

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.05.010

Lamp2a 参与 Plin5 在肝脏脂质分解中的作用 *

马硕怡 王敬博 周霞 张苗 张帅 郭冠亚 王敏 周新民[△]

(第四军医大学西京消化病医院肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨肝脏中 lamp2a 对 plin5 表达及其功能的影响。**方法:**利用 Western blot 及免疫组化检测正常人和脂肪肝患者肝脏中 lamp2a 与 plin5 表达相关性。利用 HepG2 细胞构建 lamp2a 敲减的细胞系 HepG2-L2A, 通过给予油酸刺激、溶酶体抑制剂处理等进一步在细胞水平证实其相关性。**结果:**Western-Blot 及免疫组化检测显示脂肪肝患者肝组织中 lamp2a 的表达明显下降, 而 plin5 表达显著升高。Western-Blot 试验提示正常培养的 HepG2-L2A 细胞中 plin5 表达较 HepG2 细胞中升高, Bodipy 染色提示 HepG2-L2A 细胞中脂滴数量也明显增加 (124 ± 15.3 vs 273 ± 19.1)。在分解试验中, HepG2 细胞中 plin5 明显降低, 脂滴数量也明显减少 (282 ± 24.1 vs 192 ± 17.5); 而 HepG2-L2A 细胞中 plin5 仍然处于高水平, 脂滴数量仍然较多 (325 ± 24.0 vs 286 ± 28.7)。当给予溶酶体抑制剂处理时, HepG2 细胞中 plin5 降解明显抑制, 而 HepG2-L2A 中 plin5 水平未见明显改变。**结论:**肝脏中 lamp2a 的异常表达影响 plin5 的表达, 进而影响了脂质的分解。

关键词: Lamp2a; plin5; 脂质分解

中图分类号: R-33; R575.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)05-847-05

Lamp2a Participates in the Function of Plin5 in Liver Lipidolysis*

MA Shuo-yi, WANG Jing-bo, ZHOU Xia, ZHANG Miao, ZHANG Shuai, GUO Guan-ya, WANG Min, ZHOU Xin-min[△]

(State Key Laboratory of Cancer Biology, Xijing Hospital of Digestive Diseases, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect that lamp2a regulates expression and function of plin5 in liver. **Methods:** Western Blot and immunohistochemical staining were applied to detect the expression of lamp2a and plin5 as well as their relationship in liver. To further investigate their relation in cellular level, we built a cell lines named HepG2-L2A that lamp2a was knocked out. In the condition of containing oil acid or lysosome inhibitor, the expression level of lamp2a and plin5 was detected in HepG2 and HepG2-L2A cells. **Results:** Western Blot and immunohistochemical staining suggested, in the liver of patients with nonalcoholic fatty liver disease, the expression of lamp2a was significantly reduced but plin5 markedly increased as compared to normal humans. Western Blot showed that expression of plin5 in HepG2-L2A was moderately increased in regular cultivation, Bodipy staining showed number of lipid droplets in HepG2-L2A also increased (124 ± 15.3 vs 273 ± 19.1). However, the level of plin5 was sharply reduced in HepG2 but no obvious alteration was observed in HepG2-L2A when cells were cultivated with medium not contained serum after oil acid was taken. Likewise, the number of lipid droplets was obviously lessened in HepG2 (282 ± 24.1 vs 192 ± 17.5) but no significant reduce in HepG2-L2A (325 ± 24.0 vs 286 ± 28.7) when cultivated as above. Besides, there was distinct increase in plin5 expression in HepG2 when lysosome inhibitor was given, but no change of plin5 expression in HepG2-L2A. **Conclusions:** In liver, the abnormal expression of lamp2a influenced the expression of plin5 as well as lipidolysis.

Key words: Lamp2a; Plin5; Lipidolysis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R575.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)05-847-05

前言

非酒精性脂肪性肝病 (Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指一组连续的肝脏异常改变, 可以进展为肝炎、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌, 其以肝内的甘油三酯 (triglyceride, TG) 含量增加为主要特点^[1]。NAFLD 的发病机制目前尚不是很

明确, 胰岛素抵抗被认为与其发生发展密切相关。

但是, 近年来自噬在 NAFLD 等代谢相关疾病中的研究越来越多。研究发现, 无论是在体内还是体外试验中, 抑制自噬均能增加细胞内 TG 和脂滴的含量, 自噬功能的丧失减少了 TG 的分解^[6]。分子伴侣自噬 (Chaperonemediated autophagy, CMA) 是自噬的一种, 其在脂代谢中的作用近年来也逐步被阐明^[7]。

* 基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81400646); 国家重大新药创制项目 (2014ZX09508002-001)

作者简介: 马硕怡 (1991-), 硕士研究生, 主要研究方向: 慢性肝病的防治, 电话: 15114887906, E-mail: msy_fmhu@163.com

