

· 基础研究 ·

VPS13A 在 3T3-L1 脂肪细胞分化过程中的表达及调控研究

刘 瑾, 黄 昀, 李超普, 张 桐, 潘锦堃, 季学涛, 张 许, 李 仲*

南京医科大学罕见代谢性疾病研究重点实验室, 南京医科大学生物化学与分子生物学系, 江苏省人类功能基因组重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:明确囊泡分选蛋白13A(vacuolar protein sorting 13 homolog A, VPS13A)在小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblast cells, 3T3-L1)分化过程中的表达水平;探索 VPS13A 对 3T3-L1 细胞的影响。方法:利用 Western blot 及 Q-PCR 法检测 3T3-L1 细胞在分化过程中 VPS13A 的表达,利用 CRISPR/Cas9 系统构建 VPS13A 稳定敲降细胞系,Western blot 和油红染色检测 VPS13A 敲降后对 3T3-L1 细胞分化的影响。结果:VPS13A 的表达在 3T3-L1 分化过程的早期降低,在分化的后期升高。敲降 VPS13A 后,3T3-L1 细胞中脂滴增多,参与调控脂肪细胞分化基因的表达水平升高。结论:在 3T3-L1 细胞中 VPS13A 的表达水平在分化过程中被调控,敲降 VPS13A 可以促进 3T3-L1 细胞的分化成熟。

[关键词] VPS13A; 3T3-L1 细胞; 脂滴; 脂肪细胞分化

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)08-1041-06

doi:10.7655/NYDXBNS20230801

Expression and regulation of VPS13A in 3T3-L1 adipocyte differentiation

LIU Jin, HUANG Yun, LI Chaopu, ZHANG Tong, PAN Jinkun, JI Xuetao, ZHANG Xu, LI Zhong*

Key Laboratory of Rare Metabolic Disease, Department of Molecular Biology and Biochemistry, Nanjing Medical University, the Key Laboratory of Human Functional Genomics of Jiangsu Province, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To determine the expression level of vacuolar protein sorting 13 homolog A (VPS13A) during cell differentiation of 3T3-L1 and to explore the effects of VPS13A on 3T3-L1 cells. **Methods:** Western blot and Q-PCR were used to detect the expression changes of VPS13A during the differentiation of 3T3-L1 cells, and CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 (CRISPR associated with 9) system to establish stable VPS13A knockdown cell lines. Finally, the effect of VPS13A knockdown on 3T3-L1 cell differentiation was detected by Western blot and Oil red staining. **Results:** The expression of VPS13A was downregulated in the early stage and upregulated in the later stage of 3T3-L1 cell differentiation. Lipid droplets and the expression levels of genes involved in differentiation were increased in VPS13A knockdown 3T3-L1 cells. **Conclusion:** VPS13A expression is modulated by cell differentiation status in 3T3-L1 cells. Knockdown of VPS13A enhances the differentiation of 3T3-L1 cells.

[Key words] VPS13A; 3T3-L1 cell; lipid droplets; adipocytes differentiation

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(08): 1041-1046]

世界卫生组织发布的最新数据表明全球肥胖发病率越来越高。全球肥胖患病率的大幅增加一方面可能是由于营养摄入过多以及运动量不足引起的,另一方面也可能是由于遗传和生物等因素所

[基金项目] 国家自然科学基金(32130050, 3220110126); 南京医科大学科技发展基金(2016NJMU004)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lizhong@njmu.edu.cn

引起的。白色脂肪组织通过增加脂肪细胞的大小或促进脂肪前体细胞的分化增加脂肪细胞数目而扩张,进一步引起肥胖症的发生^[1]。脂肪组织在机体能量代谢过程中起着重要作用^[2],相关研究表明肥胖与2型糖尿病、高血压等疾病之间具有明显相关性^[3]。因此对脂肪细胞分化机制的深入研究可以为肥胖的防治提供重要的理论基础及潜在的靶

