

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.05.002

Perilipin5 基因功能结构域载体的构建及亚细胞定位分析*

李 航¹ 赵振广¹ 卢晓朝² 刘 芳³ 李 青³ 潘树义^{1△}

(1 海军总医院高压氧科 全军高压氧中心 北京 100048; 2 第四军医大学生化教研室 陕西 西安 710032; 3 第四军医大学病理与病理生理学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:依据 perilipin5 的功能结构域,构建含 perilipin5 截断体的真核表达载体,并研究它们的亚细胞定位。**方法:**以小鼠肝脏 cDNA 文库为模板,PCR 扩增出 perilipin5 的全长及功能结构域,将之分别装载入真核表达载体 PCMV5 中,并引入 HA 标签。酶切和测序鉴定,脂质体法将构建的质粒转染 293T 细胞,Western blot 验证表达,免疫荧光检测标记 HA,于荧光显微镜下观察 perilipin5 各结构域的亚细胞定位。**结果:**构建的质粒序列正确,转染细胞后可检测到 HA-perilipin5 融合蛋白的表达,免疫荧光显示含有 1-188aa 结构域的 perilipin5 截断体可定位于脂滴表面,1-188aa 一旦缺失 perilipin5 的截断体则弥散于胞内。**结论:**包含 perilipin5 功能结构域的真核表达载体构建成功,perilipin5 的 1-188aa 与其脂滴定位密切相关。

关键词:perilipin5; 功能结构域; 脂滴; 亚细胞定位

中图分类号:Q75, Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)05-805-06

Construction and Subcellular Localization of Perilipin5 Functional Domain*

LI Hang¹, ZHAO Zhen-guang¹, LU Xiao-zhao², LIU Fang³, LI Qing³, PAN Shu-yi^{1△}

(1 Hyperbaric Oxygen Department, Hyperbaric Oxygen Center of PLA, Navy General Hospital, Beijing, 100048, China;

2 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xin'an, Shaanxi, 100048, China;

3 Department of Pathology and Pathophysiology, Fourth Military Medical University, Xin'an, Shaanxi, 100048, China)

ABSTRACT Objective: To construct the truncations of perilipin5 according to the sequence analysis and observe the subcellular location of truncated perilipin5 in mammalian cells. **Methods:** The full length and truncations of perilipin5 gene were PCR-amplified from mouse liver cDNA library, followed by subcloning into the PCMV5 eukaryotic expression vector, containing a HA-tagged fragment. Obtained recombination plasmids were digested by restriction enzyme and sequencing, then transfected into 293T cells. The expression of fusion protein of perilipin5 with HA was confirmed by western blot. The subcellular location of perilipin5 in transfected cells was observed under fluorescence micro scope after immunofluorescence. **Results:** The validity of all the constructs was confirmed by DNA sequencing. Distribution of perilipin5 truncations was discrepant obviously, the truncations with 1-188aa was localized predominantly on the surface of lipid droplets. In contrast, the loss of 1-188aa residues showed a diffused pattern on nucleus and cytoplasm. **Conclusion:** The eukaryotic expression vector containing functional domain of perilipin5 were constructed successfully. Localization of perilipin5 on lipid droplet may be related to the 1-188aa domain.

Key words: Perilipin5; Functional domain; Lipid droplet; Subcellular location

Chinese Library Classification(CLC): Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)05-805-06

前言

脂滴(lipid droplet)是细胞内中性脂(neutral lipids)的主要贮存场所,早期被认为是一个类似于糖原的能量储存形式,但是最新研究表明,脂滴并非细胞内一个简单的能量贮存器,而是一个复杂、活动旺盛、动态变化的多功能细胞器,可能在脂类代谢与存储、膜转运、蛋白降解以及信号传导过程中起着重要的作用,并参与脂肪肝、动脉粥样硬化等脂肪储积性疾病的发

生发展^[1]。目前脂滴作为脂质的中心和能量代谢的枢纽,正受到广泛的关注^[2-3]。脂滴由位于中心的中性脂质如甘油三酯(triglycerides)、胆固醇酯(cholesteryl esters)和外围包裹的磷脂(phospholipid)单分子层构成,表面镶嵌脂滴蛋白(lipid droplet proteins, LDP)。这是一个特异的水相和有机相分离的独特结构^[1-3]。从概念上来说,含有亲水的穿膜延伸结构的蛋白质是不能定位在疏水的脂滴单层膜表面的。研究发现,LDP 大多含有定位在质膜和脂滴的特异结构,其结构域对于其脂滴定位具有重要意义^[2-7]。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81000171;51203185)