[△] 通讯作者: 周新民 (1963-), 教授, 主要从事慢性肝病的发病机制及治疗方面的研究, 特别是肝功能衰竭的人工肝支持治疗,

E-mail: zhouxmm@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2017-10-25 接受日期: 2017-11-20)

Lamp2a 是 CMA 的核心分子,研究^[9]发现在小鼠肝脏中特异性敲除 lamp2a,其肝脏表现出明显的脂滴堆积,而外周脂肪却显著减少。这种现象可能是由于 lamp2a 的缺乏造成 CMA 功能障碍,进而 CMA 对脂滴包被蛋白(perilipins,plins)的清除障碍,导致大自噬和胞浆脂酶不能接触到脂滴表面从而将其分解^[9]。Plins 目前被定义为 plin 超家族,其中包括 5 个成员即 plin1-5,它们的主要功能是调节细胞内脂质的储存和维持脂质稳态^[10]。Plin5 是该家族中的第 5 个成员,主要分布在心肌、骨骼肌、棕色脂肪及肝脏等高度氧化的组织^[12]。近年来对 plin5 的研究逐渐增多,目前研究发现 plin5 参与心肌的脂质代谢,通过抑制脂肪酸过度氧化保护心肌免受氧化损伤^[13,14]。也有越来越多的研究表明,plin5 在骨骼肌脂质及能量代谢、运动耐力适应等方面发挥重要作用^[15-17]。而 plin5 在肝脏中的功能目前研究较少,wang 等^[18]构建了 plin5 全身敲除的小鼠,发现该小鼠肝脏中脂滴减少,炎症因子高表达,内质网应激及脂质过氧化等相关指标均增高,而且血清转氨酶和胆红素也升高,从而认为 plin5 敲除导致了肝脏脂毒性损伤。而 plin5 的存在可以通过抑制脂质过氧化而保护肝脏不被脂毒性损伤。Plin5 在肝脏脂代谢中的作用目前尚无更多报道。

通过上述文献回顾发现 lamp2a 和 plin5 在机体脂代谢中发挥着非常重要的作用,那么在肝脏的脂代谢中 lamp2a 的表达异常是否会影响 plin5 的表达及其功能呢?目前尚无研究报道。所以本研究旨在探讨肝脏中 lamp2a 的表达异常是否影响了 plin5 的表达及其功能?

1 材料和方法

1.1 组织来源及处理

正常人与脂肪肝患者冰冻肝组织及组织石蜡切片均来自于第四军医大学西京医院肝胆外科。称取 0.3g 冰冻肝组织进行蛋白提取,石蜡切片用于免疫组化染色。

1.2 细胞与药品

人类肝癌细胞系 HepG2 由肿瘤生物学国家重点实验室提供,HepG2-L2A 细胞由百奥赛图生物公司利用亲本细胞 HepG2 通过 CRISPR/Case9 敲减 lamp2a 获得。油酸(Oil acid, OA)、溶酶体抑制剂亮抑肽酶(Leupeptin, Leup)、氯喹(Chloroquine, Chlor)、牛血清白蛋白(BSA)均购自 Sigma 公司。Lamp2a 抗体购自 abcam 公司,plin5 抗体购自 Novus Biologicals 生物公司, β -actin 抗体购买自美国 Bioworld 公司。Bodipy 荧光染料购自 Life Technologies 公司。促细胞贴壁的多聚赖氨酸、染细胞核的 DAPI 和防荧光淬灭剂均购自碧云天公司。胎牛血清购自 BI 公司。0.25%胰蛋白酶来自 Gibico 公司。

1.3 Western Blot 实验

将细胞铺在 6 孔板中,待长满后,倒掉培养基,用冰 PBS 洗 3 次,每孔加入 150 μ L 含 10%蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA,放在冰上在摇床上放置 15 min,用细胞刮将细胞刮至 1.5 mL 离心管中,继续于冰上在摇床放置 15 min。超声后在 4 $^{\circ}$ C 离心机 12000 r/min 离心 15 min。吸取 100 μ L 上清并加入 25 μ L 上样缓冲液 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min。配制 8%的胶进行电泳,每孔加入 10 μ L 蛋白样品,恒流 25 mA。然后半干转 25 V,30 min。室温 5%脱脂牛奶孵育 1 h,加入用 5%BSA 稀释好的一抗

4 $^{\circ}$ C 过夜。第二日回收一抗,用 TBST 在摇床上洗 3 次 5 min。加入用 2.5%脱脂牛奶配制的二抗,室温孵育 1 h。用 TBST 在摇床上洗 3 次 5 min。最后用 Image Lab 软件(Bio-Rad)显影。

1.4 OA 的配制及其刺激实验

首先用双蒸水配制 0.1 mol/L 的氢氧化钠,用 PBS 配制 20%的 BSA,向配制好的氢氧化钠中加入油酸,待完全溶解后与 20%的 BSA 混合,然后与 55 $^{\circ}$ C 水浴溶解,待变清亮后恢复至室温,于 4 $^{\circ}$ C 保存。用 100 μ mol/L 的油酸刺激细胞 8 h,若需要观察分解情况则继续用不含血清和含血清的培养基培养 16 h。

