

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.04.001

## · 基础研究 ·

## PAT 蛋白抑制饥饿诱导的脂滴快速融合

盛园园<sup>#</sup> 高关刚<sup>#</sup> 李域琪 金美君 徐 俐<sup>Δ</sup>

(清华大学生命科学院 北京 100084)

**摘要 目的:**脂滴快速融合是增大脂滴直径的方式之一,但其研究相对少。本研究旨在建立脂滴快速融合的细胞模型,以便对其进行深入的生物学研究。**方法:**本研究使用大鼠肾成纤维细胞系 NRK 和小鼠前脂肪细胞系 3T3-L1 两种细胞系,先用油酸诱导细胞内产生大量脂滴,再使用饥饿缓冲液培养细胞,利用显微镜实时观测技术跟踪脂滴动态变化,建立脂滴快速融合模型。而后在此模型中,加入自噬抑制剂或者以过表达 CCT 为阳性对照,过表达 PAT 蛋白(PLIN1、ADRP 和 TIP47),来探究它们在调控脂滴快速融合方面的功能。**结果:**饥饿缓冲液处理约 3 小时可诱导细胞发生脂滴快速融合,其融合速率很快,从脂滴接触到融合完成可发生在 20 秒内,显然不同于 CIDE 蛋白调控的缓慢脂滴融合过程。自噬抑制剂可以抑制自噬,但是并没有显著影响脂滴快速融合,说明饥饿诱导的脂滴快速融合不依赖于自噬。另发现,与过表达 GFP 相比,过表达定位于脂滴的 GFP-CCT、GFP-PLIN1、GFP-ADRP 或 GFP-TIP47 均能显著性抑制快速融合导致的脂滴变大的现象。**结论:**本研究建立了饥饿缓冲液诱导脂滴发生快速融合的细胞模型,并证明 PAT 蛋白(PLIN1、ADRP、TIP47)能抑制脂滴快速融合。

**关键词:**脂滴;快速融合;PAT 蛋白;自噬

**中图分类号:**Q-33;Q26;Q291 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)04-601-07

## PAT Proteins Inhibit Starvation-induced Lipid Droplet Coalescence

SHENG Yuan-yuan<sup>#</sup>, GAO Guan-gang<sup>#</sup>, LI Yu-qi, JIN Mei-jun, XU Li<sup>Δ</sup>

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

**ABSTRACT Objective:** Lipid droplet coalescence is one of the ways to effectively increase lipid droplet (LD) size. However, compared with other methods, this method is less researched. This study aimed to establish a cell model of LD coalescence for its further biological study. **Methods:** Two cell lines, namely rat kidney fibroblast cell line NRK and mouse pre-adipocyte cell line 3T3-L1, were cultured with oleic acid (OA) to induce a large number of cytosolic LDs. To establish lipid droplet coalescence model, the cells were cultured with starvation buffer, and the dynamic changes of LDs were tracked by time-lapse observation with confocal microscopy. Then, by adding autophagy inhibitors or overexpressing PAT proteins (PLIN1/ADRP/TIP47) with overexpressing CCT as a positive control, their roles in regulating LD coalescence were studied in this model. **Results:** Starvation-induced LD coalescence was obviously observed about 3 hours after the starvation buffer treatment. The LD coalescence process was characterized by a fast fusion as we observed the process could be completed within 20 seconds from two LDs contact to their fusion into a large LD. The coalescence process was different from CIDE-mediated LD fusion which was a slow process. Autophagy inhibitors could inhibit autophagy, but did not significantly alter LD coalescence, indicating that starvation-induced LD coalescence did not depend on autophagy. Further, compared with overexpressing GFP, overexpressing LD proteins, including GFP-CCT, GFP-PLIN1, GFP-ADRP, or GFP-TIP47, significantly blocked LD diameter increase caused by starvation-induced LD coalescence. **Conclusions:** This study established a starvation-induced LD coalescence cell model and demonstrated PAT proteins (PLIN1, ADRP, TIP47) inhibited LD coalescence.

**Key words:** Lipid droplet; Coalescence; PAT proteins; Autophagy

**Chinese Library Classification(CLC):** Q-33; Q26; Q291 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2020)04-601-07

## 前言

脂类是维持细胞正常生存的重要能源物质,而脂滴(Lipid droplet, LD)则是真核细胞内用于存储脂类的细胞器<sup>[1]</sup>。脂滴的

<sup>#</sup> 为共同第一作者

作者简介:盛园园,女,硕士研究生,主要研究方向:生物学,E-mails: chengyy12@mails.tsinghua.edu.cn;

高关刚,男,博士研究生,主要研究方向:生物学,E-mail: ggg12@mails.tsinghua.edu.cn

<sup>Δ</sup> 通讯作者:徐俐,女,博士,副研究员,硕士生导师,主要研究方向:生物学,E-mail: xulilulu@tsinghua.edu.cn,电话:010-62797133

(收稿日期:2019-08-15 接受日期:2019-09-10)

动态变化反映机体的不同能量代谢状态。在营养过剩的情况下,能量以脂类的形式储存于脂滴里;在机体需要能量时(如锻炼和禁食情况),细胞能够通过水解三酰甘油(Triacylglycerol, TAG)提供脂肪酸(Free fatty acid, FFA),以满足能量供给的需要<sup>[2]</sup>。过多的游离脂肪酸会破坏生物膜的完整性,诱发内质网应激(Endoplasmic reticulum stress, ER stress),线粒体的功能失调,诱使细胞产生并积累活性氧化类自由基和有害的脂类,进而导致炎症甚至细胞死亡,表现脂毒性<sup>[3-5]</sup>。而将脂肪酸转化为中性脂的形式存于脂滴中是一种有效缓冲脂毒性的方式。但脂肪的过度积累以及异常大脂滴的发生,是肥胖及其引起的代谢综合征的主要诱因<sup>[6]</sup>。因此,研究脂滴的动态变化对于理解脂代谢紊乱相关疾病发生及有效干预有重要意义。