点^[4]。囊泡分选蛋白13(vacuolar protein sorting 13, VPS13)是新鉴定出来的脂质转运蛋白,其在进化上相对保守。该蛋白首先在酵母中被发现,但在人类中有4种与其同源的基因(VPS13A-D)^[5]。VPS13基因的突变与遗传性疾病具有密切关系:VPS13A被报道与舞蹈棘细胞增多症密切相关;VPS13B突变可导致科恩综合征,该疾病的特征是整体发育迟缓和智力残疾;VPS13C则与早发型的帕金森病相关;VPS13D突变会伴有痉挛状态的共济失调。因此研究VPS13的亚细胞定位及其分子功能将有助于揭示这些疾病的发病机制。

研究表明,VPS13A定位于内质网-线粒体和内质网-脂滴接触部位^[6],是内质网和其他细胞器之间的脂质转运蛋白^[7]。VPS13A敲降后人胚肺细胞内的脂滴增多^[8],目前关于VPS13A在脂肪细胞中的作用还没有相关研究报道,本研究旨在观察VPS13A在3T3-L1细胞分化过程中的表达情况以及敲降VPS13A对脂肪前体细胞3T3-L1分化和脂代谢的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

3T3-L1细胞由南京医科大学韩晓教授惠赠;VPS13A抗体(武汉爱博泰克公司);过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ)抗体、转录共激活因子CCAAT/增强子结合蛋白 α (CCAAT/Enhancer binding protein α , C/EBP α)抗体、转录共激活因子CCAAT/增强子结合蛋白 β (CCAAT/Enhancer binding protein β , C/EBP β)抗体(Santa Cruz公司,美国);Calnexin抗体(Stressgen公司,加拿大);蛋白marker(Bio-Rad公司,美国);油酸、油红(Sigma-Aldrich公司,美国);TRIzol Reagent总RNA提取剂、胰岛素(Invitrogen公司,美国);3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、地塞米松、罗格列酮(MCE公司,美国);SYBR Green I (SYBR Green qPCR Master Mix)(南京诺唯赞);胎牛血清、小牛血清(Gibco公司,美国);3.5 cm皿和6孔板(Corning公司,美国);引物由上海捷瑞基因有限公司合成;氟硼二吡咯化合物(4,4-difluoro-boradiazaindacene, BODIPY)、逆转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(Thermo Fisher公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 3T3-L1细胞培养、分化

3T3-L1细胞置于高糖培养基(含10%小牛血清)中于37℃、5% CO₂培养箱中培养,隔天需更换新鲜培

养基。待3T3-L1细胞生长密度达到80%~90%后,将细胞传代到3.5 cm细胞培养皿中,继续在培养箱(37℃、5% CO₂)中培养,待细胞生长密度达到100%,继续让细胞接触抑制2 d,于第3天更换新的分化培养液I(含0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、5.0 μ mol/L地塞米松、1.0 μ mol/L罗格列酮、1.0 μ g/L胰岛素和10%胎牛血清),在分化液I中分化2 d,再换上分化培养液II(含1 μ g/L胰岛素和10%胎牛血清)继续在分化培养液II中分化6 d,隔天换新鲜的高糖培养基。

1.2.2 慢病毒感染和单克隆细胞筛选

将HEK293T细胞于6 cm培养皿中培养,等细胞密度达到70%~80%时,用lipofectamine2000将三质粒(lentiCRISPRv2、psPAX2、pMD2.G)共同转染进入胚胎肾细胞293(human embryonic kidney 293 cells, HEK293T)细胞进行病毒的包装,小向导核糖核酸(small guide ribonucleic acid, sgRNA),sgRNA-VPS13A oligo的序列为:sgRNA-VPS13A上游引物5'-CACCGTGACCAACTTTAACTTTGAA-3',下游引物5'-AAACTTCAAAGTTAAAGTTGGTCAC-3',转染6 h后给细胞换液,分别收集48 h和72 h含慢病毒的培养基。4 500 g离心20 min取上清,0.22 μ m滤器过滤,分装后放-80℃保存。感染病毒前一晚将3T3-L1接种到6孔板(感染前密度达到50%左右),将病毒上清与培养基于EP管1:1混匀,并加入Polybrene(终浓度:8 mg/mL),缓慢加入孔板中。预先留2个未感染病毒的孔作为空白对照。感染24 h后换液,感染48 h后,换含有2 μ g/mL嘌呤霉素的培养基进行筛选。3 d后,观察空白对照组细胞基本死亡,继续培养实验组细胞,Western blot验证敲降效率。

