area（4 360 m）of Qinghai Province in China were established as MD group，and eight pikas captured from Menyuan area（2 900 m）of Haibei Prefecture were established as MY group. UHPLC-QTOF-MS was used to analyze the metabolites in BAT samples of the two groups，and Simca software was used to perform the principal component analysis（PCA）and the orthogonal partial least squares-discriminant analysis（OPLS-DA）of the metabolic profile features of BAT. The *t*-test，volcanic map analysis，and KEGG metabolic pathway analysis were performed for differentially expressed metabolites，and a bubble map was constructed. ***Results*：**PCA and OPLS-DA showed that the BAT metabolomics in both groups showed significant clustering distribution，and these metabolites were involved in various life activities such as glucose metabolism，lipid metabolism，amino acid metabolism，nucleotide metabolism，and bile acid metabolism in the body. Among these metabolites，glucose 6-phosphate，cholic acid，ADP ribose，adenosine，deoxycytidine，and L-phenylalanine were significantly upregulated in the BAT of the MD group（$P<0.05$），while norepinephrine，stearic acid，urea，ornithine，and propylthiouracil were significantly downregulated（$P<0.05$）. The pathway enrichment analysis showed that BAT metabolism was associated with the metabolic pathways of phenylalanine，phosphopentose，tyrosine，and tryptophan. ***Conclusion*：**Extreme high-altitude environment effectively activates non-shivering heat production in BAT by affect-

作者介绍：薛　华，Email：1302462679@qq.com，研究方向：高原病及高原低氧适应机制。
通信作者：曹学锋，Email：Seashiwoxin@163.com。
基金项目：青海省“昆仑英才”行动计划资助项目（编号：K9924072）；青海省科技厅基础研究计划资助项目（编号：2023-ZJ-773）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250120.1336.008（2025-01-21）

ing the energy-related metabolic pathways in the body, promotes adipose tissue differentiation and white adipose browning, and increases the proportion of BAT, thereby helping to adapt to the extreme high-altitude environment.

【Key words】ultra-performance liquid chromatography-quadruple time-of-flight mass spectrometry; high altitude hypoxia; plateau pikas; brown adipose tissue; metabolomics

高原鼠兔长期生存于低氧、高寒、强紫外线极端高原环境下，经过长期进化演进，被认为是研究高原土著动物适应高原环境理想模式动物。当前对高原土著动物的高原适应性研究，已成为高原医学研究的热点。文献研究表明，高海拔地区动物白色脂肪（white adipose tissue，WAT）与棕色脂肪组织（brown adipose tissue，BAT）会随季节、气温的改变而出现适应性变化[1]，包括驱动非战栗产热[2-3]、棕色脂肪适应性分布[4]、白色脂肪褐变[5]等。

为研究高原鼠兔BAT适应高原极端环境的分子机制，运用超高效液相色谱—四极杆飞行时间质谱联用技术（ultra high performance liquid tandem chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry，UHPLC-QTOFMS）代谢组学方法对不同海拔的高原鼠兔BAT中代谢物水平进行分析。在这项研究中，极端环境下的BAT代谢展现出与糖代谢、脂代谢、核苷酸代谢、胆汁酸代谢、氨基酸代谢等多种代谢途径的重要联系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本课题研究对象为海拔4 360 m青藏高原果洛地区鼠兔样本8只（MD组，3个月龄左右，雌雄各半）与海拔2 900 m海北州门源地区鼠兔样本8只（MY组，3个月龄左右，雌雄各半）。本次研究中的2组鼠兔的生存环境在海拔、氧含量、环境温度及草场条件（表1）、2组一般生理生化指标检测结果（表2）。采取样本立即-80 ℃保存，直至实验检测。本研究符合本单位伦理委员会所制定的伦理学标准。

表1 MD组和MY组高原鼠兔生存环境

项目	MD组（n=8）	MY组（n=8）
捕捉植被	山地草原	山地草原
捕获时间	11月中旬	11月中旬
环境温度（℃）	-8	4
生存环境氧浓度（%）	12	14

1.2 主要仪器及试剂

1.2.1 实验试剂 LC-MS级甲醇、LC-MS级乙腈、LC-MS级乙酸铵、LC-MS级氨水购自CNW Technologies，纯度≥98%内标：L-2-氯苯丙氨酸。

1.2.2 实验仪器 1 290 UHPLC超高效液相（Agilent），Triple TOF 6 600高分辨质谱（AB Sciex），Heraeus Fresco17离心机（Thermo Fisher Scientific），BSA124S-CW天平（Sartorius），JXFSTPRP-24研磨仪（上海净信科技有限公司），明澈D24 UV纯水仪（Merck Millipore），PS-60AL超声仪（深圳市雷德邦电子有限公司），ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 μm 2.1×100 mm色谱柱（Waters）。