对细胞和组织而言,脂滴的大小和数目体现其储存能量和释放能量的能力。脂滴动态变化的具体调控机制目前还存在很多未知。迄今有四种脂滴的增大方式被研究提出:(1)脂滴从内质网(Endoplasmic reticulum, ER)获得脂质并注入脂滴内核以增大脂滴直径<sup>[7-9]</sup>。(2)定位在脂滴上的脂合成酶(如GPAT4和DGAT2)促进三酰甘油的合成,从而促进脂滴生长<sup>[9-11]</sup>。(3)CIDE蛋白介导的脂滴融合(Fusion):CIDE蛋白富集于在两个脂滴的接触位点(LD-LD contacting site, LDCS),脂质由较小的脂滴缓慢定向注入到较大的脂滴中,最终它们融合成为一个更大的脂滴<sup>[12,13]</sup>。该脂质转移是一个缓慢的过程,往往需要数十分钟到数小时<sup>[13-15]</sup>,而PLIN1和RAB8A等蛋白作为协助因子可加速该过程中脂质转移速率<sup>[14,15]</sup>。(4)脂滴的快速融合(Lipid droplet coalescence, LD coalescence),即两个脂滴几乎瞬间融合成为一个大脂滴<sup>[16-18]</sup>。第三种和第四种融合方式的主要差异体现在:(1)从两个脂滴到融合成为一个脂滴的时间不同。CIDE蛋白介导的融合往往需要数十分钟到数小时的时间<sup>[13-15]</sup>,而脂滴快速融合只需要约数十秒<sup>[16,18]</sup>。(2)调控因子不同:现在已知CIDE蛋白调控的脂滴融合方式也有多种其他分子的参与:如PLIN1、RAB8A-AS160-MSS4等能加速CIDE蛋白调控的脂滴融合过程<sup>[13-15]</sup>。而已知的脂滴快速融合的调控分子主要是磷脂酸胆碱(Phosphatidylcholine, PC)及合成PC的关键酶。缺乏PC或者CTP-磷酸胆碱胞苷转移酶(CTP-phosphocholine cytidylyl-transferase, CCT)敲除导致脂滴快速融合<sup>[16,17,19]</sup>;巨噬细胞形成泡沫细胞的过程中,CCT活化和PC合成有助于保护巨噬细胞免于由未酯化胆固醇水平升高引起的细胞凋亡<sup>[20]</sup>。另外,NAFLD小鼠的肝脏通常明显缺乏磷脂酰胆碱,表现为大脂滴<sup>[19,21]</sup>。而补充磷脂酰胆碱改善肝脏重量和血清转氨酶水平<sup>[19,22]</sup>。另有一项研究发现,普萘洛尔(Propranolol)和一些脂滴染料也会导致脂滴发生快速融合<sup>[18]</sup>。此外,也有研究表明磷脂酸(Phosphatidic acid, PA)可能促进接触的两脂滴发生融合<sup>[17]</sup>。前三种脂滴增大的调控方式,在脂肪储存的生理条件和不同阶段发生,主要促进脂质积累和能量储存,降低脂毒性等。但脂滴快速融合(LD Coalescence)被认为是一个不正常的生理条件,其病理、生理研究也较少。

自噬是一种保守的细胞自救过程,表现为在营养缺乏的情况下,细胞内形成吞噬泡,而后形成自噬体,自噬体中包裹待降解的物质,而后自噬体与溶酶体融合,最终降解其包含物而后再利用降解后的物质,以满足细胞需要。降解的物质包括可溶

性蛋白质、聚集蛋白质、受损的细胞器、大分子复合物和异物等<sup>[23]</sup>。有研究表明脂滴与自噬相关,细胞中脂滴与吞噬泡/自噬体靠得很近<sup>[24]</sup>。关于脂滴与自噬的关系,目前有两种模型。一种情形是脂滴自噬(Lipophagy),在这个过程中,脂滴是自噬的底物。通过自噬过程降解脂滴,释放出脂肪酸以提供能量<sup>[2]</sup>。一种是脂滴为新生自噬体提供脂类以帮助其膜结构的成熟,在这个过程中,定位于脂滴上的脂水解酶PNPLA5促进自噬的起始<sup>[25]</sup>。目前没有自噬与脂滴快速融合关系的研究。

脂滴其内核富含三酰甘油(TAG)和胆固醇酯(CE),其外围为磷脂单分子层<sup>[26,27]</sup>。同时,磷脂单分子层表面富含多种脂滴蛋白(LD proteins)。通过酶催化合成和水解其内核的脂类,脂滴发生动态变化。在哺乳动物细胞的脂滴中,磷脂酰胆碱(PC)是脂滴膜表面的主要磷脂,其次是磷脂酰乙醇胺(PE)和磷脂酰肌醇(PI)<sup>[28]</sup>。CCT是磷脂酰胆碱(PC)合成的关键酶,而磷脂酰胆碱(PC)也是有核细胞细胞膜的重要组分<sup>[29]</sup>。脂滴表面蛋白在调控脂滴的生成、生长、融合和降解中发挥重要作用<sup>[26,27,30,31]</sup>。PAT家族蛋白是比较早期被发现的脂滴定位蛋白,其成员包括:PLIN1、ADRP、TIP47、S3-12、LSDP5<sup>[32]</sup>。这些蛋白通过不同的分子机制参与脂滴的稳态调控<sup>[33]</sup>,如:PLIN1高表达于脂肪细胞中,并在脂肪水解方面发挥重要作用<sup>[34,35]</sup>。但PAT蛋白与脂滴快速融合的关系目前未知。

本文主要探究诱导脂滴快速融合的发生条件及脂滴快速融合的调节因子。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大鼠肾脏细胞系NRK和小鼠3T3-L1前脂肪细胞系均购于美国ATCC;胎牛血清购自Biological Industries公司;DMEM细胞培养基、BODIPY 558/568 C12、BODIPY 493/503、LipidTOX deep red、青霉素和链霉素(100×)、活细胞培养皿均购于Thermo Scientific公司;油酸(Oleic Acid, OA)购于Sigma-Aldrich公司。 $\beta$ -actin抗体(货号:A5441)购于Sigma-Aldrich公司,GFP抗体(货号:sc-8334)购于Santa Cruz公司。HRP标记的二抗(anti-mouse 货号:NA-931;anti-rabbit 货号:NA-934)购于GE Healthcare公司。p62(货号:PM045)和LC3抗体(货号:PM036)购于MBL公司。pEGFP-C1载体购于Clontech公司。PrimeStar DNA聚合酶套装购自Takara公司。大肠杆菌感受态细胞(DH5 $\alpha$ )、DEPC水、胶回收试剂盒和可去除内毒素的质粒提取试剂盒购自TIANGEN公司。ECL化学发光液为实验室配制。X光胶片购自柯达公司。饥饿缓冲液组分粉末购自Sigma-Aldrich公司。稳定过表达GFP-LC3的NRK细胞来自清华大学生命学院俞立实验室。

### 1.2 方法

**1.2.1 质粒构建** 以cDNA为模板,用PCR的方法扩增出Cct、Plin1、Adrp和Tip47的全长,并用限制性内切酶连接的方式装入pEGFP-C1载体。将质粒转化进入DH5 $\alpha$ 中,用可去除内毒素的质粒提取试剂盒进行质粒的提取。