1.5 Bodipy 染色

将细胞铺在荧光小室中,铺之前在小室中加入赖氨酸促进细胞贴壁。待细胞贴壁后进行 Bodipy 染色。首先倒掉培养基,用 PBS 洗 3 次,4%多聚甲醛固定 15 min,倒掉甲醛,用 PBS 洗 3 次每次 5 min。每孔加入 Bodipy 染料 0.1 μ g/mL,避光放入 37 $^{\circ}$ C 孵箱 20 min。用 PBS 洗 3 次 5 min。每孔加入 DAPI 染核(1:1000 稀释)室温避光 10 min。PBS 洗 3 次 5 min。用防荧光淬灭剂封片。共聚焦显微镜观察并拍照。

1.6 统计分析

统计分析均是对三次独立实验结果进行统计。Western blot 条带灰度分析及 Bodipy 染色脂滴计数均利用 Image J 软件。定量数据统计分析及作图均利用 Prism Graphpad 5 软件,两组之间的比较利用 t 检验, $P < 0.05$ 时定义为有统计学差异。数据采用均数 $\pm$ 标准差来表示。

2 结果

2.1 在人的肝脏中 lamp2a 与 plin5 表达存在显著负相关

为了说明在人的肝脏中 plin5 表达受到 lamp2a 的影响,我们分别检测了正常人和脂肪肝患者中 lamp2a 与 plin5 的表达水平。结果发现,脂肪肝患者较正常人相比 lamp2a 表达明显降低,而 plin5 水平却显著升高(图 1)。这表明可能是由于 lamp2a 表达下降,导致 plin5 等脂滴包被蛋白水平升高,从而使脂滴分解障碍,导致脂滴在肝细胞内堆积,进而导致肝细胞脂肪变性。

2.2 在细胞水平 lamp2a 缺乏导致了 plin5 降解障碍

为了说明是由于 lamp2a 表达下降导致 plin5 等脂滴包被蛋白降解异常从而导致肝细胞脂肪变性的发生,我们成功构建了在 HepG2 细胞中敲除 lamp2a 细胞系 HepG2-L2A (图 2, a)。发现在正常培养条件下 (None)HepG2-L2A 细胞中 plin5 水平较 HepG2 细胞中轻度升高;当同时给予 100 μ mol/L OA 刺激 8 h(OA),两种细胞中 plin5 表达同步升高;撤掉 OA,加入含有血清的培养基继续培养 16 小时后(OA>S+),两种细胞中 plin5 表达仍然同步升高;但是,当加入不含血清的培养基培养时(OA>S-),此时细胞的能量供应以前期吸收合成的脂质为主,我们发现在 HepG2 中 plin5 明显下降,而 HepG2-L2A 细胞中 plin5 仍然处在高水平(图 2, b)。这提示我们在 HepG2-L2A 中 plin5 的合成可能是正常的,但是 plin5 的降解出现了异常。那么,这种异常是否导致细胞内脂滴的降解异常呢?所以我们发现分别检测了上述四种培养条件下细胞内脂滴的形成情况(图 2, c, d)。结果发现,细胞内脂滴的数量改变情况与 plin5 表达水平高度相似,即正常培养时 HepG2-L2A 中脂滴数量较 HepG2 中轻度升高(124 $\pm$ 15.3 vs 273 $\pm$ 19.1),OA 刺激及撤掉油酸继

续用含有血清的培养基培养时两种细胞内脂滴均同步升高 (HepG2, 232 ± 28.4 vs 282 ± 24.1 ; HepG2-L2A, 321 ± 36.2 vs 325 ± 43.0), 而撤掉油酸用不含血清培养基培养时, HepG2 中

脂滴显著减少 (282 ± 24.1 vs 192 ± 17.5), HepG2-L2A 中脂滴未见明显减少 (325 ± 43.0 vs 286 ± 28.7)。以上结果表明, lamp2a 不仅影响了 plin5 的降解, 也通过 plin5 影响了脂滴的分解。