作者介绍:李航(1982-),女,博士,主治医师,主要研究方向:脂代谢和缺氧应激,

电话:18600310782, E-mail:363368350@qq.com

△通讯作者:潘树义, E-mail:psy9992011@163.com

(收稿日期:2013-07-04 接受日期 2013-07-29)

在所有脂滴蛋白中,PAT 家族成员是含量最高,最重要的,也是研究最多的一组分子^[2-3]。PAT 家族主要包括 perilipin、adipophilin/ADRP (adipocyte differentiation related protein)、TIP-47 (tail-interacting protein of 47 kDa)、S3-12 以及 perilipin5,其中 perilipin5 是 2007 年新近发现的 PAT 家族成员,主要表达于脂肪酸氧化(fatty acid oxidation)较快的组织,如心肌、肝脏、褐色脂肪组织中^[8-10]。我们早期研究发现,在发生脂肪变性的肝细胞内 perilipin5 定位在脂滴的表面,通过影响脂滴的甘油三酯分解调节肝细胞内脂质储积。但是 perilipin5 是如何定位在脂滴上的以及这种定位是受哪些因素调节尚还不清楚^[11-12]。本研究旨在通过构建 perilipin5 功能结构域载体,研究 perilipin5 各结构域的功能,确定其锚定在脂滴表面的结构域定位,为深入开展 perilipin5 的基础研究工作奠定基础。

1 材料方法

1.1 质粒、菌株及细胞

质粒 pBluescript KS-HA 由清华大学生命科学院李蓬教授惠赠。质粒 pCMV5、*E.coli* DH5 α 菌种、人肾上皮细胞系 293T 为本室保存。

1.2 试剂

Pfu Taq 酶购自 Promega 公司,限制性内切酶 *Nde*I、*Nco*I、*Bgl*II、*Sal*I、*Hind*III、*Xba*I、*Bam*HI、T4 DNA 连接酶、DNA Ladders 购自 TaKaRa 生物公司,Plasmid Midi Kit 购自 OMEGA 公司,Gel Purification Kit 购自 U-gene 公司,DMEM 高糖培养基购自 Gibco 公司,新生牛血清购自杭州四季青生物公司,脂质体 Lipofectamine 2000、cy3 标记羊抗鼠 IgG 购自 Invitrogen 公司,Hoechst 33258、油酸 (oleate or oleic acid,OA)、Bodipy 493/503、HA-tag 单克隆抗体购自 Sigma 公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 引物

按照 perilipin5 基因序列(GenBank 登录号 DQ473305),设计其全长以及截短体的引物,由北京奥科生物公司合成。引物 P1 引入酶切位点 *Nde*I(下划线部分):5'-CCATATGGACCAG-AGAGGTGAAGACACCAC-3',引物 P2 引入酶切位点 *Bgl*II(下划线部分):5'-GGAAGATCTTCAGGAGTCCAGCTCTGG-CA-3',引物 P3 引入酶切位点 *Bgl*II(下划线部分):5'-GAAG-ATCTTTATAGCTCAGCCTCAGTCATGGG-3',引物 P4 引入酶切位点 *Nco*I(下划线部分):5'-CATGCCATGGCAGTCCTG-GCAGCTGAGGC-3',引物 P5 引入酶切位点 *Bgl*II(下划线部分):5'-GAAGATCTTACCGCAGGACCAAATCCAGGA-3',引物 P6 引入酶切位点 *Nde*I(下划线部分):5'-CCATATGGCCA-TGCCACTGCCCTGGCTT-3',引物 P7 引入酶切位点 *Sal*I(下划线部分):5'-GCGTCGACTTATAGCTCAGCCTCAGTCATG-GG-3',引物 P8 引入酶切位点 *Sal*I(下划线部分)5'-GCGTCG-ACGCCATGCCACTGCCCTGGCTT-3',P1、P7 扩增出的 LSDP5 (Δ 189-382 aa)的 1-188aa 段,P8、P2 扩增出的 LSDP5(Δ 189-382 aa)的 383-463aa 段。