**1.2.2 细胞培养和饥饿处理** NRK和3T3-L1细胞在含有10%血清的DMEM培养基(补充1×青霉素和链霉素)中进行培养,培养箱参数设置为温度:37℃;CO<sub>2</sub>浓度:5%;湿度:80%。

细胞提前一天用胰酶消化后接种到活细胞培养皿中,待细胞贴壁 24 小时之后,向培养基中加入 200  $\mu\text{M}$  油酸和脂滴染料,并维持 16 小时。细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗三遍,加入适量饥饿缓冲液(140 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM 葡萄糖和 20 mM HEPES, pH 7.4),使用尼康 A1R+ 扫描共聚焦显微镜活细胞模块对脂滴进行实时观察。

**1.2.3 细胞转染** NRK 和 3T3-L1 细胞均通过电转(Electroporation)的方式进行质粒的转染。细胞经过消化离心后,使用 100  $\mu\text{L}$  电转缓冲液重悬细胞并移至新 1.5 mL EP 管中。而后加入质粒,用微量移液器将质粒和细胞混匀,之后再将混合物转移到电转杯中。使用 Amaxa Nucleofector II(Lonza 公司)电转仪内置相应细胞的电转程序进行转染。电转后细胞用正常细胞培养基重悬,接种到细胞培养皿中。

**1.2.4 细胞固定和免疫荧光** 细胞预先铺在含有细胞爬片的培养皿中培养。吸掉培养基后用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗两遍后,用 4%的多聚甲醛室温下固定细胞 15-20 分钟。脂滴用 1:500 稀释的 BODIPY 493/503 进行室温染色 20 分钟。细胞核使用 1:20000 稀释的 Hoechst 染色。细胞爬片用封片剂固定在载玻片上,使用尼康 A1R+ 扫描共聚焦显微镜进行观察。

**1.2.5 蛋白免疫印迹** 用磷酸盐缓冲液冲洗细胞样品 2 次,而

后使用 1.25 $\times$  蛋白上样缓冲液进行收样,95  $^{\circ}\text{C}$  煮 15 分钟。使用 Bio-Rad 公司的蛋白质电泳系统和湿法转膜系统。一抗孵育 6 个小时以上,二抗孵育过夜后进行 X 光片曝光显影。

**1.2.6 脂滴直径大小的测定** 共聚焦显微镜获得的原始图片由 Nikon NIS-VIEW 软件或 Image J 软件处理。

### 1.3 统计学分析

所有数据使用 Graphpad Prism 5.0 软件作图。使用双尾学生 T 检验(Two tailed student's t test)比较不同组数据之间的差异, $P$  值小于 0.05 时,认为所比较的数据组存在明显差异。 $P < 0.05$  时,用 \* 表示; $P < 0.01$  时,用 \*\* 表示; $P < 0.001$  时,用 \*\*\* 表示。

## 2 结果

### 2.1 3T3-L1 细胞饥饿处理后脂滴增大

在正常生长培养基(DMEM+10 % FBS)培养细胞的情况下,3T3-L1 细胞中脂滴较小且少,不便于观察脂滴形态。于是本研究在 3T3-L1 细胞的生长培养基中添加 200  $\mu\text{M}$  OA,并维持 16 小时,诱导脂滴的积累。进一步,使用饥饿缓冲液处理细胞,相较于未饥饿处理的细胞,经过饥饿处理后的细胞内的脂滴直径明显增大(图 1)。

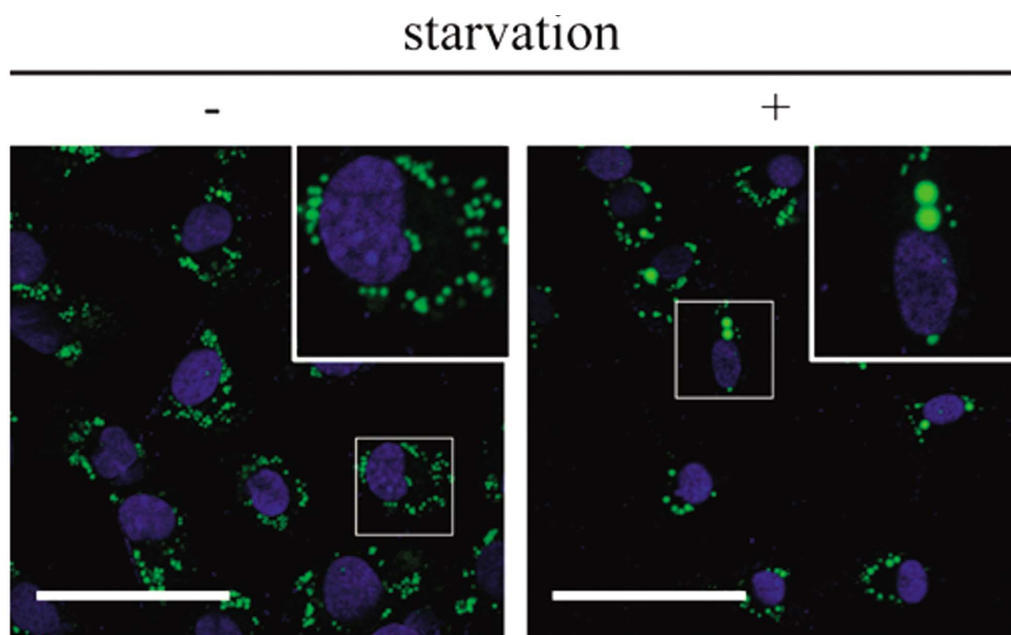


图 1 饥饿诱导 3T3-L1 细胞脂滴增大

在饥饿处理与否则,3T3-L1 细胞的脂滴。使用 200  $\mu\text{M}$  油酸处理 3T3-L1 细胞 16 h。使用 BODIPY 493/503 进行脂滴染色为绿色,细胞核使用 Hoechst 染色为蓝色,标尺 = 50  $\mu\text{m}$ 。

Fig.1 Starvation induced an increase in lipid droplet diameter in 3T3-L1 cells

LDs in 3T3-L1 cells with starvation treatment or not. 3T3-L1 cells were treated with 200  $\mu\text{M}$  oleic acid for 16 hours. LDs were stained with the BODIPY 493/503 in green, nuclei were stained by Hoechst in blue. Scale Bar: 50  $\mu\text{m}$ .