单克隆细胞筛选:细胞计数,将细胞以每孔1个细胞的密度种到96孔板中,细胞贴壁后镜下观察单个细胞的孔,并做标记。96孔板中单个细胞长成细胞团后,胰酶消化后接种到24孔板。以此类推,细胞长满后依次种到12孔板、6孔板,Western blot验证敲降效率。

1.2.3 RNA提取及相对定量水平检测

3.5 cm细胞培养皿中加入0.5 mL TRIzol将细胞裂解,将红色液体转移到新的EP管中。在裂解液中加入200 μ L氯仿,轻微涡旋15 s,22℃静置5 min,将其于4℃12 000 g离心30 min,分离水相层;再将上层含RNA的液体转移到新的离心管,再加入500 μ L预冷的异丙醇沉淀RNA,轻轻混匀,22℃静置15 min。在4℃离心机中10 000 g离心15 min,保

留底部的白色沉淀,将上层液体弃去,用RNA专用的75%乙醇洗涤沉淀,再次在4℃离心机中10 000 g离心5 min,使RNA重新沉淀,将乙醇弃去,待RNA自然风干。用含有焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)的ddH₂O溶解。使用Nana-Drop仪器测量RNA的浓度。利用两步法,将RNA逆转录为cDNA,首先加入DNA Eraser于42℃反应5 min去除基因组DNA,然后加入逆转录酶和底物于37℃ 15 min、85℃ 5 s反应生成所需的cDNA。逆转录的cDNA保存于-20℃。将cDNA稀释5倍后,使用LightCycler480型Real-time PCR仪进行Q-PCR反应,测定3T3-L1细胞分化标志物以及VPS13A表达变化。反应程序为:95℃ 5 min,95℃、15 s,60℃ 1 min,35个循环,95℃ 10 s,60℃ continuous,40℃ 20 min。目的基因和内参引物如下:VPS13A上游引物5'-CACCAGTGCTATGGCTAA-3',下游引物5'-GTAA-CAATCCCTGTAATGC-3';CEBP α 上游引物5'-GCG-CAAGAGCCGAGATAAAG-3',下游引物5'-CGGT-CATTGTCACTGGTCAACT-3';CEBP β 上游引物5'-CGCCTTTAGACCCATGGAAG-3',下游引物5'-CCG-GTAGGCCAGGCAGT-3';PPAR γ 上游引物5'-CA-CAATGCCATCAGGTTTGG-3',下游引物5'-GCTG-GTCGATATCACTGGAGATC-3';内参基因36B4上游引物5'-CACTGGTCTAGGACCCGAGAAG-3',下游引物5'-GGTGCCTCTGGAGATTTTCG-3'。

1.2.4 免疫印迹法

3.5 cm细胞培养皿加入70 μ L细胞裂解液,裂解细胞10 min,转移至新的离心管中,于4℃ 12 000 g离心30 min,将上层的澄清蛋白液转到新的离心管。将蛋白原液用ddH₂O稀释50倍,将BCA蛋白浓度试剂盒中的A液与B液以100:2的比例混匀,将稀释的蛋白液10 μ L与反应液100 μ L混匀,加到96孔板,避光37℃条件下反应30 min,之后再用酶标仪测量吸光度,根据吸光度的结果计算出蛋白液浓度。在蛋白原液加入5 \times 的SDS,于37℃水浴60 min使蛋白变性。定量后的蛋白进行SDS-PAGE电泳,将电泳后的蛋白转移到PVDF膜上,用5%脱脂奶粉溶液于室温条件下封闭1~2 h,于4℃冰箱孵育抗体过夜,TBST洗膜30 min,用对应的二抗孵育1~2 h,TBST洗膜30 min,ECL化学发光法检测目的蛋白表达。

1.2.5 油红和BODIPY染脂滴

脂肪细胞分化成熟后,弃去培养基,加10%福尔马林处理5 min,弃去后再加入同体积的10%福尔马林孵育1 h,之后弃去福尔马林,用60%的异丙醇清

洗细胞,让细胞完全风干,再加入油红孵育10 min,之后,弃去油红并用ddH₂O洗4次,拍照。3T3-L1细胞长至80%左右,更换含5 μ g/mL BODIPY的培养基孵育20 min,共聚焦显微镜观察脂滴大小和形态。