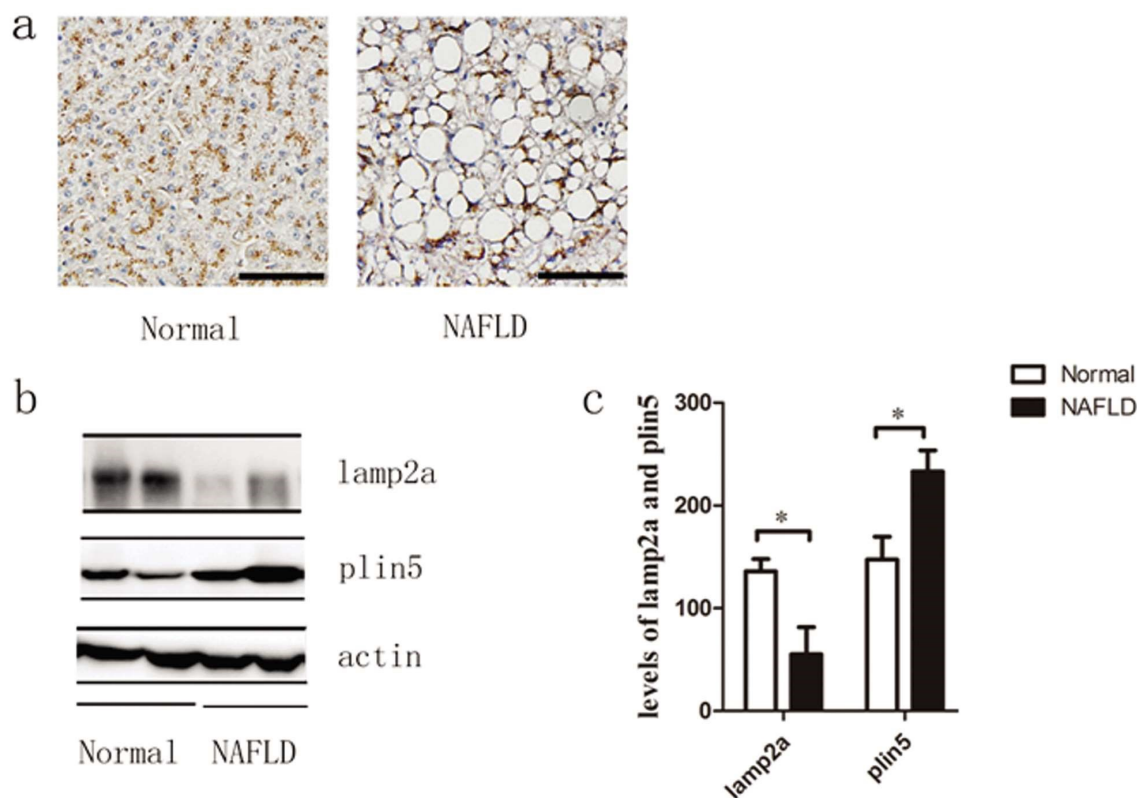


图1 人肝组织中 lamp2a 与 plin5 表达水平的检测

a: 正常人和脂肪肝患者 lamp2a 分子免疫组化, 黑色线条代表 $100 \mu\text{m}$; b: 正常人和脂肪肝患者肝组织蛋白中 lamp2a 与 plin5 表达水平检测; c: b 图灰度值定量。

Fig.1 Expression level of lamp2a and plin5 in human liver

a: Immunohistochemical reactivity for lamp2a in normal people and NAFLD patients, the black bars correspond to $100 \mu\text{m}$; b: The expression of lamp2a and plin5 in liver of normal people and NAFLD patients; c: Quantity of gray value in figure b.

2.3 抑制溶酶体功能导致 plin5 降解也被抑制

由于 lamp2a 是定位在溶酶体膜上的转运蛋白, 大部分需要在溶酶体内降解的蛋白都要通过其膜上 lamp2a 的转运才能进入腔内被降解。那么, plin5 是否也是经 lamp2a 转运进入溶酶体被降解的呢? 为了验证这样的假设, 我们用两种不同作用的溶酶体抑制剂处理 HepG2 和 HepG2-L2A 的细胞, 结果发现在 HepG2 中抑制溶酶体功能, plin5 水平明显升高 (图 3, a, b), 而 HepG2-L2A 中抑制溶酶体功能 plin5 水平并没有显著改变 (图 3, c, d)。这表明 plin5 可能是在溶酶体内降解的, 而 lamp2a 敲减能够影响 plin5 在溶酶体中的降解。

3 讨论

自噬是一种生物体内的分解过程, 主要是指细胞内一些衰老的细胞器、废弃蛋白等在溶酶体内降解的过程, 包括三种形式: 大自噬、分子伴侣自噬和小自噬^[19]。研究发现, 当体外培养的肝细胞急性脂肪酸暴露时, 自噬会被激活从而清除胞浆内的大量脂滴。但是, 当长期暴露于高脂环境时, 自噬却被抑制^[6]。因此, 有人认为慢性的营养过剩可能导致了自噬功能抑制, 自噬