### 2.2 NRK 细胞发生脂滴快速融合现象

同样的,在 NRK 细胞中,重复了以上实验。NRK 细胞经过 200  $\mu\text{M}$  油酸和脂滴染料 BODIPY 558/568 处理后,细胞内产生了大量脂滴。再经过饥饿处理后,与未饥饿的细胞相比,脂滴的直径明显增大(图 2A)。与图 1 中,饥饿诱导前脂肪细胞 3T3-L1 的脂滴增大现象一致。对饥饿处理与否的 NRK 细胞中

最大脂滴的直径进行统计,结果显示:饥饿处理组的细胞最大脂滴直径显著大于未饥饿处理组的最大脂滴直径(图 2B)。为了观察大脂滴的形成过程,本研究利用共聚焦显微镜进行实时活细胞观察,发现细胞经历饥饿处理过程中,两颗绿色 BODIPY 493/503 染色的脂滴能够快速融合(图 2C)。起始时两颗脂滴相互靠近,且界限清晰,10 秒之后两颗脂滴已经变成一个脂

滴,而此时脂滴形态并不是完全的球形,最终约在 20 秒成为形态清晰、单一球形大脂滴(图 2C)。这个过程非常快速,故被称

为快速融合(Coalescence)。在正常细胞培养中较少出现,而在饥饿处理的细胞中,我们观察到其频繁发生。

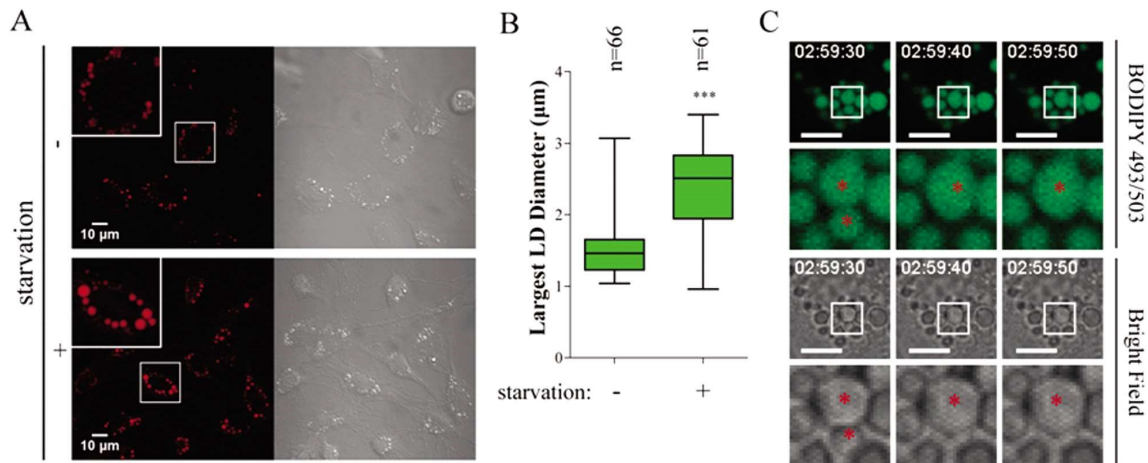


图 2 饥饿处理诱导 NRK 细胞发生脂滴快速融合

(A)在饥饿处理与否时, NRK 细胞的脂滴形态,使用 BODIPY 558/568 C12 标记脂滴为红色。标尺 = 10  $\mu\text{m}$ 。(B)统计(A)实验中饥饿处理与否情况下细胞内最大脂滴的直径,\*\*\*表示  $P<0.001$ (n 表示统计的细胞数)。(C)截图为活细胞观察 NRK 细胞中脂滴的实时图片。使用 BODIPY 493/503 进行脂滴染色为绿色。白色方框内表示两个脂滴正在发生快速融合成更大的脂滴,红色星号为正在发生此过程的脂滴,左上角数字(hh:mm:ss)表示时间,标尺 = 5  $\mu\text{m}$ 。

Fig.2 Starvation induced LD coalescence in NRK cells

(A) LDs in NRK cells with starvation treatment or not, LDs were labeled with BODIPY 558/568 C12 in red. Scale Bar: 10  $\mu\text{m}$ . (B) Statistical analysis of largest LD diameter in NRK cells with starvation buffer treatment or not in the experiment (A). \*\*\*,  $P<0.001$ (n represents the number of cells counted).

(C) Captured images from time-lapse video of starved NRK cells. LDs were stained with BODIPY 493/503 in green. White squares indicating LD coalescence; Red star showing two LDs fusing and forming a single larger round LD. The upper left number (hh:mm:ss) indicating time. Scale Bar: 5  $\mu\text{m}$ .

### 2.3 抑制自噬不能抑制饥饿引起的脂滴快速融合

饥饿处理是诱导细胞自噬的常用方法之一<sup>[23,36]</sup>,本研究欲明确该饥饿引起的脂滴融合长大的过程是否与自噬有关。图 3A 所示:在饥饿缓冲液处理 NRK 细胞的时候, NRK 细胞中自噬的标记分子 p62 蛋白减少, LC3 剪切增加,说明在饥饿缓冲液诱导脂滴快速融合的发生过程中,细胞自噬同时发生。本研究打算利用易于观测自噬发生的 GFP-LC3 稳转 NRK 细胞系,通过计算定位于自噬体上 GFP-LC3 的点数来监测自噬过程的变化。

随后,我们利用自噬抑制剂,观察抑制自噬是否影响脂滴快速融合。氯喹(Chloroquine)能提高溶酶体的 pH,从而中断自噬体与溶酶体融合,使得细胞内 GFP-LC3 点数聚集增多。亮肽素(Leupeptin)是半胱氨酸、丝氨酸和苏氨酸蛋白酶抑制剂,抑制溶酶体介导的蛋白水解,使得 GFP-LC3 点数聚集增多<sup>[37]</sup>。3-MA(3-Methyladenine)是 I 类和 III 类 PtdIns3K 抑制剂,将自噬抑制在早期阶段,发挥作用时期是早于 GFP-LC3 富集和定位于自噬体之前,使得 GFP-LC3 点数聚集减少<sup>[38]</sup>。用稳转 GFP-LC3 的 NRK 细胞系,分别做如下处理:饥饿处理、不饥饿处理、饥饿处理时同时添加自噬抑制剂。如图 3B 所示,相比于饥饿处理组,在加入氯喹之后, GFP-LC3 的点数进一步增加,仍显著高于未饥饿缓冲液处理组。相比于饥饿处理组,在加入亮肽素之后, GFP-LC3 的点数有增加,且仍显著高于未饥饿缓冲液处理组。再加入 3-MA 后, GFP-LC3 的点数急剧减少, GFP-LC3 的点数与未饥饿处理组接近,表明本实验所使用的三种抑制剂均有效发挥了抑制自噬的作用。有趣的是,如图 3C 所示,三种自噬抑制剂的添加,均不影响饥饿诱导的脂滴变大。对

细胞内最大脂滴直径的统计数据也表明(图 3D),自噬抑制剂的加入在抑制细胞自噬的同时并不影响细胞内饥饿诱导的最大脂滴的直径的变化。由此表明,饥饿诱导的脂滴快速融合而引起的脂滴增大不依赖饥饿诱导的自噬过程。