1.3 统计学方法

所有计量数据均使用GraphPad Prism软件进行统计学分析。定量数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,结果采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VPS13A在3T3-L1细胞分化过程中表达升高

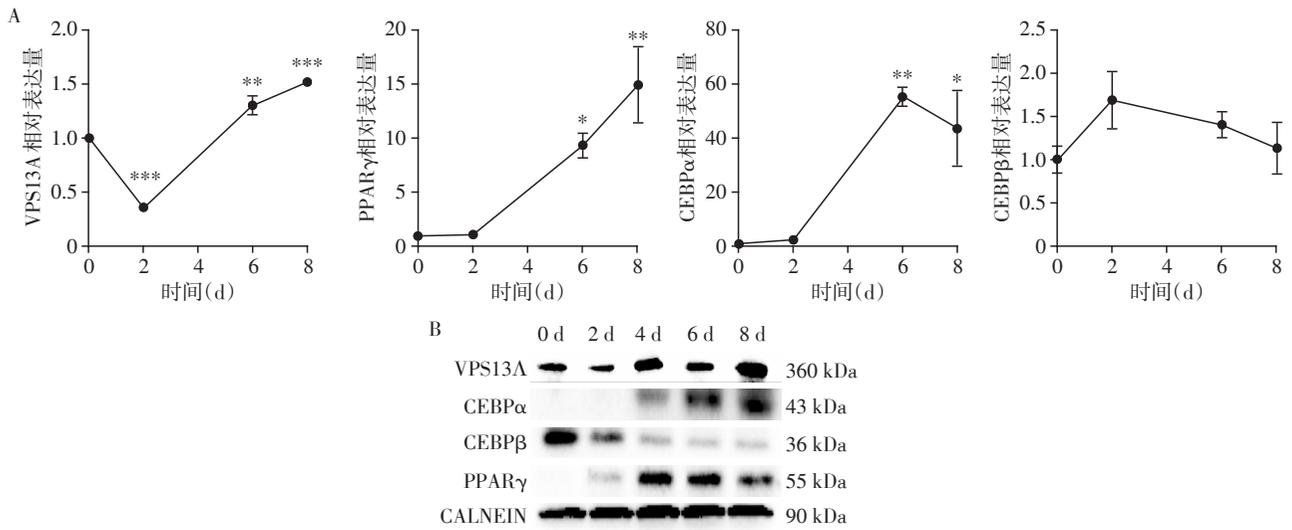
收取分化不同天数的3T3-L1细胞,分别提取RNA及蛋白分析分化相关的标志分子PPAR γ 、CEBP α 和VPS13A的表达水平,Q-PCR检测脂肪细胞分化相关标志蛋白的转录水平。结果表明,随着脂肪细胞分化,PPAR γ 和CEBP α 表达逐渐升高,VPS13A的表达在分化前期下降,而在分化的后期逐渐升高(图1A)。蛋白水平上进一步证明随着分化过程的进行,PPAR γ 和CEBP α 蛋白水平升高,VPS13A蛋白在分化前期下降,在后期逐渐升高(图1B)。以上结果提示VPS13A在3T3-L1细胞分化过程中受细胞分化状态的调节并具有一定的生理功能。

2.2 构建VPS13A稳定敲降的3T3-L1细胞系

本研究采用CRISPR/Cas9基因编辑技术沉默3T3-L1细胞中的VPS13A基因表达,其优势主要在于目的基因能够以高效率整合到基因组中,慢病毒感染时,三元载体共转染包装HEK293T细胞后,收集含病毒的培养基感染靶细胞3T3-L1,以构建稳定敲降VPS13A的细胞系。Q-PCR及Western blot验证基因敲降效果,结果表明VPS13A基因的表达被沉默(图2)。

2.3 将3T3-L1细胞诱导分化为成熟脂肪细胞

为了探究VPS13A对脂肪细胞的分化影响,对敲降VPS13A后的细胞及对照组细胞进行诱导分化。首先将3T3-L1细胞培养至密度达到80%~90%后,将细胞传代到3.5 cm细胞培养皿中,等细胞长满至100%并且继续让细胞接触抑制达到2 d后再更换新的分化培养液I(含DMEM高糖培养基、0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、5.0 μ mol/L地塞米松、1.0 μ mol/L罗格列酮、1.0 μ g/L胰岛素和10%胎牛血清),培养2 d,再换上分化培养液II(含1 μ g/L胰岛素和10%胎牛血清)继续培养6 d,之后用光学显微镜对细胞进行观察和拍摄。发现对3T3-L1细胞进