1.3 实验方法

1.3.1 代谢物提取 称取30 mg样本，加入600 μL含有内标的提取液，内标浓度2 μg/mL），涡旋混匀30 s；加入瓷珠，用45 Hz研磨仪处理4 min，后超声处理5 min（冰水浴）；重复以上步骤2~3次；在-20 ℃静置1 h；将样品在4 ℃，12 000 r/min下离心15 min；取500 μL上清至EP管中；真空浓缩干燥提取；随后向干燥后的代谢物加入60 μL提取液，复溶；涡旋

表2 MD组和MY组基本数据及一般生化指标（$\bar{x}\pm s$）

项目	MD组（n=8）	MY组（n=8）	t值	P值
体质量（g）	123.863±13.427	151.301±19.670	-4.348	0.001
白细胞（×10^9/L）	2.786±0.822	4.570±1.948	-2.574	0.005
中性粒细胞（×10^9/L）	1.632±0.640	1.262±0.548	1.328	0.153
中性粒细胞百分含量（%）	59.921±16.834	28.330±5.882	6.323	0.000
红细胞（×10^{12}/L）	6.933±0.853	6.750±1.650	0.355	0.726
血红蛋白（g/L）	116.367±7.386	141.401±21.449	-4.074	0.001
血细胞比容（%）	36.450±2.615	42.580±7.089	-2.985	0.007
葡萄糖（mmol/L）	6.075±3.657	5.841±2.508	0.177	0.861
血尿素氮（mmol/L）	7.485±4.008	5.892±3.001	1.054	0.305
肌酐（μmol/L）	21.551±5.973	22.363±8.652	-0.258	0.799
尿酸（μmol/L）	45.091±21.902	24.276±15.837	2.555	0.019
二氧化碳结合力（mmol/L）	18.722±5.849	26.011±5.831	-2.985	0.008
同型半胱氨酸（μmol/L）	25.031±10.314	18.351±12.088	1.393	0.179

30 s，继续超声处理 10 min（冰水浴）；将样本在 4 ℃，12 000 r/min 下离心 15 min；取 30 μL 上清至 2 mL 进样瓶中，每个样本各取 10 μL 混合成 QC 样本，再取 60 μL 上机检测。

1.3.2 上机检测 使用 UHPLC 系、UPLC BEH 酰胺柱和 Triple TOF 6600 进行 LC-MS/MS 分析。流动相由 25 mmol/L NH_4Ac 和 25 mmol/L NH_4OH（pH=9.75）的水溶液（A）和乙腈（B）组成，洗脱梯度为 0 min 和 95%B；0.5 min，95% 硼；7 min，65% 硼；8 min，40%B；9 min，40%B；9.1 min，95% 硼；12 min，95%B，以 0.5 mL/min 递送，进样体积 1.5 μL。在每个循环中，选择强度大于 100 的 12 个前体离子以 30 V 的碰撞能量进行碎裂。ESI 源条件设置如下：离子源气体 1 为 60 Psi，离子源气体 2 为 60 Psy，幕帘气体为 35 Psi，源温度为 600 ℃，离子注入电压波动分别为 5 000 V 或 -4 000 V。

1.3.3 质量控制 QC 样本 TIC 出峰保留时间和峰面积重叠很好，说明仪器稳定性很好；内标 L-2-氯苯丙氨酸在样品中的保留时间和峰面积具有良好稳定性，说明仪器数据采集具有较好稳定性；空白样品中无显著峰检出，说明物质残留控制得很好，不存在样品间的交叉污染。QC 样本相关系数绝对值>0.99，具有强相关性。所有 QC 样本在 PCA-X 一维分布图中分布于 2STD 之内，QC 样本中内标的相应差异≤20%，说明本次实验数据质量较高。

1.3.4 差异代谢物筛选及鉴别 在获得数据后，对其进行多元变量模式识别分析，包括 *t* 检验、PCA、OPLS-DA、差异代谢物筛选及鉴别的统计方法对结果进行分析，过滤掉代谢物中与分类变量不相关的正交变量，并对非正交变量和正交变量分别分析，从而获取更加可靠的代谢物的组间差异与实验组的相关程度信息。本次筛选使用的卡值标准为 *t* 检验（student's *t*-test）的 $P<0.05$，同时 OPLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度（variable importance in the projection，VIP）>1。

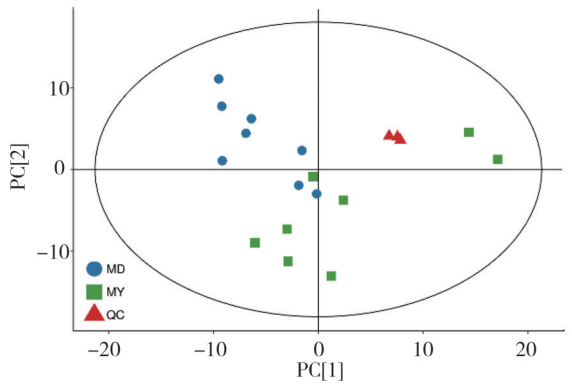
1.4 统计学方法

使用 R4.2.1 版本和自建二级质谱数据库对峰进行物质鉴定。计量资料采用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，比较采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$。