### 2.4 过表达 PAT 蛋白抑制脂滴快速融合

为了了解脂滴蛋白对脂滴快速融合的影响,我们在 NRK 细胞中过表达脂滴蛋白。同样的,经过 OA 和 BODIPY 558/568 C12 处理后再使用饥饿缓冲液诱导脂滴快速融合。研究发现,脂滴蛋白 GFP-CCT、GFP-PLIN1、GFP-ADRP、GFP-TIP47 均表达良好且能很好的定位到 BODIPY 558/568 C12 标记的脂滴上(图 4A 和图 4B)。与对照细胞(只电转 GFP 空载)相比,饥饿处理在表达了脂滴蛋白 GFP-CCT、GFP-PLIN1、GFP-ADRP 或 GFP-TIP47 的细胞中不能诱导脂滴变大(图 4B)。实验统计饥饿处理前和饥饿处理后的细胞中最大脂滴的直径,结果显示:表达 GFP 的细胞中,细胞中脂滴在饥饿处理后直径明显增大( $P<0.001$ );过表达 GFP-CCT 和 GFP-TIP47 显著抑制饥饿诱导的脂滴增大;而在 GFP-ADRP 和 GFP-PLIN1 的细胞中,最大脂滴的直径在饥饿处理后还有一定程度的减小(图 4C),以上表明过表达 GFP-CCT、GFP-PLIN1、GFP-ADRP 或 GFP-TIP47 抑制了饥饿诱导的脂滴快速融合过程。

进一步,我们检测了过表达 PAT 脂滴蛋白是否影响细胞自噬水平。与表达 GFP 细胞相比,表达 GFP-CCT、GFP-PLIN1、GFP-ADRP 以及 GFP-TIP47 的 NRK 细胞,在经历饥饿处理后表现为相对一致的自噬水平:p62 蛋白减少; LC3 剪切增加(图 4A)。表明饥饿诱导了自噬的发生,不同质粒转染的细胞之间自噬水平没有显著性差异。

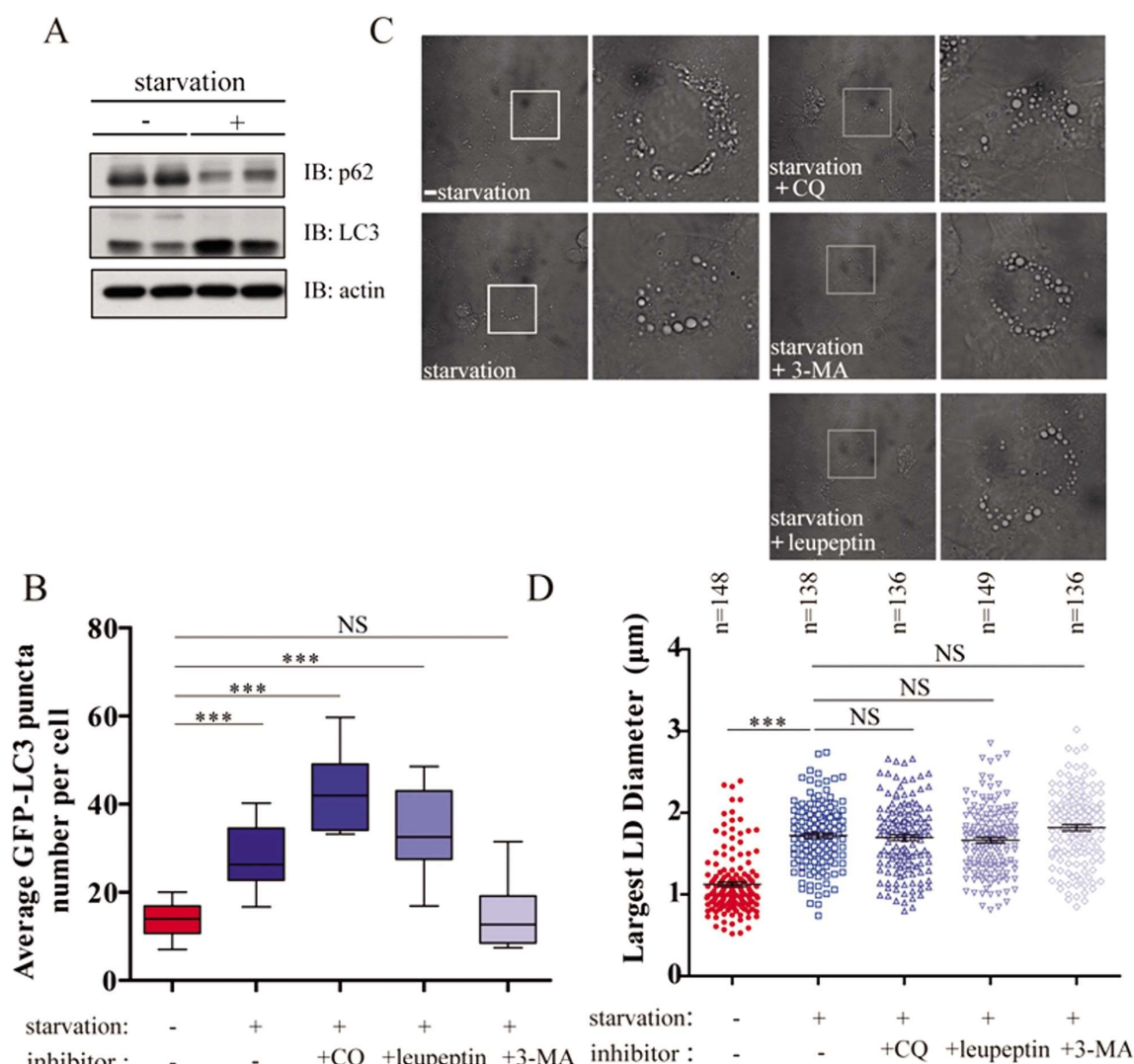


图3 自噬抑制剂诱导的自噬抑制不影响饥饿诱导的脂滴增大

(A) 在饥饿处理与否情况下,检测 NRK 细胞内的自噬分子 p62、LC3 蛋白水平。(B) 在 NRK-GFP-LC3 稳转细胞中,统计是否加入自噬抑制剂情况下的 GFP-LC3 点数。(C) 明场下饥饿缓冲液中是否加入自噬抑制剂情况下脂滴的代表图。(D) 自噬抑制剂对饥饿缓冲液诱导的脂滴直径影响的统计图,NS,没有显著性差异;\*\*\*,表示  $P < 0.001$  (n 表示统计的细胞数)。

Fig.3 Autophagy inhibition by autophagy inhibitors has no effect on LD diameter increase by starvation

(A) Detection protein levels of autophagy marker p62 and LC3 in NRK cells with starvation buffer or not. (B) Statistical analysis of GFP-LC3 puncta in NRK-GFP-LC3 cells with autophagy inhibitors or not. (C) Representative images of LDs in starvation buffer with autophagy inhibitors or not in bright field. (D) Statistical analysis of autophagy inhibitors' effect on the diameter of LDs induced by the starvation buffer, NS, no significance;

\*\*\*,  $P < 0.001$  (n represents the number of cells counted).