被抑制后细胞内脂质进一步聚集, 形成恶性循环, 导致肝脏整个能量代谢异常^[20]。分子伴侣自噬 (CMA) 是一种选择性的自噬, 主要是选择性降解胞浆内含有 KEFRQ 样序列的可溶性胞浆蛋白^[21]。Lamp2a 是 CMA 的关键功能分子, 是 lamp2 (lysosomal associated membrane protein, lamp2) 分子的一种亚型。Lamp2 是分布在溶酶体膜上的转运蛋白, 有三种不同的剪接体, 分别是 lamp2a、lamp2b、lamp2c, 每种剪接体在自噬过程中扮有不同的角色^[22]。Lamp2b 可能参与了大自噬^[23], 而且 lamp2b 的缺乏可能与 Danon 病的发生有关^[24]。Lamp2c 可能是一种内体受体, 可以结合游离的胞浆 RNA 和 DNA^[25], 也可能对 CMA 的功能有抑制作用^[26]。而 lamp2a 目前认为参与了胞浆 MHC II 抗原向 CD4⁺T 细胞的提呈^[27], 但更重要的是参与了 CMA, 它是 CMA 的底物结合受体, 当底物与其结合时, 可以将底物摄取并转运进溶酶体被降解^[28]。CMA 主要是通过对脂滴包被蛋白 (plins) 家族分子的降解参与脂质代谢。而且, CMA 可能是脂代谢过程中的闸门, 只有通过 CMA 对脂滴蛋白的降解使脂滴内部的甘油三酯暴露, 大自噬 (在脂代谢中也被称作脂噬) 或者胞浆脂酶才能接近脂滴并将其分解^[9]。Plins 家族有 5 个成员,

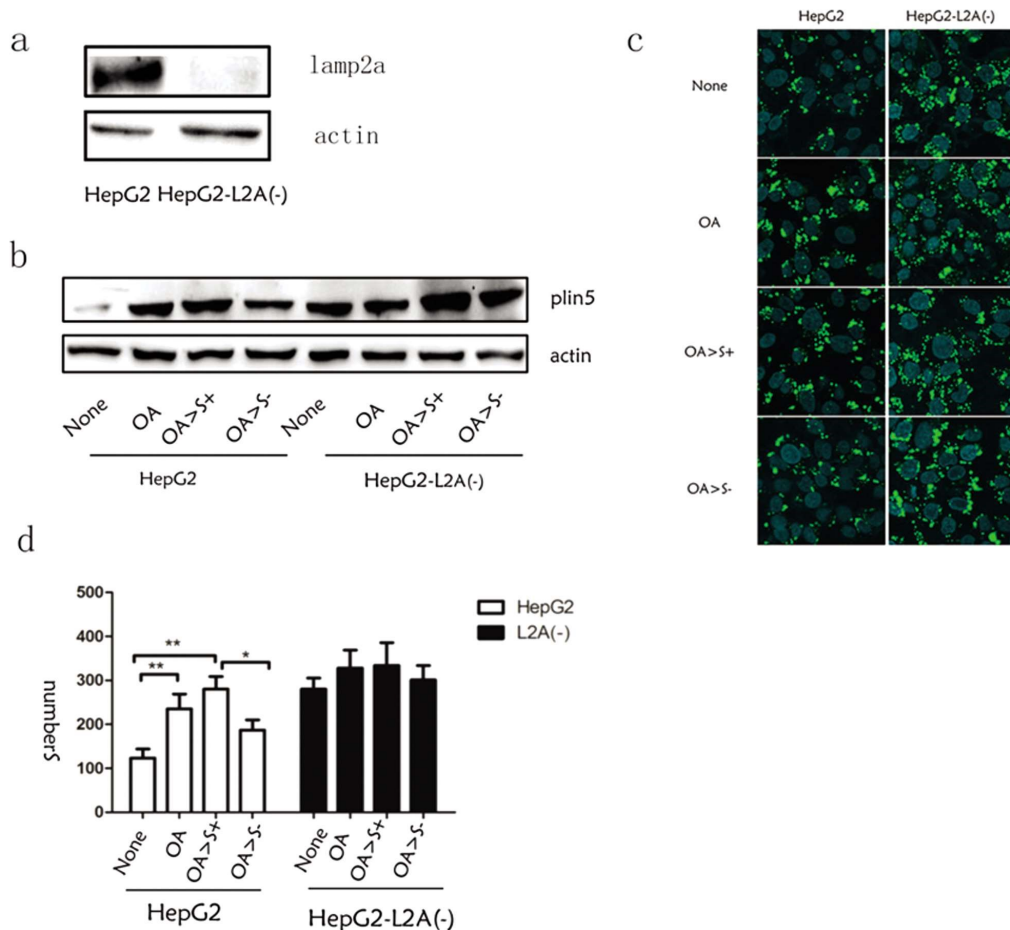


图2 lamp2a 敲减导致 plin5 降解异常,影响脂滴分解

a: 成功构建 lamp2a 敲减细胞系;b:在 None、OA、OA>S+、OA>S+ 培养条件下 plin5 表达水平检测;c: 在 None、OA、OA>S+、OA>S+ 培养条件下细胞内脂滴含量检测(bodipy 染色);d: c 图脂滴数量统计。

Fig. 2 The knockout of lamp2a led to the abnormality of plin5 degradation and influenced the catabolism of lipid droplets.

a: Build the cell lines of lamp2a knockout; b: The expression of plin5 in the different condition including None, OA, OA>S+, OA>S+; c: Bodipy staining for lipid droplets in the different condition including None, OA, OA>S+, OA>S+; d: Statistics of lipid droplets number in figure c.