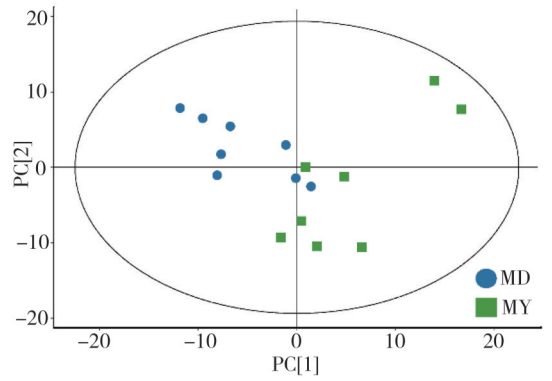
2 结 果

2.1 模式识别判别分析

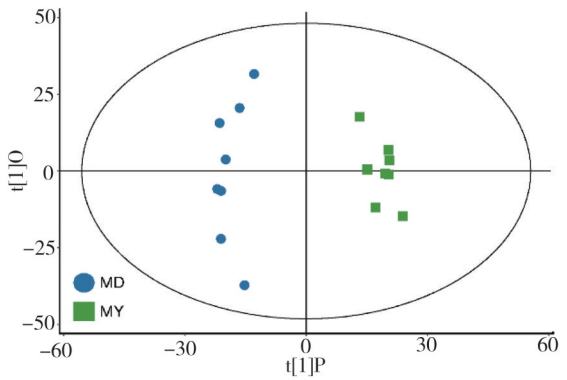
在对比不同组别样本的聚类和分离时采用 PCA 分析。在 PCA 得分图中，QC 样本分布较为聚集，证明本次实验仪器分析系统稳定性较好，结果可靠，样本的生物学差异可以准确被实验所得的代谢谱差异所反映。MD 组和 MY 组 OPLS-DA 模型分离合理（$R^2X=0.292$，$R^2Y=0.972$，$Q^2=0.718$）。OPLS-DA 的 VIP>1 和 Student's *t* 检验的 $P<0.05$，证明 MD 组和 MY 组相比代谢物发生显著变化，见图 1。通过与 pubmed 数据库的对比，筛选出 19 个代谢物，并初步将其作为研究高原鼠兔 BAT 适应高原环境的代谢机制潜在靶点（表 3）。



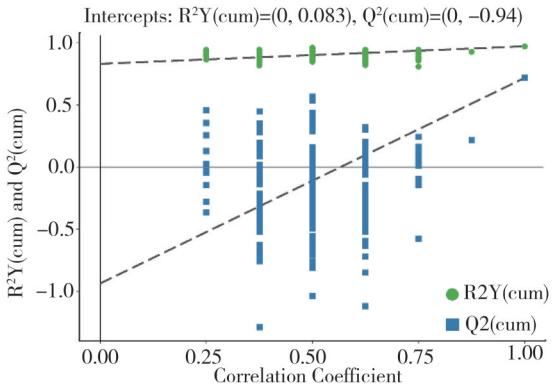
A. 全部样本（包括QC样本）的PCA得分散点图



B. MD组对MY组的PCA得分散点图



C. MD组对MY组的OPLS-DA模型得分散点图



D. MD组对MY组的OPLS-DA模型的置换检验结果

图 1 主成分分析与正交偏最小二乘法-判别分析结果

表3　MD组和MY组差异性表达代谢物

峰值	代谢物	MD组 vs. MY组			
		RT(s)	VIP	*P*值	FC
21613	PE(24:0/16:0)、PC(22:0/15:0)	473.94	1.65	0.012	1.47
14151	葡萄糖-6-磷酸	462.97	1.76	0.030	3.28
3831	丙硫氧嘧啶	436.99	1.73	0.034	0.17
11240	CDP-乙醇胺	436.05	1.57	0.028	1.64
16178	ADP-核糖	414.36	1.68	0.018	3.74
21243	PC(o-18:0/18:0)、PC(o-16:0/20:0)	408.92	1.54	0.033	3.59
5975	鸟氨酸	383.30	1.64	0.030	0.58
6229	脱氧胞苷	346.84	1.74	0.009	1.81
1628	L-苯丙氨酸	312.88	1.80	0.006	2.81
9728	核黄素	201.26	1.64	0.011	0.53
5223	腺苷	164.87	1.53	0.019	2.06
8579	硬脂酸	133.89	1.93	0.006	0.43
20118	PC(14:0/14:0)、PE(15:0/16:0)	131.67	2.24	0.001	0.17
21367	PE(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/16:0)	123.46	1.72	0.005	0.44
11	尿素	105.44	1.86	0.011	0.58
1490	去甲肾上腺素	65.31	1.42	0.007	0.67
10221	胆酸	46.43	1.50	0.015	0.11
2161	L-酪氨酸	283.56	1.25	0.013	1.87
2906	L色氨酸	241.17	1.15	0.021	1.97