同时,我们也在稳转 GFP-LC3 的 NRK 细胞中过表达脂滴定位蛋白 CCT 和 PAT 蛋白 (PLIN1、ADRP)。同样地发现,由饥饿缓冲液诱导产生的脂滴增大现象被抑制,NRK-GFP-LC3 细胞系的结果与前面 NRK 细胞系的结果一致。

综上,本研究证明过表达 PAT 蛋白 (PLIN1、ADRP、TIP47) 抑制饥饿引发的脂滴快速融合而导致的脂滴增大现象。

### 3 讨论

本研究发现了饥饿诱导脂滴快速融合,并且揭示了 PAT 脂滴蛋白 (PLIN1、ADRP 和 TIP47) 抑制饥饿诱导的脂滴快速融合过程,饥饿诱导脂滴快速融合不依赖于饥饿诱导的自噬。脂滴中性脂的快速融合能够最大限度减少脂滴的相界面和自由能<sup>[26,31]</sup>。因此细胞需要抑制快速融合来维持每个单独脂滴

的完整性。已有报道发现脂滴表面蛋白 olesins 或者磷脂酰胆碱 (Phosphocholine, PC) 能够通过减少表面张力的方式保护脂滴免于发生快速融合<sup>[16,39]</sup>。在脂滴快速合成的过程中,脂滴能够在几个小时内直径超过三倍的增大,表面积超过十倍的增殖,从而使得 PC 的相对匮乏。此时,细胞需要合成并转移大量的磷脂酰胆碱。体外实验中,PC 能够保护脂滴,阻止脂滴快速融合发生<sup>[16,40]</sup>。本实验中,在饥饿组中过表达 CCT。相比于内源情况下,过表达组有更多的 CCT 定位于脂滴上,合成更多的 PC,而 PC 能保护脂滴,抑制脂滴快速融合的发生。这点可以解释为何过表达 CCT 可以抑制脂滴的快速融合。而本试验中发现的其他调控因子是否也是通过影响 PC 的含量来影响脂滴快速融合过程是个后续需要继续研究的问题。

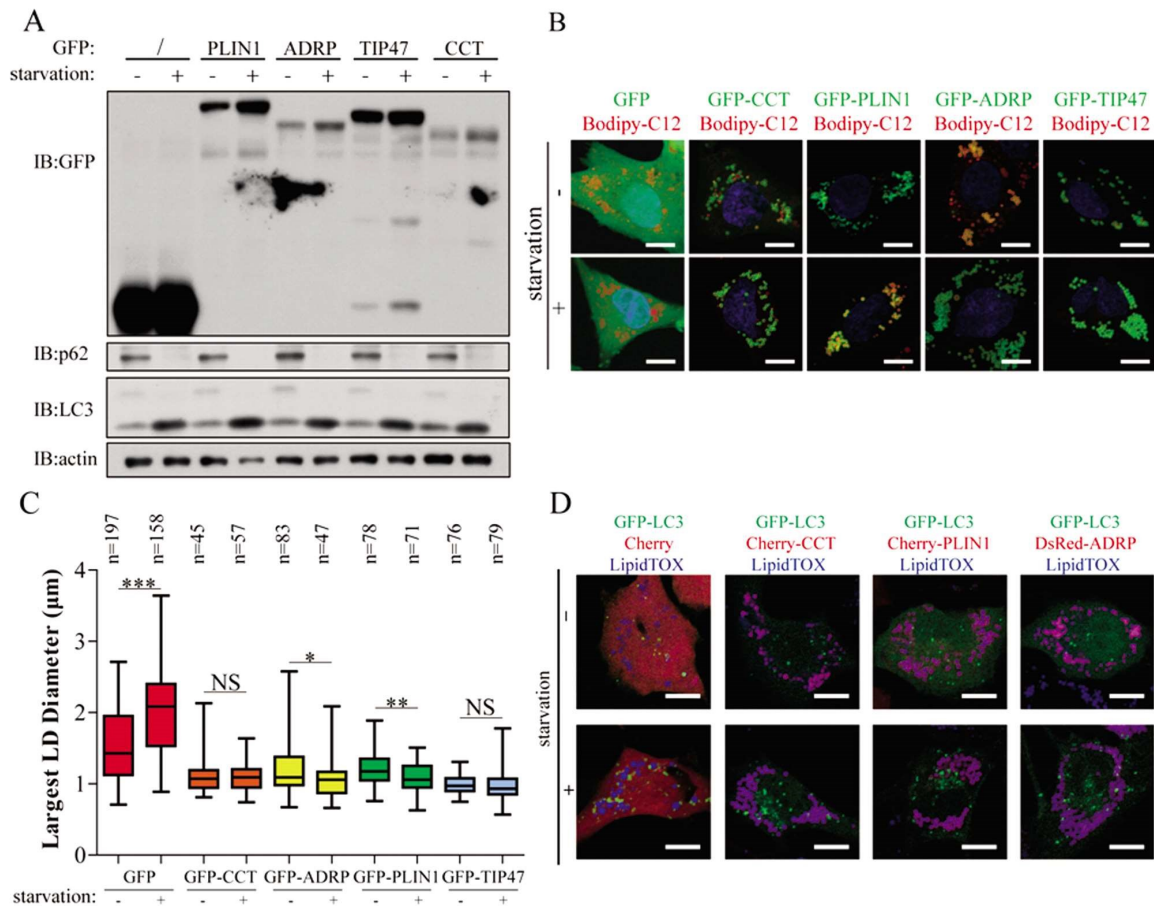


图4 过表达 PAT 蛋白抑制脂滴快速融合

(A)检测转染 GFP, GFP-CCT, GFP-PLIN1, GFP-ADRP 或 GFP-TIP47 的 NRK 细胞中饥饿处理与否时脂滴蛋白及自噬相关标记蛋白的表达。(B)与(A)处理对应的典型荧光图片;标尺 = 10 μm。(C) NRK 细胞中进行最大脂滴直径的统计(n 表示统计的细胞数)。NS, 没有显著差异;\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ 。(D)检测转染 Cherry, Cherry-CCT, Cherry-PLIN1, DsRed-ADRP 的 NRK-GFP-LC3 细胞中饥饿处理与否的脂滴,脂滴使用 LipidTOX deep red 染色。标尺 = 10 μm。

Fig.4 PAT proteins inhibited starvation induced LD coalescence

(A) Western Blot analysis of LD protein expression level and autophagy-related marker proteins in GFP and GFP-CCT, GFP-PLIN1, GFP-ADRP or GFP-TIP47 transfected NRK cells with starvation buffer treatment or not. (B) Representative images corresponding to (A); Scale Bar: 10 μm. (C) Diameter of largest LDs in NRK cells(n represents the number of cells counted). NS, no significance; \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . (D) Representative images of LDs in Cherry, Cherry-CCT, Cherry-PLIN1, DsRed-ADRP transfected NRK-GFP-LC3 cells with starvation buffer treatment or not; LDs were stained by lipidTOX deep red. Scale Bar: 10 μm.