plin1 主要分布在脂肪组织, plin2 与 plin3 在组织中广泛分布, plin4 主要存在于白色脂肪组织, plin5 主要分布在心脏、骨骼肌、棕色脂肪及肝脏等高度氧化的组织。目前研究发现 5 个成员共有的功能主要包括调节胞浆脂滴大小, 介导细胞器间的相互作用, 维持脂质稳态及平衡脂毒性^[29]。而各个成员的功能又各有不同。在小鼠心肌细胞过表达 plin5, 导致大量的甘油三酯以脂滴的形式在细胞内聚集, 心肌细胞出现脂肪变性。这种改变与甘油三酯脂酶敲除小鼠的改变相似^[30]。而在心肌细胞敲除 plin5, 表现出甘油三酯储存减少, 同时脂肪酸氧化增加, 氧化应激增强^[31]。因此, plin5 在心肌细胞中可能起到平衡脂肪酸 β -氧化和脂毒性的作用。在肝脏中, plin5 的缺乏主要与肝脏中降低的甘油三酯含量、增高的脂质氧化、血清酮体相关, 但是并未影响的全身的血糖耐受和胰岛素敏感性^[32]。与其他 plin 蛋白不同, plin5 在能量缺乏时发挥比较特殊的功能, 可能促进了脂滴向线粒体的接近, 方便氧化供能, 同时也能形成胞浆池, 保护过量的毒性脂肪酸和代谢产物损伤。具体机制目前尚不清楚^[33]。Lamp2a 和 plin5 各自在脂质代谢中的作用已经被大量研究证实, 但是 lamp2a 是否参与 plin5 在肝脏脂质代谢中的作用, 目前尚无研究报道。我们的研究表明, 较正常人相比, 在脂肪肝患者的肝组织中 lamp2a 表达明显下降, 而 plin5 表达明显升高。

虽然脂肪肝患者及动物模型中 plin5 的升高已经有研究报道^[18], 但脂肪肝中 lamp2a 的下降我们是首次报道。体外实验发现, 在 lamp2a 缺乏时, plin5 表达升高。这与体内结果一致。为了进一步证实 plin5 的增高是因为合成增多还是分解障碍, 我们设计了油酸刺激实验。结果发现, 当油酸刺激及撤掉油酸给予血清丰富的培养基继续培养时, 野生型的 HepG2 细胞和 lamp2a 敲减的细胞中, plin5 都出现了同步增加。相反, 当撤掉油酸给予不含血清的培养基继续培养时, 发现 HepG2 细胞中 plin5 显著分解, 而 lamp2a 敲减后 plin5 并未分解。这说明 lamp2a 敲减可能影响了 plin5 的降解, 而并未影响其合成。这初步提示, 在脂肪肝中 plin5 的升高, 可能是由于 lamp2a 表达下降导致其降解障碍。由于 plin5 的其中一个重要功能是维持脂滴稳态, 所以我们进一步检测了脂滴的形成情况。发现 lamp2a 在影响 plin5 降解的同时, 也同时影响了它的功能, 导致了脂滴的分解障碍, 从而在细胞内聚集。由于 lamp2a 定位在溶酶体膜上, 为了进一步阐明 lamp2a 对 plin5 的调控, 我们验证了 plin5 与溶酶体的关系。结果发现抑制溶酶体功能, 确实能够抑制 plin5 降解。以上结果表明, lamp2a 调控 plin5 在脂代谢中的作用, 而且是通过溶酶体途径。但是, 溶酶体参与的细胞过程十分复杂, 如大自噬、小自噬等最终均回归到溶酶体途径。那