2.2　PCA3D得分图

PCA3D得分图能够更好得观察样本的聚集、离散程度，样本点的位置越相近，则表明两者之间的代谢差异越小。PCA3D得分图显示MD组与MY组样本点部分交叉，但并不重叠，在得分图中的位置明显分离，证明2组的代谢模式存在差异。此外，QC样本分布较为聚集，再次证明本次实验仪器分析系统稳定性较好，结果可靠，见图2。

2.3　差异代谢物结果

将MD组与MY组的差异代谢物进行比较，结果如表3所示。MD组糖代谢的相关物质如葡萄糖-6-磷酸显著上调；MD组动物体内有关核苷酸代谢的物质如ADP-核糖、腺苷、脱氧胞苷等上调趋势明显，而丙硫氧嘧啶与其他核苷酸趋势相反；与胆汁代谢相关物质如胆酸亦呈上调趋势。然而BAT中与脂质代谢相关的脂肪酸水平却明显下调，如甘油三酯、硬脂酸等脂类物质。氨基酸代谢的代谢物水平并非呈统一的上调或下调趋势，氨基酸如苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸等呈上调趋势，鸟氨酸与尿素呈下调趋势。2组鼠兔BAT中的激素水平也有较大差异，MD组BAT中去甲肾上腺素较MY组下调。