本试验结果中参与调控脂滴快速融合过程的蛋白:PLIN1、ADRP、TIP47 均为 PAT 家族的成员。而 PAT 家族蛋白还有另外两个成员:S3-12 和 LSDP5。或许 S3-12 和 LSDP5 也参与调控这个过程。此外,PAT 家族的成员都定位于脂滴上,但是定位的倾向性有所不同。当用脂肪酸孵育前脂肪细胞的时候,新产生的小脂滴上被 S3-12、TIP47 所覆盖,随着脂滴长大,ADRP 会定位于脂滴上,而当脂滴长到更大时,脂滴主要由 PLIN1 覆盖<sup>[32]</sup>。那么或许有可能是这些蛋白定位于不同大小的脂滴上,从而影响不同大小的脂滴群之间的脂滴快速融合过程。其次,在 PLIN1 控制脂肪细胞中的脂解过程,LSDP5 调控氧化组织(如:骨骼肌、心脏等)的脂解过程,细胞中过度表达 ADRP 降低 ATGL 对脂滴的接近而减弱了脂解作用<sup>[32,33]</sup>。对于其他 PAT 家族的其他成员,有关于脂解的研究较少。脂解和脂滴快速融合过程均是脂滴动态变化过程,且 PAT 家族成员均参与其中,那么生理情况下,脂水解和脂滴快速融合的关系是如何的呢? 脂

储存和脂滴快速融合的关系是如何的呢? 这些都是后续值得研究的问题。

脂滴快速融合具体发生在脂滴增大的哪个生理阶段目前仍不明确。不同类型的细胞系,不同情况下同一种细胞,其细胞内的脂滴大小都会有所差别。多数种类细胞内的脂滴较小,其直径一般在 0.1 μm - 0.2 μm。而白色脂肪组织中的白色脂肪细胞的脂滴直径可以达到 100 μm<sup>[41]</sup>。正如前言中所述,目前有四种脂滴增大的方式。其中,脂滴快速融合是短时间内增大脂滴大小的最快的方式<sup>[18,40]</sup>。不同脂滴增大的方式所需的机器组件和触发条件很可能不同,而在实际的生理情况下,脂滴的增大方式是怎么样的是一个值得研究的问题。脂滴增大方式的选择可能与细胞系的种类有关、也可能与细胞所处的代谢状态有关等。脂滴实际采取的增大方式可能是其中的具体某一个还可能是其中的合理组合。

综上,脂滴的快速融合是脂滴动态变化的过程之一。脂滴

快速融合的发生不利于维持脂滴之间保持独立性和完整性。在细胞需要更多脂滴数目、更小脂滴直径的情况下,脂滴快速融合则需要被抑制。脂滴快速融合过程的更深入的生理意义目前尚不明确。本研究中所发现的饥饿处理引起的脂滴快速融合的处理方法和细胞模型可以作为研究脂滴动态变化的手段之一。我们鉴定了脂滴快速融合过程的调控分子,也为更深入了解这一过程提供线索。知道如何调控脂滴大小可以帮助解析人体异常脂质储存而引起的脂代谢疾病,为治疗疾病提供思路。

#### 参考文献(References)

- [1] Ohsaki Y, Kawai T, Yoshikawa Y, et al. PML isoform II plays a critical role in nuclear lipid droplet formation [J]. *J Cell Biol*, 2016, 212(1): 29-38
- [2] Zechner R, Madeo F, Kratky D. Cytosolic lipolysis and lipophagy: two sides of the same coin [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(11): 671-684
- [3] Marra F, Svegliati-Baroni G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis[J]. *J Hepatol*, 2018, 68(2): 280-295
- [4] Unger R H, Clark G O, Scherer P E, et al. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1801(3): 209-214
- [5] Ye R, Onodera T, Scherer P E. Lipotoxicity and beta Cell Maintenance in Obesity and Type 2 Diabetes[J]. *J Endocr Soc*, 2019, 3(3): 617-631
- [6] Lee B Y, Bartsch S M, Mui Y, et al. A systems approach to obesity[J]. *Nutr Rev*, 2017, 75(suppl 1): 94-106
- [7] Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, et al. Lipid droplets are arrested in the ER membrane by tight binding of lipidated apolipoprotein B-100[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Pt 14): 2415-2422
- [8] Jacquier N, Choudhary V, Mari M, et al. Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 14): 2424-2437
- [9] Xu D, Li Y, Wu L, et al. Rab18 promotes lipid droplet (LD) growth by tethering the ER to LDs through SNARE and NRZ interactions [J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(3): 975-995
- [10] Gross D A, Zhan C, Silver D L. Direct binding of triglyceride to fat storage-inducing transmembrane proteins 1 and 2 is important for lipid droplet formation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(49): 19581-19586
- [11] Wilfling F, Wang H, Haas J T, et al. Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets[J]. *Dev Cell*, 2013, 24(4): 384-399
- [12] Gao G, Chen F J, Zhou L, et al. Control of lipid droplet fusion and growth by CIDE family proteins [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, 1862(10 Pt B): 1197-1204
- [13] Gong J, Sun Z, Wu L, et al. Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites [J]. *J Cell Biol*, 2011, 195(6): 953-963
- [14] Sun Z, Gong J, Wu H, et al. Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes[J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1594
- [15] Wu L, Xu D, Zhou L, et al. Rab8a-AS160-MSS4 regulatory circuit controls lipid droplet fusion and growth [J]. *Dev Cell*, 2014, 30(4): 378-393
- [16] Krahmer N, Guo Y, Wilfling F, et al. Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP: phosphocholine cytidylyltransferase [J]. *Cell Metab*, 2011, 14(4): 504-515
- [17] Fei W, Shui G, Zhang Y, et al. A role for phosphatidic acid in the formation of "supersized" lipid droplets [J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(7): e1002201
- [18] Murphy S, Martin S, Parton R G. Quantitative Analysis of Lipid Droplet Fusion: Inefficient Steady State Fusion but Rapid Stimulation by Chemical Fusogens[J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(12): e15030
- [19] Gluchowski N L, Becuwe M, Walther T C, et al. Lipid droplets and liver disease: from basic biology to clinical implications [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(6): 343-355
- [20] Zhang D, Tang W, Yao P M, et al. Macrophages deficient in CTP: Phosphocholine cytidylyltransferase-alpha are viable under normal culture conditions but are highly susceptible to free cholesterol-induced death. Molecular genetic evidence that the induction of phosphatidylcholine biosynthesis in free cholesterol-loaded macrophages is an adaptive response[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(45): 35368-35376
- [21] Niebergall L J, Jacobs R L, Chaba T, et al. Phosphatidylcholine protects against steatosis in mice but not non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1811(12): 1177-1185
- [22] Lee H S, Nam Y, Chung Y H, et al. Beneficial effects of phosphatidylcholine on high-fat diet-induced obesity, hyperlipidemia and fatty liver in mice[J]. *Life Sci*, 2014, 11(1): 7-14
- [23] Yu L, Chen Y, Tooze S A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms[J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 207-215
- [24] Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, et al. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum[J]. *Autophagy*, 2009, 5(8): 1180-1185
- [25] Dupont N, Chauhan S, Arko-Mensah J, et al. Neutral lipid stores and lipase PNPLA5 contribute to autophagosome biogenesis[J]. *Curr Biol*, 2014, 24(6): 609-620
- [26] Wilfling F, Haas J T, Walther T C, et al. Lipid droplet biogenesis[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 29: 39-45
- [27] Pol A, Gross S P, Parton R G. Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites [J]. *J Cell Biol*, 2014, 204(5): 635-646
- [28] Bartz R, Li W H, Venables B, et al. Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic [J]. *J Lipid Res*, 2007, 48(4): 837-847
- [29] Cornell R B. Membrane lipid compositional sensing by the inducible amphipathic helix of CCT[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1861(8 Pt B): 847-861
- [30] Walther T C, Farese R V, Jr. Lipid droplets and cellular lipid metabolism[J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 687-714
- [31] Thiam A R, Farese R V Jr, Walther T C. The biophysics and cell biology of lipid droplets [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(12): 775-786
- [32] Ducharme N A, Bickel P E. Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(3): 942-949
- [33] Sztalryd C, Brasaemle D L. The perilipin family of lipid droplet proteins: Gatekeepers of intracellular lipolysis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2017, 1862(10 Pt B): 1221-1232(下转第 628 页)