A: Q-PCR检测3T3-L1细胞分化过程中VPS13A及标志蛋白PPAR γ 、CEBP α 、CEBP β 的转录水平;与0 d比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; B: Western blot检测3T3-L1细胞分化过程中VPS13A及标志蛋白PPAR γ 、CEBP α 、CEBP β 的表达水平。

图1 VPS13A在3T3-L1细胞分化过程中的表达

Figure 1 VPS13A expression analysis during 3T3-L1 cell differentiation

行分化后,敲降了VPS13A的细胞内分化成熟的脂肪细胞更多,分化效率更高(图3)。

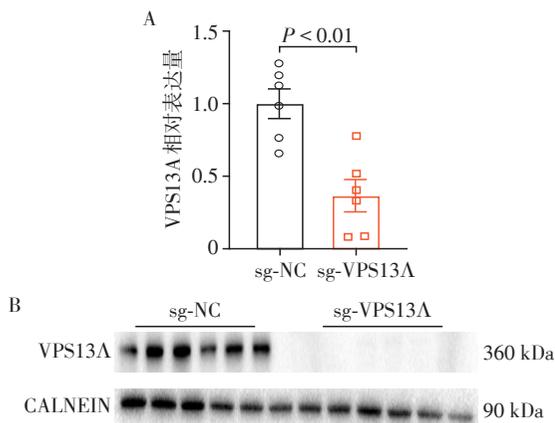
2.4 敲降VPS13A促进3T3-L1细胞分化

脂肪细胞分化过程对脂肪细胞的功能具有至关重要的作用,为了进一步探究VPS13A是否对脂肪细胞分化有影响。将感染对照病毒的3T3-L1细胞系和VPS13A稳定敲降的3T3-L1细胞系进行分化处理,发现敲降VPS13A能促进脂肪细胞分化。对分化后的细胞进行BODIPY和油红染色,发现敲降VPS13A的脂肪细胞分化8d后的脂滴水平明显高于对照组细胞(图4A、B)。提取分化前和分化后的

细胞蛋白Western blot检测分化相关标志蛋白的表达,发现分化标志蛋白PPAR γ 和CEBP α 在分化后明显升高(图4C),表明脂肪细胞分化成功;在此基础上我们发现分化标志蛋白CEBP β 、PPAR γ 和CEBP α 在VPS13A敲降组的水平明显高于对照组(图4C),这一结果提示VPS13A在脂肪细胞中敲降后能促进脂肪细胞的分化。