1.4 RNA 提取和 RT-PCR

取小鼠肝脏组织依据 Trizol 试剂盒操作说明书提取肝脏组织总 RNA。在波长 260nm 测定 RNA 浓度。取 1 μ g RNA 依

据 Revert Aid Strand cDNA Synthesis 试剂盒说明逆转录合成小鼠肝脏 cDNA,以 cDNA 作为 PCR 模板,扩增内参 β -actin,验证 cDNA 提取成功。

1.5 pBluescript KS-HA- perilipin5 结构域载体的构建

以小鼠肝脏 cDNA 为模板,使用 P1、P2 扩增目的片段 perilipin5 全长(1-463aa),P1、P3 扩增目的片段 perilipin5(1-188aa),P4、P5 扩增目的片段 perilipin5 (189-382aa),P4、P5 扩增目的片段 perilipin5 (189-382aa),P6、P2 扩增目的片段 perilipin5 (383-463aa);P1、P5 扩增目的片段 perilipin5 (1-382aa);P4、P2 扩增目的片段 perilipin5 (189-463aa),P1、P7 扩增出 LSDP5 (Δ 189-382 aa)的 1-188aa 段,P8、P2 扩增出 LSDP5(Δ 189-382 aa)的 383-463aa 段。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 变性 3 min 后开始循环,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30~40 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,产物 4 $^{\circ}$ C 保存。以 PCR 产物纯化试剂盒纯化 PCR 产物,用 *Nde*I 和 *Bgl*II 对 perilipin5 全长(1-463aa)、perilipin5 (1-188aa)、perilipin5(383-463aa)、perilipin5 (1-382aa) 进行双酶切,用 *Nco*I 和 *Bgl*II 对 perilipin5 (189-382aa)、perilipin5 (189-463aa)进行双酶切,用 *Nde*I 和 *Sal*I 对 LSDP5(Δ 189-382 aa)的 1-188aa 段进行双酶切,用 *Sal*I 和 *Bgl*II 对 LSDP5(Δ 189-382 aa)的 383-463aa 段进行双酶切。用 *Nde*I 和 *Bam*HI (或 *Nco*I 和 *Bam*HI) 对质粒 pBluescript KS-HA 分别进行双酶切。酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分析后,将载体和目的片段产物进行胶回收,用 T4 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化宿主菌 DH5 α ,提取质粒酶切鉴定。

1.6 pCMV5-HA-perilipin5 结构域载体的构建

将构建成功的 pBluescript KS-HA-perilipin5 (1-463aa)、(1-188aa)、(189-382aa)、(383-463aa)、(1-382aa)、(189-463aa)、(Δ 189-382 aa)用 *Hind*III 和 *Xba*I 双酶切。用 *Hind*III 和 *Xba*I 对质粒 pCMV5 进行双酶切。酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分析后,将载体和目的片段产物进行胶回收,用 T4 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化宿主菌 DH5 α ,提取质粒,酶切鉴定,并进一步测序鉴定。

1.7 细胞转染

将 293T 细胞以 2×10^5 密度接种于含盖玻片的 6 孔板中。待细胞融合率达 60%时,吸出培养液,用无血清、无抗生素的 DMEM 培养液洗涤细胞 2 次。将适量的质粒和相应量的 Lipofectamine 2000 混合,室温静置 20 min,待其形成 DNA-脂质体复合物后,缓慢滴加至玻片上,37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 条件下培养 6 h。吸去转染液,加入含 10%新生牛血清(FBS)的 DMEM 培养液,继续培养。转染后 24 h,取出爬片,用 PBS 清洗,4%多聚甲醛固定。

1.8 Western Blot 检测 perilipin5 蛋白的真核表达

以细胞裂解液裂解瞬时转染 perilipin5 的 293 细胞,收集蛋白裂解上清液,用 10~12%的 SDS-PAGE 分离胶进行凝胶电泳,转移到 PVDF 膜上。依次滴加 50 g/L BSA (4 $^{\circ}$ C,封闭过夜)、1:5000 稀释的 HA 单克隆抗体(室温孵育 2 h)及 1:3000 的 HRP 酶标羊抗鼠二抗(室温孵育 2 h)。洗涤后 ECL 显影。