此外，MD组和MY组其他差异性表达代谢物机制尚未明确，但有较高VIP值，如表4所示。

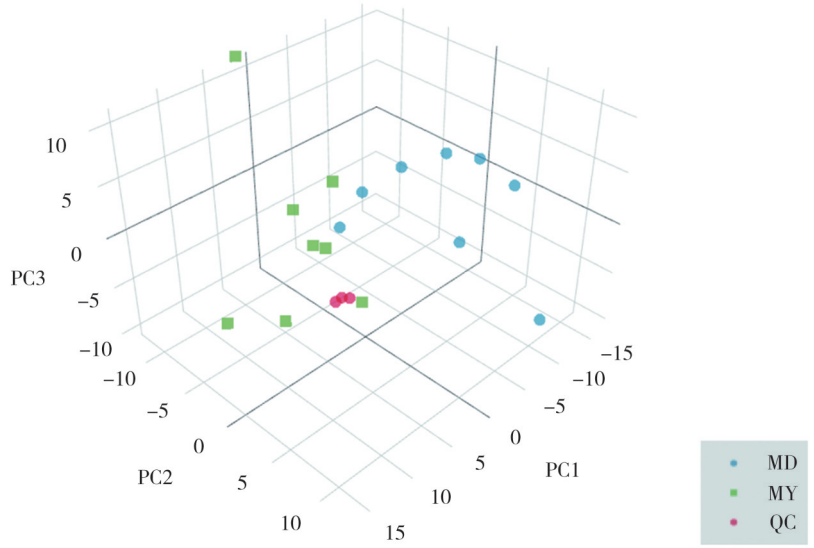


图2　PCA3D得分图

表4 MD组和MY组其他差异性表达代谢物

峰值	代谢物	MD组 vs. MY组			
		RT(s)	VIP	*P*值	FC
1765	磷酸二甲基乙醇胺;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸;尼古丁腺嘌呤	325.01	1.97	0.020	9.91
17619	二核苷酸;二磷酸吡啶	335.46	1.49	0.010	6.25
16836	尿苷5′-二磷酸葡萄糖醛酸(UDP-D-葡萄糖醛酸)	468.51	1.66	0.044	4.98
15241	(N-磺基吲哚-3-基)甲基硫代葡萄糖苷	462.68	1.71	0.031	4.17
9621	N-乙酰-L-组氨酸	327.12	2.02	0.015	3.52
23281	五谷氨酰叶酸	368.76	1.60	0.047	3.18
6507	赖氨酸-亮氨酸	109.51	1.98	0.008	3.12
8671	去甲氧基姜黄素	146.47	1.60	0.041	3.07
2011	半胱氨酰-甘氨酸	385.43	1.86	0.020	2.93
8923	甘氨酸	416.53	1.86	0.005	2.82
1676	吡哆醇(维生素B6)	103.28	2.14	0.004	2.65
7483	腺苷3′,5′-环磷酸(cAMP)	275.95	1.64	0.002	2.60
11401	N-乙酰-L-苯丙氨酸	462.41	1.91	0.007	2.52
15054	吗啡肽	448.72	1.36	0.028	2.47
8260	腺苷3′,5′-环磷酸(cAMP)	276.33	1.64	0.001	2.40
9886	熊去氧胆酸	101.07	1.86	0.003	2.30
3694	磷酸二羟丙酮	432.34	1.81	0.025	2.28
12052	5′-二磷酸腺苷(ADP)	448.27	1.34	0.032	2.27
7767	焦-L-谷氨酰胺-L-谷氨酰胺;5-甲基胞苷	368.84	1.60	0.028	2.24
6574	精氨酸-甘氨酸	411.51	1.51	0.049	2.20
4815	6-磷酸-D-葡萄糖酸盐	406.51	1.74	0.023	2.14
441	尿嘧啶	157.91	1.24	0.048	2.13
4575	D-核糖-5-磷酸	432.07	1.69	0.009	2.12
21376	亚麻腺嘌呤二核苷酸(FAD)	473.08	1.50	0.031	2.10
5607	蛋氨酸-赖氨酸	391.00	1.32	0.047	2.09
2415	α-胍戊二酸	370.38	1.68	0.001	2.08
3933	1-丙酸甘油二乙酸酯	377.12	1.76	0.003	2.03
3025	D-4-羟基苯基甘氨酸	431.99	1.68	0.029	1.93
571	酪胺	240.51	1.60	0.025	1.84
7377	N-乙酰神经氨酸	364.38	1.50	0.013	1.80
3723	二甲基丙烯焦磷酸酯	401.25	1.51	0.018	1.79
10469	5′-二磷酸尿苷(UDP)	425.99	1.49	0.049	1.74
4774	甘油磷胆碱;托美汀;伊斯明	418.89	1.45	0.031	1.71
2347	亮氨酸-甘氨酸	273.70	1.60	0.010	1.71
6311	5′-脱氧腺苷	121.09	1.38	0.037	1.68
12502	胞苷5′-二磷酸胆碱(CDP胆碱)	431.08	1.37	0.045	1.61
891	次黄嘌呤	142.22	1.52	0.010	1.57
3561	3-磷酸-D-甘油酯	436.82	1.65	0.015	1.54
4494	3-磷酸丝氨酸	435.47	1.35	0.048	1.44
341	L-丝氨酸	361.55	1.37	0.040	1.35
2659	对氨基苯甲酸(维生素L1)	294.91	1.36	0.025	1.22
1966	乙酰DL-缬氨酸	474.82	1.23	0.042	1.20
317	胆碱	368.88	1.34	0.049	1.19
15973	N-乙酰葡糖胺1-磷酸	210.83	1.31	0.047	0.82
19350	胆固醇酯(20:3(5Z,8Z,11Z))、(20:3(8Z,11Z,14Z))	378.39	1.38	0.047	0.80
4730	7-甲基鸟苷	426.98	1.66	0.023	0.73

续表

峰值	代谢物	MD组 vs. MY组			
		RT(s)	VIP	*P*值	FC
12268	氨基蝶呤	352.98	1.38	0.025	0.71
7274	亚麻酸	41.95	1.58	0.027	0.66
7266	D-果糖1,6-二磷酸	484.66	1.24	0.046	0.64
1292	肌氨酸	368.08	1.44	0.033	0.58
3100	D-木糖	217.24	1.54	0.040	0.57
4288	丙氨酸-天冬氨酸	316.35	1.47	0.034	0.55
1753	3-甲基组胺	274.13	1.78	0.017	0.54
6389	S-甲基-5′-硫腺苷	362.16	1.59	0.017	0.53
4771	5-甲基胞苷	227.35	1.74	0.008	0.52
2927	磷酸二甲基乙醇胺	325.9	1.58	0.020	0.51
5547	L-焦谷氨酸	361.55	1.67	0.022	0.50
8791	11-脱氧皮质酮	377.79	1.29	0.032	0.49
4192	阿扎胞苷	358.73	1.80	0.011	0.43
5935	维生素H	273.77	2.03	0.004	0.41
16100	α-亚麻酸	45.18	1.71	0.008	0.38
20766	1-棕榈酰基-2-油酰基-磷脂酰甘油	79.55	1.84	0.009	0.36
13123	L-棕榈酰肉碱	156.25	1.96	0.035	0.30
9232	顺甘氨酸	278.23	2.11	0.007	0.24

2.4　差异代谢物的火山图

将筛选差异代谢物的结果以火山图的形式进行可视化。MD组对MY组的结果如图所示。火山图中每个点代表一个代谢物，横坐标代表该组对比各物质的倍数变化（取以2为底的对数），纵坐标表示*t*检验的*P*值（取以10为底对数的负数），散点大小代表OPLS-DA模型的VIP值，散点越大VIP值越大。散点颜色代表最终的筛选结果，明显上调的代谢物以红色表示，明显下调的代谢物以蓝色表示，非明显差异的代谢物为灰色，见图3。