- Gila, 2009, 57(16): 1691-705
- [5] Rusielewicz T, Nam J, Damanakis E, et al. Accelerated repair of demyelinated CNS lesions in the absence of non-muscle myosin IIB[J]. Gila, 2014, 62(4): 580-591
- [6] Ross JL, Ali MY, Warshaw DM. Cargo transport: Molecular motors navigate a complex cytoskeleton[J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(1): 41-47
- [7] Gunn-Moore FJ, Hill M, Davey LR, et al. A functional FERM domain binding motif in neurofascin [J]. Mol Cell Neurosci, 2006, 33 (4): 441-446
- [8] Liang X, Draghi NA, Resh MD. Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes[J]. J Neurosci, 2004, 24(32): 7140-7149
- [9] 翁超, 卢祖能, 符辉. 少突胶质细胞分化发育与髓鞘形成的研究进展[J]. 中华神经医学杂志, 2016, 15(5): 524-528
- [10] Zhang YP, Huang QL, Zhao CM, et al. GM1 improves neurofascin155 association with lipid rafts and prevents rat brain myelin injury after hypoxia-ischemia [J]. Braz J Med Biol Res, 2011, 44(6): 553-561
- [11] Palmer C, Menzies SL, Roberts RL, et al. Changes in iron histochemistry after hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat[J]. J Neurosci Res, 1999, 56(1): 60-71
- [12] Yao L, Chen X, Tian Y, et al. Selection of housekeeping genes for normalization of RT-PCR in hypoxic neural stem cells of rat in vitro [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(1): 569-576
- [13] 杨凯, 李一鹏, 刘英富, 等. 大鼠皮质少突胶质细胞培养条件的优化[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(29): 4328-4333
- [14] Boullerne AI. The history of myelin[J]. Exp Neurol, 2016, 283(Pt B): 431-445
- [15] Purger D, Gibson EM, Monje M. Myelin plasticity in the central nervous system[J]. Neuropharmacology, 2016, 110(Pt B): 563-573
- [16] van Tilborg E, Heijnen CJ, Benders MJ, et al. Impaired oligodendrocyte maturation in preterm infants: Potential therapeutic targets [J]. Prog Neurobiol, 2016, 136: 28-49
- [17] Le Clairche C, Carlier MF. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration[J]. Physiol Rev, 2008, 88(2): 489-513
- [18] Thurnherr T, Benninger Y, Wu X, et al. Cdc42 and Rac1 signaling are both required for and act synergistically in the correct formation of myelin sheaths in the CNS [J]. J Neurosci, 2006, 26 (40): 10110-10119
- [19] Ranthjen FG, Wolff JM, Chang S, et al. Neurofascin: a novel chick cell-surface glycoprotein involved in neurite-neurite interactions [J]. Cell, 1987, 51(5): 841-849
- [20] Tajima Y, Matsumura M, Yaguchi H, et al. Possible combined central and peripheral demyelination presenting as optic neuritis, cervical myelitis, and demyelinating polyneuropathy with marked nerve hypertrophy[J]. Intern Med, 2018, 57(6): 867-871
- [21] Mathey EK, Derfuss T, Storch MK, et al. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury[J]. J Exp Med, 2007, 204 (10): 2363-2372
- [22] 李濛, 张丙宏. 新生儿缺氧缺血性脑损伤相关血清学标志物研究进展[J]. 中华新生儿科杂志, 2018, 33(5): 388-392

(上接第 607 页)

- [34] Granneman J G, Moore H P, Krishnamoorthy R, et al. Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl)[J]. J Biol Chem, 2009, 284(50): 34538-34544
- [35] Miyoshi H, Perfield J W, Souza S C, et al. Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes [J]. J Biol Chem, 2007, 282(2): 996-1002
- [36] Hurley J H, Young L N. Mechanisms of Autophagy Initiation[J]. Annu Rev Biochem, 2017, 86: 225-244
- [37] Bechor S, Nachmias D, Elia N, et al. Adipose tissue conditioned media support macrophage lipid-droplet biogenesis by interfering with autophagic flux [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2017, 1862(9): 1001-1012
- [38] Unno R, Kawabata T, Taguchi K, et al. Deregulated MTOR (mechanistic target of rapamycin kinase) is responsible for autophagy defects exacerbating kidney stone development[J]. Autophagy, 2019: 1-15
- [39] Olzmann J A, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(3): 137-155
- [40] Walther T C, Chung J, Farese R V, Jr. Lipid Droplet Biogenesis[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2017, 33: 491-510
- [41] Suzuki M, Shinohara Y, Ohsaki Y, et al. Lipid droplets: size matters [J]. J Electron Microsc (Tokyo), 2011, 60 Suppl 1: S101-116