1.9 荧光染色

细胞爬片 PBS 洗涤 3 次,加入 1% TritonX-100 室温,5min。PBS 洗涤后加入 1:3000 稀释的 HA 抗体,湿盒内 4 $^{\circ}$ C 过

夜。次日取出复温 30min, PBS 洗涤 3 次, 滴加 1:1000 稀释的 cy3 标记的二抗, 37℃ 孵育 30 min。PBS 洗涤 3 次, 蒸馏水洗涤 1 次, 使用 Hoechst 33258 行细胞核染色, 使用 Bodipy 493/503 行中性脂滴染色, PBS 洗涤后防淬灭荧光封片剂封片。Zeiss 200 M 荧光显微镜观察, AxioVision RE 4.5 软件采集图片, photoshop 8.0 软件处理图像。

2 结果

2.1 perilipin5 基因功能区的 PCR 扩增

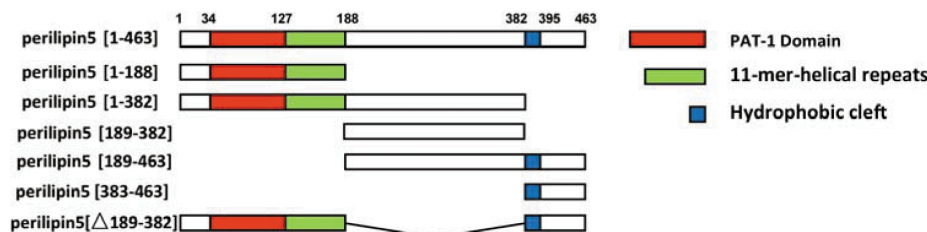


图 1 perilipin5 的结构域和功能结构域载体构建示意图

Fig.1 Schematic diagram of perilipin5 structural domain (Mode diagram)

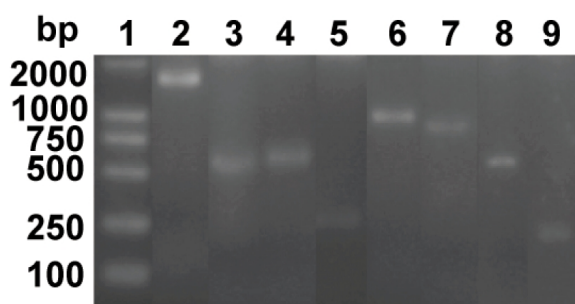


图 2 PCR 扩增目的基因的结果

Fig.2 Analysis of PCR product of target genes

1: DL2000 DNA 标志; 2: perilipin5(1-463aa); 3: perilipin5(1-188aa); 4: perilipin5(189-382aa); 5: perilipin5(383-463aa); 6: perilipin5(1-382aa); 7: perilipin5(189-463aa); 8: perilipin5(Δ189-382aa)前半段 1-188aa 部分; 9: perilipin5(Δ189-382aa)后半段 383-463aa 部分

1: DL2000 DNA marker; 2: perilipin5(1-463aa); 3: perilipin5(1-188aa); 4: perilipin5(189-382aa); 5: perilipin5(383-463aa); 6: perilipin5(1-382aa); 7: perilipin5(189-463aa); 8: the perilipin5(1-188aa) part of perilipin5(Δ189-382aa); 9: the perilipin5(383-463aa) part of perilipin5(Δ189-382aa)

2.2 perilipin5 基因功能区真核表达载体的构建

将 perilipin5 基因功能区 PCR 扩增产物 perilipin5 全长、perilipin5(1-188aa)、perilipin5(383-463aa)、perilipin5(1-382aa)用 *Nde*I 和 *Bgl*II 进行双酶切, 分别连入 pBluescript KS-HA 中的 *Nde*I 和 *Bam*HI 位点。将 perilipin5 基因功能区 PCR 扩增产物 perilipin5(189-382aa)、perilipin5(189-463aa)用 *Nco*I 和 *Bgl*II 进行双酶切, 分别连入 pBluescript KS-HA 中的 *Nco*I 和 *Bam*HI 位点。将 perilipin5(Δ189-382aa)的 perilipin5(1-188aa)段用 *Nde*I 和 *Sal*I 酶切, perilipin5(Δ189-382aa)的 perilipin5(383-463aa)段用 *Sal*I 和 *Bgl*III 酶切, 连入 pBluescript KS-HA 中的 *Nde*I 和 *Bam*HI 位点, 三段连接构建 pBluescript KS-HA-perilipin5(Δ189-382aa)。用 *Hind*III 和 *Xba*I 对 pBluescript KS-HA-perilipin5(1-463aa)、(1-188aa)、(189-382aa)、(383-463aa)、(1-382