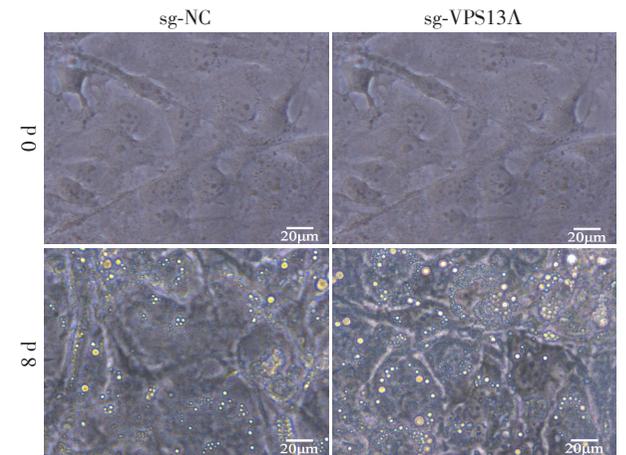
3 讨论

肥胖症由脂肪组织的过度扩张和增生所导致,肥胖与代谢性疾病和癌症的发生密切相关,因此构



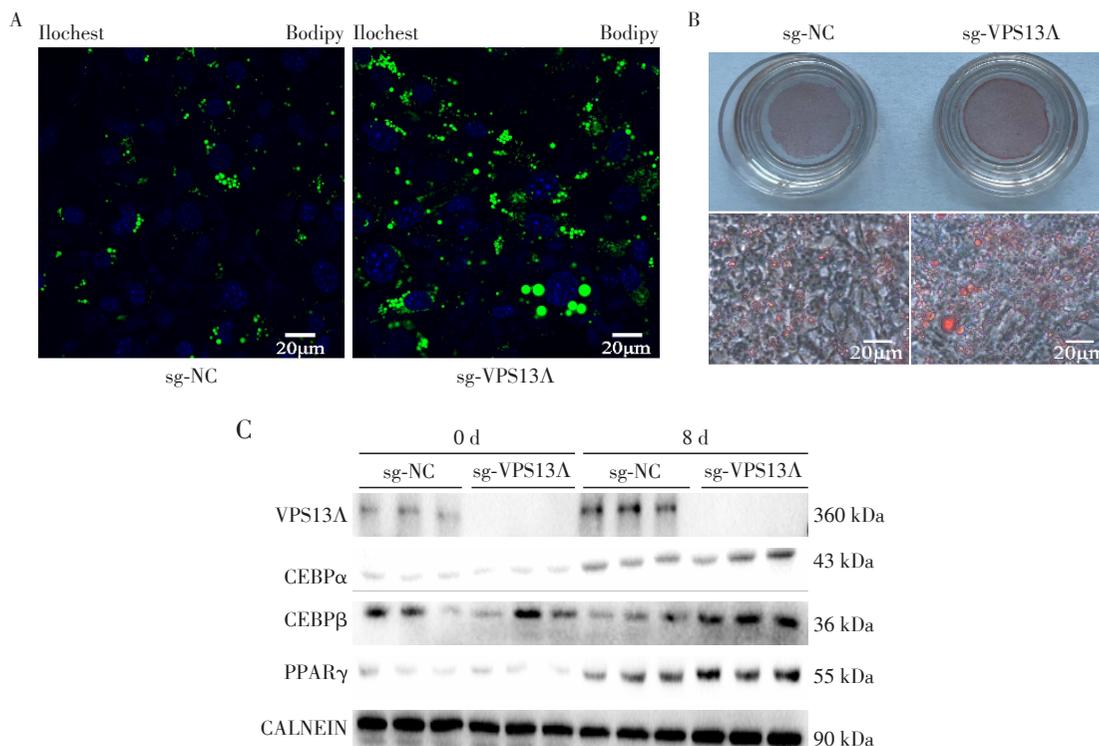
A: Q-PCR检测稳定敲降VPS13A基因的3T3-L1细胞系中VPS13A的表达水平; B: Western blot检测稳定敲降VPS13A基因的3T3-L1细胞系中VPS13A的表达水平。

图2 构建稳定敲降VPS13A基因的3T3-L1细胞系
Figure 2 The establishment of a VPS13A knockout 3T3-L1 stable cell line



3T3-L1未分化前的细胞形态与3T3-L1细胞经过诱导分化8d后的形态($\times 400$)。

图3 3T3-L1细胞诱导分化8d后细胞成长为成熟脂肪细胞
Figure 3 3T3-L1 cells induce the growth of mature adipocytes after 8 d differentiation



A: 稳定敲降 VPS13A 基因的 3T3-L1 细胞分化后第 8 天(脂肪细胞 BODIPY 染色, $\times 600$); B: 稳定敲降 VPS13A 基因的 3T3-L1 细胞分化后第 8 天(脂肪细胞油红染色, $\times 400$); C: 稳定敲降 VPS13A 基因的 3T3-L1 细胞分化 8 d 后 Western blot 检测 VPS13A、CEBP α 、CEBP β 、PPAR γ 的表达水平。