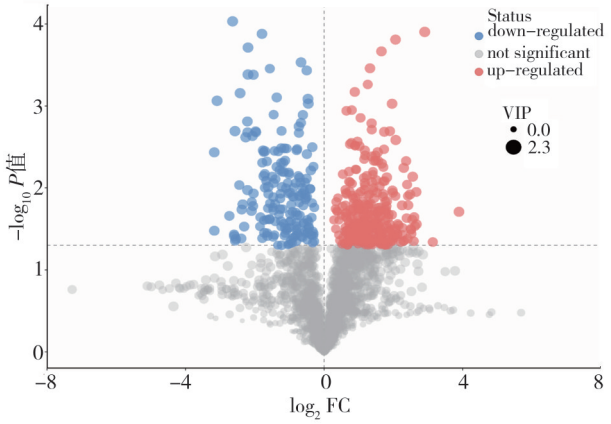


图3　差异代谢物筛选火山图

2.5　差异代谢物的代谢通路分析

取得差异代谢物的匹配信息后，将对应物种Rattus norvegicus的通路数据库相应代谢通路予以分析。结果以气泡图展示。结果显示富集的差异代谢通路以苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成通路影响因子最明显，磷酸戊糖途径、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路富集程度最明显。其他差异代谢通路包括维生素B6代谢通路、甲烷代谢通路和苯丙氨酸代谢通路也有变化，见图4。

各通路所含差异代谢物如下：苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成通路为苯丙氨酸；磷酸戊糖途径通路为脱氧核糖；D-核糖-5-磷酸；D-红细胞4-磷酸；6-磷酸葡萄糖酸；甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路为L-丝氨酸；胆碱；甜菜碱；维生素B6代谢通路为吡哆醇。甲烷代谢通路：L-丝氨酸。

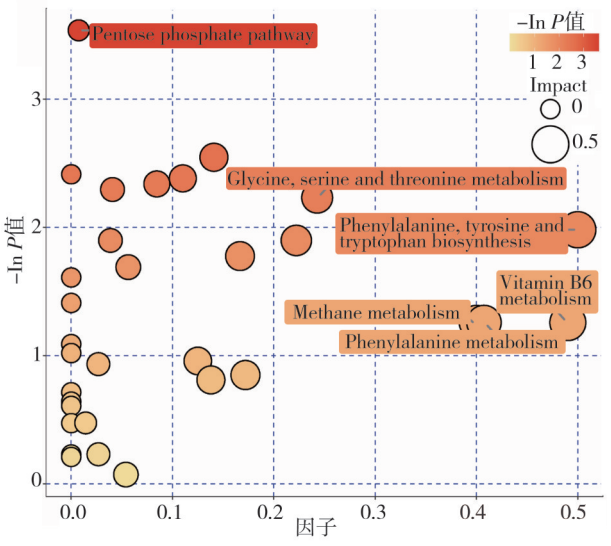


图4　通路分析结果

3 讨 论

高原鼠兔主要栖息在青藏高原的高寒草甸生态系统，严酷的高海拔环境，动物不仅面临低温，还受到低氧的长期胁迫，使其成为研究高原土著动物对极端环境适应的理想动物模型。根据非靶标代谢组学的结果可知，生存于不同海拔的鼠兔 BAT 中代谢物水平差异较大，而其中部分代谢物的作用已有文献记载。

脂肪酸作为 BAT 适应性产热的“燃料”，受到高原低氧高寒等极端环境的剧烈影响。已有研究证明，冷暴露会引发脂质代谢系统性变化，从而增加脂肪酸向 BAT 输送能量[6-7]。此外，冷暴露可诱导 BAT 产热基因表达，解偶联蛋白 1（UCP1）和过氧化物酶体增殖受体 γ 辅激活因子 α（PGC1α）蛋白水平升高，诱导 BAT 参与甘油三酯和甘油磷酯代谢[8]。本研究还发现 MD 组 BAT 中硬脂酸水平下调，硬脂酸为不饱和脂肪酸，能通过下调成脂转录因子抑制脂肪细胞分化[9]，在寒冷条件时下调硬脂酸水平可促进脂肪细胞分化，BAT 占比升高，增加机体产热。

糖类在生命活动中的主要作用是提供能量。MD 组动物葡萄糖-6-磷酸水平高于 MY 组。研究发现，相较于 WAT 而言，BAT 中含有丰富糖原和较低的葡萄糖含量[10]，表明 BAT 可快速合成糖原，且糖原可驱动棕色脂肪细胞分化过程中脂滴的生成[11]。这种在 BAT 和 WAT 中的糖量差异提示葡萄糖可能参与到 BAT 的产热活动中去。动物实验表明，在饥饿条件下，BAT 糖原可以影响体内营养感应，使小鼠的 G-6-P 水平增加[12]。此外，1 项有关小鼠冷暴露的实验发现，短期冷暴露能增加糖酵解途径中的代谢产物以及某些氨基酸含量，且 BAT 糖酵解途径代谢产物和乳酸水平明显高于 WAT[13-14]。BAT 中糖酵解和脂肪酸的 β-氧化是积极的生物途径，有助于通过冷暴露激活产热，从而促进 UCP1 表达产生热量。