以小鼠肝脏 cDNA 文库为模板, 根据疏水性分析和 PAT 家族蛋白相似性结构分析(图 1), 设计引物, 进行 PCR 反应, 分别得到 1389bp (perilipin5 全长)、564bp [perilipin5(1-188aa)]、582bp [perilipin5(189-382aa)]、240bp [perilipin5(383-463aa)]、1146bp [perilipin5(1-382aa)]、822bp [perilipin5(189-463aa)] 片段。perilipin5(Δ189-382aa)的目的基因扩增由两部分构成: 第一部分为 564bp [perilipin5(1-188aa)]段, 两端引入的酶切位点分别为 *Nde*I 和 *Sal*I, 第二部分为 240bp [perilipin5(383-463aa)]段, 两端引入的酶切位点分别为 *Sal*I 和 *Bgl*II (图 2)。

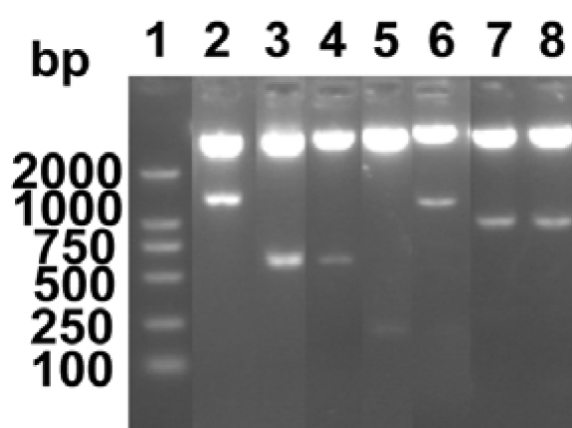


图 3 perilipin5 基因功能区表达载体的酶切鉴定

Fig 3 Restriction enzyme digestion analysis of the expression vectors of truncated perilipin5 genes

1: DL2000 DNA 标志; 2: pBluescript KS-HA-perilipin5(1-463aa)用 *Hind*III 和 *Xba*I 酶切, 获得 1437bp 目的片段; 3: pBluescript KS-HA-perilipin5(1-188aa)用 *Hind*III 和 *Xba*I 酶切, 获得 612bp 目的片段; 4: pBluescript KS-HA-perilipin5(189-382aa)用 *Hind*III 和 *Xba*I 酶切, 获得 630bp 目的片段; 5: pBluescript KS-HA-perilipin5(383-463aa)用 *Hind*III 和 *Xba*I 酶切, 获得 288bp 目的片段; 6: pBluescript KS-HA-perilipin5(1-382aa)用 *Hind*III 和 *Xba*I 酶切, 获得 1194bp 目的片段; 7: pBluescript KS-HA-perilipin5(189-463aa)用 *Hind*III 和 *Xba*I 酶切, 获得 870bp 目的片段; 8: pBluescript KS-HA-perilipin5(Δ189-382aa)用 *Hind*III 和 *Xba*I 酶切, 获得 904bp 目的片段。

1: DL2000 DNA marker; 2: pBluescript KS-HA-perilipin5(1-463aa) digested with *Hind*III/*Xba*I(1437bp); 3: pBluescript KS-HA-perilipin5(1-188aa) digested with *Hind*III/*Xba*I(612bp); 4: pBluescript KS-HA-perilipin5(189-382aa) digested with *Hind*III/*Xba*I(630bp); 5: pBluescript KS-HA-perilipin5(383-463aa) digested with *Hind*III/*Xba*I(288bp); 6: pBluescript KS-HA-perilipin5(1-382aa) digested with *Hind*III/*Xba*I(1194bp); 7: pBluescript KS-HA-perilipin5(189-463aa) digested with *Hind*III/*Xba*I(870bp); 8: pBluescript KS-HA-perilipin5(Δ189-382aa) digested with *Hind*III/*Xba*I(904bp).