图 4 敲降 VPS13A 促进 3T3-L1 细胞分化

Figure 4 VPS13A knockdown promotes differentiation of 3T3-L1 cells

成了一个重大的公共卫生问题^[9]。近年来肥胖患病率显著升高^[10]。脂肪组织中脂肪细胞数量的增加主要在发育早期确定,在成年期达到稳定数量基本不再变化^[11]。分化后的脂肪细胞直径可达到数百微米且能够储存大量中性脂。啮齿类动物中的研究表明,在长期能量过剩的情况下,新的脂肪细胞可以从前体脂肪细胞中分化出现,并有助于脂肪组织的扩张^[12]。脂肪生成特指成纤维细胞样祖细胞积累营养成为成熟脂肪细胞的过程。可以将其视为两步过程。在第一步中,成纤维细胞样祖细胞形成脂肪前体细胞,这一步骤不会引起细胞形态的明显改变。第二步指特定的脂肪前体细胞经历生长停滞,积累脂质并形成功能性的,胰岛素反应性的成熟脂肪细胞。脂肪前体细胞在接触抑制阻碍其生长时,会激活 PPAR γ 、CEBP α 和 CEBP β 的主要调节因子,在分化完成后,成熟脂肪细胞表达早期脂肪细胞分化的所有标志物^[13]。PPAR γ 是脂肪形成的关键转录调节因子,调节脂肪从发育到代谢的基本进程,它对于脂肪细胞分化是必不可少的^[14],但是 PPAR γ 的生理配体仍旧未知。一般认为,脂肪组织的增生是健康和适应性的,能够维持正常的代谢水平。总体而言,干预脂肪生成是肥胖的有效治疗措施。对

脂肪生成的更多了解有望成为治疗各种疾病的新途径,包括代谢紊乱、脂肪营养不良、肥胖和罕见病等,这可能通过某些调节脂肪生成的基因影响。

真核生物中的细胞器具有不同的脂质组成。细胞器的生长和扩增需要直接或间接地从其合成位点 ER 靶向传递脂质。证据表明,非囊泡脂质转运代表了大量脂质的主要运输途径^[15]。VPS13A 是继氧化甾醇结合蛋白相关蛋白 5/8 (oxysterol binding protein related proteins 5/8, ORP5/8) 和 PDZ 结构域包含蛋白 8 (PDZ domain containing protein 8, PDZD8) 之后第 4 种具有脂质结合结构域的哺乳动物蛋白^[16-17],已有研究表明 VPS13A 定位于细胞内内质网-脂滴接触部位,并且 VPS13A 敲降后细胞内脂滴增多,提示 VPS13A 在脂肪生成中具有重要作用。

具有生理作用的细胞系可以作为动物或人类研究的替代方案^[18],其中 3T3-L1 细胞是一种成熟脂肪细胞培养模型^[19]。本研究首先用 Western blot 及 Q-PCR 明确了 3T3-L1 细胞分化过程中 VPS13A 的表达变化,用 3T3-L1 细胞诱导分化为脂肪细胞,分别收取不同分化天数的细胞检测 VPS13A 的表达水平,结果显示在细胞分化的第 2 天, VPS13A 的表达水平较第 0 天相比下调,上述研究结果显示脂肪细

胞分化早期下调VPS13A的表达,而在分化中后期(第4天开始),VPS13A的表达逐渐上调,因此推测VPS13A在脂肪细胞分化过程中可能发挥作用。于是运用CRISPR/Cas9系统构建了稳定敲降VPS13A的3T3-L1单克隆细胞系用于研究VPS13A在脂肪生成中的作用。本研究首先将对照组细胞和稳定敲降VPS13A的3T3-L1单克隆细胞进行了诱导分化,于光学显微镜下观察经过诱导分化8 d后细胞的形态。结果表明,敲降VPS13A的3T3-L1细胞内分化程度更高,脂滴生成更多。该结果初步说明了VPS13A在脂肪细胞分化过程中的重要作用。为了进一步探究VPS13A在脂肪生成和分化中起到的作用,将对照组细胞和稳定敲降VPS13A的3T3-L1细胞系进行诱导分化后,BODIPY和油红染脂滴观察细胞的脂滴情况,同时用Western blot检测细胞分化前后VPS13A及脂肪细胞分化标志物蛋白的表达变化,结果显示,VPS13A敲降的细胞分化到第8天时,分化程度更高,且分化标志物蛋白CEBP β 和PPAR γ 均升高,提示VPS13A在脂肪的生成中发挥了促进作用。但是VPS13A是如何调控脂滴的数量和脂肪生成以及VPS13A如何影响到PPAR γ 蛋白表达水平的变化仍需要进一步的研究探索。本研究通过对3T3-L1细胞分化过程中VPS13A的表达水平及调控的初步探索,为VPS13A在脂肪细胞中的功能和作用机制提供了实验基础。