在本研究中，BAT 展现出与核苷酸代谢的紧密关系。MD 组 ADP-核糖、腺苷、脱氧胞苷、黄嘌呤、次黄嘌呤水平均高于 MY 组。通过现有文献进行分析，发现嘌呤、嘧啶、腺苷等物质能有效调节脂肪细胞的分化[15]。如 5-氮-2-脱氧胞苷被证明可以上调 BAT 特异性蛋白表达，阻碍与微小 RNA 的 DNA 甲基化来改变表观遗传学修饰，从而调节 WAT 发生褐变[16]。腺苷能够通过激活腺苷受体 A 激活 BAT 和 WAT 脂肪细胞分解和产热程序，并能够促进 WAT 褐色化[17]。有专家推测 ADP-核糖与白色、棕色和米色脂肪细胞的分化有重要联系[18]，但目前并无确切证据。除此之外，PTU 在 MD 组 BAT 中的表达明显下调。PTU 是甲状腺激素（thyroid hormone，TH）抑制剂，TH 对动物的体温维持有重要作用。在寒冷状态下，TH 通过多途径刺激 BAT 产热，且促进 WAT 发生褐变[19-20]。在强烈冷刺激的持续作用下，机体下调 PTU 水平，解除了对 TH 的抑制，使动物体温在寒冷条件下得以维持。

在差异代谢物的代谢通路分析中，苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸等氨基酸合成通路的影响因子最大。有文献报道，冷暴露可影响 BAT 中的氨基酸代谢[21-22]。在 BAT 中含量较高的代谢物中，大部分富集到磷酸戊糖途径、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢通路。其与核苷酸类物质的作用相似，氨基酸类物质同样对脂肪细胞的分化起重要作用。在寒冷应激时，酪氨酸合成通路激活，该蛋白质通过合成儿茶酚胺类物质，促进体内分解代谢，并通过 TH 的 PPARγ 信号通路调节 UCP1 的合成，促进脂肪褐变，消耗体内储存的 TG 加强产热[23]。苯丙氨酸调节线粒体生成等方面来调节脂肪分化。而丝氨酸和苏氨酸可能通过丝苏氨酸蛋白激酶通路促进脂肪动员，可能与寒冷条件下增加产热有关[24]。

研究结果显示，高海拔环境下，BAT 中的激素水平也发生了巨大变化。去甲肾上腺素（norepinephrine，NE）是下丘脑调节体温的主要递质，能有效诱导非颤抖性产热能力。NE 可激活 BAT 细胞内的 β-肾上腺素受体，促进脂肪酸的释放，进而激活 UCP1，从而提高机体体温；另一方面，高表达 NE 促进 BAT 细胞的增殖和分化，诱导 WAT 褐色化[25]。NE 受体可上调产热基因程序的表达，NE 被证明是 BAT 生成的关键促进剂[26]。理论上 NE 在 MD 组 BAT 中应为上调，但事实并非如此，初步推测其原因可能与递质耗竭有关。

此外，其他差异性表达的代谢物如磷酸二甲基乙醇胺、亚麻腺嘌呤二核苷酸（flaxseed adenine dinucleotide，FAD）、对氨基苯甲酸等代谢物水平变化机制还不明确，但它们都有较高的 VIP 值，进一步的研究可能需要关注这些代谢物的功能，排除假阳性的可能。

综上所述，生存于不同海拔的鼠兔BAT代谢物有巨大差异，高寒低氧环境通过影响机体的糖、脂、核苷酸、氨基酸代谢促进BAT分解脂肪和产热能力，同时上调促脂肪生成基因、促脂肪分化代谢物，增加BAT占比，为产热提供更多“动力”和“燃料”。BAT适应性改变使动物能在高原极端环境下能量代谢保持平衡。本研究还发现，某些代谢物水平在短期冷暴露和长期冷暴露环境下的变化不同，其原因和机制需要进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Song AY, Dai WT, Jang MJ, et al. Low- and high-thermogenic brown adipocyte subpopulations coexist in murine adipose tissue[J]. J Clin Invest, 2020, 130(1): 247-257.

[2] Reinisch I, Schreiber R, Prokesch A. Regulation of thermogenic adipocytes during fasting and cold[J]. Mol Cell Endocrinol, 2020, 512: 110869.

[3] Watanabe M, Yamamoto T, Mori C, et al. Cold-induced changes in gene expression in brown adipose tissue: implications for the activation of thermogenesis[J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(5): 775-784.

[4] 李欣慧，白振忠，韩士瑞. 高原环境对高原鼠兔脂肪分布的影响[J]. 临床医药文献电子杂志，2015，2(25)：5191-5192.
Li XH, Bai ZZ, Han SR. Effect of plateau environment on fat distribution of plateau pika[J]. J Clin Med Lit, 2015, 2(25): 5191-5192.

[5] Xu ZY, You WJ, Zhou YB, et al. Cold-induced lipid dynamics and transcriptional programs in white adipose tissue[J]. BMC Biol, 2019, 17(1): 74.

[6] Heeren J, Scheja L. Brown adipose tissue and lipid metabolism[J]. Curr Opin Lipidol, 2018, 29(3): 180-185.