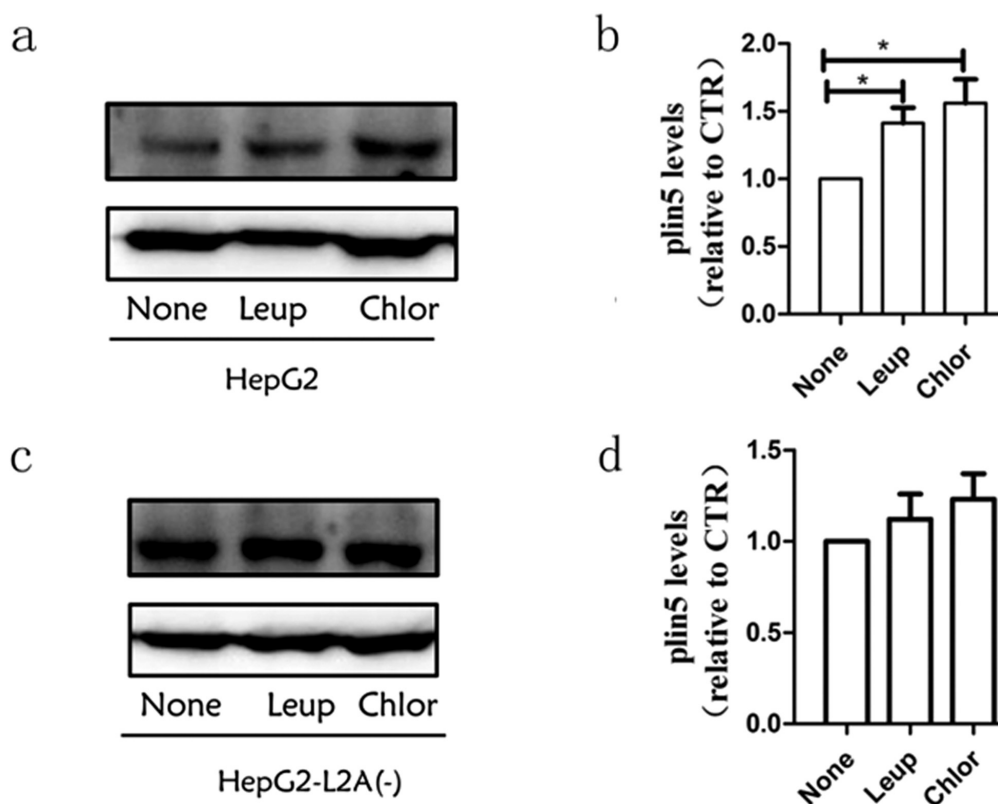


图3 plin5 通过溶酶体降解

a: HepG2 细胞中加入溶酶体抑制剂 Leup、Chlor 后 plin5 表达升高;b:a 图灰度值相对定量;c: HepG2-L2A 细胞中加入溶酶体抑制剂 Leup、Chlor 后 plin5 表达未发生显著改变;d: c 图灰度值相对定量。

Fig. 3 The degradation of plin5 depended on lysosome

a: The expression of plin5 increased in HepG2 when the lysosome inhibitors were added in medium; b: Quantity of gray value in figure a;

c: The expression of plin5 was unaltered in HepG2-L2A when the lysosome inhibitors were added in medium; d: Quantity of gray value in figure c.

么 lamp2a 对 plin5 的调控又是通过溶酶体的何种途径,需要更进一步的试验来证实。

本文从体内 lamp2a 与 plin5 表达相关性出发,在细胞水平证实了 lamp2a 参与了 plin5 在肝脏脂质分解中的作用。但是,由于临床上脂肪肝患者肝组织获取难度较大,我们只检测了 2 例脂肪肝患者的肝组织中 lamp2a 与 plin5 的表达,这是本文主要不足。此外,由于 plin5 抗体不好用,所以未能做肝组织中 plin5 的免疫组化染色。由于本文存在以上不足,所以未来需要更多的研究去证实本文结论。

参考文献(References)

- [1] Schweitzer G G, Klein S. Exercise and NAFLD: Is it worth the effort? [J]. *Hepatology*, 2017
- [2] Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism[J]. *Nature*, 2009, 458(7242): 1131-1135
- [3] Tasset I, Cuervo A M. Role of chaperone-mediated autophagy in metabolism[J]. *FEBS J*, 2016
- [4] Schneider J L, Suh Y, Cuervo A M. Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation [J]. *Cell Metab*, 2014, 20(3): 417-432
- [5] Kaushik S, Cuervo A M. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis [J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(6): 759-770
- [6] Mason R R, Watt M J. Unraveling the roles of PLIN5: linking cell biology to physiology [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26 (3): 144-152
- [7] Khor V K, Shen W J, Kraemer F B. Lipid droplet metabolism[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2013, 16(6): 632-637
- [8] Kuramoto K, Okamura T, Yamaguchi T, et al. Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(28): 23852-23863
- [9] Drevinge C, Dalen K T, Mannila M N, et al. Perilipin 5 is protective in the ischemic heart[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 219: 446-454
- [10] Mason R R, Mokhtar R, Matzaris M, et al. PLIN5 deletion remodels intracellular lipid composition and causes insulin resistance in muscle [J]. *Mol Metab*, 2014, 3(6): 652-663
- [11] Mokhtar R A, Montgomery M K, Murphy R M, et al. Perilipin 5 is dispensable for normal substrate metabolism and in the adaptation of skeletal muscle to exercise training [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2016, 311(1): E128-E137
- [12] Laurens C, Bourlier V, Mairal A, et al. Perilipin 5 fine-tunes lipid oxidation to metabolic demand and protects against lipotoxicity in skeletal muscle[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 38310
- [13] Wang C, Zhao Y, Gao X, et al. Perilipin 5 improves hepatic lipotoxicity by inhibiting lipolysis[J]. *Hepatology*, 2015, 61(3): 870-882
- [14] Ngabire D, Kim G D. Autophagy and Inflammatory Response in the Tumor Microenvironment[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9)
- [15] Ward C, Martinez-Lopez N, Otten E G, et al. Autophagy, lipophagy and lysosomal lipid storage disorders [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1861(4): 269-284

(下转第 825 页)