[参考文献]

- [1] ASSUMPCAO J A F, PASQUARELLI-DO-NASCIMENTO G, DUARTE M S V, et al. The ambiguous role of obesity in oncology by promoting cancer but boosting antitumor immunotherapy[J]. *J Biomed Sci*, 2022, 29(1): 1-27
- [2] 季学涛,张许,李仲.脂肪组织中自噬影响肥胖发病机制的研究进展[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*. 2023, 43(2): 275-282
- [3] PICHE M E, TCHERNOF A, DESPRES J P. Obesity phenotypes, diabetes, and cardiovascular diseases [J]. *Circ Res*, 2020, 126(11): 1477-1500
- [4] 王雨竹,张许,李仲.成熟SVFs细胞与Hepa1-6细胞共培养模型的建立及对肝细胞脂代谢的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*. 2022, 42(5): 603-609
- [5] DZIURDZIK S K, CONIBEAR E. The Vps13 family of lipid transporters and its role at membrane contact sites [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 2905-2921
- [6] PARK J S, NEIMAN A M. XK is a partner for VPS13A: a molecular link between Chorea - Acanthocytosis and McLeod Syndrome [J]. *Mol Biol Cell*, 2020, 31(22): 2425-2436
- [7] CAI S, WU Y, GUILLEN-SAMANDER A, et al. In situ architecture of the lipid transport protein VPS13C at ER-lysosome membrane contacts [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(29): 3769-3778
- [8] YESHAW W M, VAN DER ZWAAG M, PINTO F, et al. Human VPS13A is associated with multiple organelles and influences mitochondrial morphology and lipid droplet motility [J]. *eLife*, 2019, 8(37): 31-68
- [9] BOU MALHAB L J, ABDEL-RAHMAN W M. Obesity and inflammation: colorectal cancer engines [J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2022, 15(4): 620-646
- [10] CHOOI Y C, DING C, MAGKOS F. The epidemiology of obesity [J]. *Metabolism*, 2019, 92: 6-10
- [11] SPALDING K L, ARNER E, WESTERMARK P O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans [J]. *Nature*, 2008, 453(7196): 783-787
- [12] AUDANO M, PEDRETTI S, CARUSO D, et al. Regulatory mechanisms of the early phase of white adipocyte differentiation: an overview [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(3): 139-153
- [13] BAHMAD H F, DAOUK R, AZAR J, et al. Modeling adipogenesis: current and future perspective [J]. *Cells*, 2020, 9(10): 2326-2347
- [14] ZHAO G N A, TIAN Z W, TIAN T, et al. TMBIM1 is an inhibitor of adipogenesis and its depletion promotes adipocyte hyperplasia and improves obesity-related metabolic disease [J]. *Cell Metab*, 2021, 33(8): 1640-1654
- [15] REINISCH K M, PRINZ W A. Mechanisms of nonvesicular lipid transport [J]. *J Cell Biol*, 2021, 220(3): 2058-2069
- [16] MONTEIRO-CARDOSO V F, ROCHIN L, ARORA A, et al. ORP5/8 and MIB/MICOS link ER-mitochondria and intra-mitochondrial contacts for non-vesicular transport of phosphatidylserine [J]. *Cell Rep*, 2022, 40(12): 1113-1177
- [17] JEYASIMMAN D, ERCAN B, DHARMAWAN D, et al. PDZD-8 and TEX-2 regulate endosomal PI(4,5)P(2) homeostasis via lipid transport to promote embryogenesis in *C. elegans* [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 26177-26198
- [18] SUCHY T, KACZMAREK I, MARICIC T, et al. Evaluating the feasibility of Cas9 overexpression in 3T3-L1 cells for generation of genetic knock-out adipocyte cell lines [J]. *Adipocyte*, 2021, 10(1): 631-645
- [19] KASSOTIS C D, HOFFMAN K, VOLKER J, et al. Reproducibility of adipogenic responses to metabolism disrupting chemicals in the 3T3-L1 pre-adipocyte model system: an interlaboratory study [J]. *Toxicology*, 2021, 461(15): 2900-2926

[收稿日期] 2023-03-27

(本文编辑:唐震)