[7] Hiroshima Y, Yamamoto T, Watanabe M, et al. Effects of cold exposure on metabolites in brown adipose tissue of rats[J]. Mol Genet Metab Rep, 2018, 15: 36-42.

[8] Liu X, Tang J, Zhang RN, et al. Cold exposure induces lipid dynamics and thermogenesis in brown adipose tissue of goats[J]. BMC Genomics, 2022, 23(1): 528.

[9] Li YR, Rong YH, Bao LS, et al. Suppression of adipocyte differentiation and lipid accumulation by stearidonic acid (SDA) in 3T3-L1 cells[J]. Lipids Health Dis, 2017, 16(1): 181.

[10] 宋懿朋，李 宁，薛海斯，等. 棕色脂肪组织和白色脂肪组织的代谢组学研究[J]. 波谱学杂志，2016，33(2)：208-223.
Song YP, Li N, Xue HS, et al. Metabonomics analysis of brown adipose and white adipose tissues[J]. Chin J Magn Reson, 2016, 33(2): 208-223.

[11] Volke L, Krause K. Effect of thyroid hormones on adipose tissue flexibility[J]. Eur Thyroid J, 2021, 10(1): 1-9.

[12] Carmean CM, Huang YH, Brady MJ. Glycogen repletion in brown adipose tissue upon refeeding is primarily driven by phosphorylation-independent mechanisms[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0156148.

[13] Okamatsu-Ogura Y, Kuroda M, Tsutsumi R, et al. UCP1-dependent and UCP1-independent metabolic changes induced by acute cold exposure in brown adipose tissue of mice[J]. Metabolism, 2020, 113: 154396.

[14] Park G, Haley JA, Le J, et al. Quantitative analysis of metabolic fluxes in brown fat and skeletal muscle during thermogenesis[J]. Nat Metab, 2023, 5(7): 1204-1220.

[15] Hou DM, Jia T, Li Q, et al. Metabonomics of white adipose tissue and brown adipose tissue in *Tupaia belangeri* during cold acclimation[J]. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics, 2021, 38: 100823.

[16] Liang J, Jia Y, Yu HX, et al. 5-aza-2′-deoxycytidine regulates white adipocyte browning by modulating miRNA-133a/Prdm16[J]. Metabolites, 2022, 12(11): 1131.

[17] Wu ZF, Rao SJ, Li JY, et al. Dietary adenosine 5′-monophosphate supplementation increases food intake and remodels energy expenditure in mice[J]. Food Nutr Res, 2022, 66: 7680.

[18] Szántó M, Bai P. The role of ADP-ribose metabolism in metabolic regulation, adipose tissue differentiation, and metabolism[J]. Genes Dev, 2020, 34(5/6): 321-340.

[19] Castillo-Campos A, Gutiérrez-Mata A, Charli JL, et al. Chronic stress inhibits hypothalamus-pituitary-thyroid axis and brown adipose tissue responses to acute cold exposure in male rats[J]. J Endocrinol Invest, 2021, 44(4): 713-723.

[20] Yau WW, Yen PM. Thermogenesis in adipose tissue activated by thyroid hormone[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8): 3020.

[21] Verkerke ARP, Wang D, Yoshida N, et al. BCAA-nitrogen flux in brown fat controls metabolic health independent of thermogenesis[J]. Cell, 2024, 187(10): 2359-2374.

[22] Gong LQ, Zhao SY, Chu X, et al. Assessment of cold exposure-induced metabolic changes in mice using untargeted metabolomics[J]. Front Mol Biosci, 2023, 10: 1228771.

[23] 刘鼎鑫，孟凡舜，李仕韦，等. 冷暴露下酪氨酸联合半胱氨酸对小鼠脂质代谢的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报，2022，34(4)：31-36.
Liu DX, Meng FS, Li SW, el al. The effect of tyrosine combined with cysteine on lipid metabolism in mice under cold exposure[J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural and Reclamation University, 2022, 34(4): 31-36.

[24] 任美玲，王 萍. 中药调控棕色脂肪组织解偶联蛋白1表达的机制研究概述[J]. 环球中医药，2022，15(9)：1722-1728.
Ren ML, Wang P. Review on the mechanism of Chinese medicinals regulating the expression of brown adipose tissue uncoupling protein 1 [J]. Glob Tradit Chin Med, 2022, 15(9): 1722-1728.

[25] Li L, Li BG, Li M, et al. Switching on the furnace: regulation of heat production in brown adipose tissue[J]. Mol Aspects Med, 2019, 68: 60-73.

[26] Tao XX, Du RL, Guo SM, et al. PGE_2-EP3 axis promotes brown adipose tissue formation through stabilization of WTAP RNA methyltransferase[J]. EMBO J, 2022, 41(16): e110439.

（责任编辑：周一青）

本文引用格式：
薛 华，何雨昕，郭子旭，等. 基于UHPLC-QTOF-MS探讨高原鼠兔棕色脂肪低氧环境代谢分子机制[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(2)：267-274.