- cells kept latent by Schwann cells[J]. *BMC Biol*, 2016, 14: 27
- [5] Matrone G, Tucker CS, Denvir MA. Cardiomyocyte proliferation in zebrafish and mammals: lessons for human disease [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(8): 1367-1378
- [6] Wang LW, Huttner IG, Santiago CF, et al. Standardized echocardiographic assessment of cardiac function in normal adult zebrafish and heart disease models[J]. *Dis Model Mech*, 2017, 10(1): 63-76
- [7] Fang Y, Gupta V, Karra R, et al. Translational profiling of cardiomyocytes identifies an early Jak1/Stat3 injury response required for zebrafish heart regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(33): 13416-13421
- [8] Valentim AM, Felix LM, Carvalho L, et al. A New Anaesthetic Protocol for Adult Zebrafish (*Danio rerio*): Propofol Combined with Lidocaine [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147747
- [9] Huang WC, Hsieh YS, Chen IH, et al. Combined use of MS-222 (tricaine) and isoflurane extends anesthesia time and minimizes cardiac rhythm side effects in adult zebrafish [J]. *Zebrafish*, 2010, 7(3): 297-304
- [10] Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, et al. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by *gata4* (+) cardiomyocytes [J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 601-605
- [11] Jopling C, Sleep E, Raya M, et al. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation[J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 606-609
- [12] Lidster K, Readman GD, Prescott MJ, et al. International survey on the use and welfare of zebrafish *Danio rerio* in research [J]. *J Fish Biol*, 2017, 90(5): 1891-1905
- [13] Readman GD, Owen SF, Knowles TG, et al. Species specific anaesthetics for fish anaesthesia and euthanasia [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7102
- [14] Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish[J]. *Science*, 2002, 298(5601): 2188-2190
- [15] Martins T, Valentim AM, Pereira N, et al. Anaesthesia and analgesia in laboratory adult zebrafish: a question of refinement [J]. *Lab Anim*, 2016, 50(6): 476-488
- [16] Collymore C, Tolwani A, Lieggi C, et al. Efficacy and safety of 5 anesthetics in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2014, 53(2): 198-203
- [17] Ramlochanasingh C, Branoner F, Chagnaud BP, et al. Efficacy of tricaine methanesulfonate (MS-222) as an anesthetic agent for blocking sensory-motor responses in *Xenopus laevis* tadpoles [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101606
- [18] Collymore C, Banks EK, Turner PV. Lidocaine Hydrochloride Compared with MS222 for the Euthanasia of Zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2016, 55(6): 816-820
- [19] Nordgreen J, Tahamtani FM, Janczak AM, et al. Behavioural effects of the commonly used fish anaesthetic tricaine methanesulfonate (MS-222) on zebrafish (*Danio rerio*) and its relevance for the acetic acid pain test[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92116
- [20] Rombough PJ. Ontogenetic changes in the toxicity and efficacy of the anaesthetic MS222 (tricaine methanesulfonate) in zebrafish (*Danio rerio*) larvae [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2007, 148(2): 463-469

(上接第 851 页)

- [16] Bejarano E, Cuervo A M. Chaperone-Mediated Autophagy [J]. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2010, 7(1): 29-39
- [17] Rowland T J, Sweet M E, Mestroni L, et al. Danon disease - dysregulation of autophagy in a multisystem disorder with cardiomyopathy [J]. *Journal of Cell Science*, 2016, 129(11): 2135-2143
- [18] Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, et al. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(18): 5747-5763
- [19] Ruivo R, Anne C, Sagne C, et al. Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(4): 636-649
- [20] Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, et al. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes[J]. *Autophagy*, 2013, 9(8): 1167-1171
- [21] Perez L, Mclellie S, Gardiner G J, et al. LAMP-2C Inhibits MHC Class II Presentation of Cytoplasmic Antigens by Disrupting Chaperone-Mediated Autophagy[J]. *J Immunol*, 2016, 196(6): 2457-2465
- [22] Leone D A, Peschel A, Brown M, et al. Surface LAMP-2 Is an Endocytic Receptor That Diverts Antigen Internalized by Human Dendritic Cells into Highly Immunogenic Exosomes [J]. *J Immunol*, 2017, 199(2): 531-546
- [23] Orenstein S J, Cuervo A M. Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(7): 719-726
- [24] Kimmel A R, Sztalryd C. The Perilipins: Major Cytosolic Lipid Droplet-Associated Proteins and Their Roles in Cellular Lipid Storage, Mobilization, and Systemic Homeostasis [J]. *Annu Rev Nutr*, 2016, 36: 471-509
- [25] Brasaemle D L. Perilipin 5: putting the brakes on lipolysis[J]. *J Lipid Res*, 2013, 54(4): 876-877
- [26] Kuramoto K, Okamura T, Yamaguchi T, et al. Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(28): 23852-23863
- [27] Szendroedi J, Roden M. Perilipin 5: from fatty liver to hepatic lipodystrophy?[J]. *Hepatology*, 2015, 61(3): 751-753
- [28] Kimmel A R, Sztalryd C. Perilipin 5, a lipid droplet protein adapted to mitochondrial energy utilization [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2014, 25(2): 110-117