aa)、(189-463aa)、(Δ 189-382 aa)酶切鉴定,分别产生 1437bp、612bp、630bp、288bp、1194bp、870bp、904bp 目的片段,酶切下目的片段中含有 perilipin5 基因功能区及 pBluescript KS-HA 质粒中的 HA 标签(图3)。进一步将上述酶切片段分别连入 PCMV5 中的 *Hind* III 和 *Xba* I 位点。再次酶切鉴定后,送北京奥科生物公司进行序列测定。

2.3 perilipin5 蛋白的表达验证

将上述 PCMV5-HA-perilipin5 功能区的真核表达载体瞬时转染 293T 细胞。24 h 后收集细胞裂解液,应用 Western blot 检测 HA 标签蛋白的表达情况,均检测到同预计相对分子质量(Mr)相一致的表达蛋白(图4)。

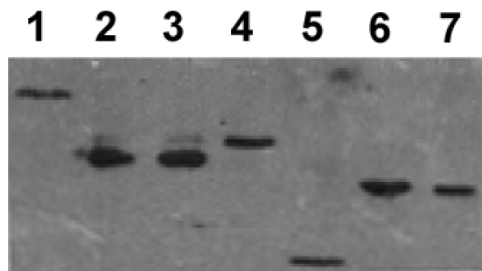


图4 perilipin5 基因功能区截短体在 293T 细胞中的表达

Fig.4 The expression of truncated perilipin5 in 293T cells

1:perilipin5 (1-463aa)蛋白 51KD;2:perilipin5 (Δ 189-382aa)蛋白 29KD;3:perilipin5 (189-463aa)蛋白 30KD;4:perilipin5 (1-382aa)蛋白 42KD;5:perilipin5 (383-463aa)蛋白 9KD;6:perilipin5 (189-382aa)蛋白 21KD;7:perilipin5 (1-188aa)蛋白 21KD

1: perilipin5 (1-463aa) 51KD; 2: perilipin5 (Δ 189-382aa) 29KD; 3: perilipin5 (189-463aa) 30KD; 4: perilipin5 (1-382aa) 42KD; 5: perilipin5 (383-463aa) 9KD; 6: perilipin5 (189-382aa) 21KD; 7: perilipin5 (1-188aa) 21KD

2.4 perilipin5 基因功能区截短体在 293T 细胞中的定位

融合的 HA 的 perilipin5 基因功能区截短体瞬时转染 293T 细胞。加入终浓度为 100 μ M 的油酸过夜(16-18h),刺激细胞内脂滴形成。24 h 后固定细胞,使用 HA 抗体作为一抗,cy3 标记抗体作为二抗,进行免疫荧光染色,红色荧光显示 HA-perilipin5 截断体融合蛋白的细胞定位。用 Bodipy 493/503 染细胞中的中性脂肪(绿色),Hoechst33258 衬染细胞核(蓝色)。荧光显微镜下观察各种 perilipin5 基因功能区截短体的亚细胞定位,结果显示 perilipin5 全长(1-463aa)、perilipin5 (1-188aa)、perilipin5(1-382aa)、perilipin5(Δ 189-382aa)聚集在脂滴周围,围绕脂滴形成环形结构。perilipin5(189-382aa)、perilipin5(383-462aa)、perilipin5(189-462aa)在细胞浆内呈弥散分布,没有明确的脂滴定位(图5)。

3 讨论

自 1991 年第一个脂滴表面蛋白 perilipin 被发现后,陆续发现 adipophilin、TIP47、S3-12、CIDE 等 40 余种蛋白定位在脂滴表面^[2-7]。亲脂的脂滴以 LDP 为媒介与细胞基质及基质内多种蛋白、分子相互作用,参与脂滴的代谢(metabolism)、传输(transport)和细胞内转运(trafficking)等多种过程,决定脂滴的产生、消亡及大小^[2-11]。目前大量研究表明,LDP 的脂滴定位对

LDP 功能的发挥具有重要作用,而 LDP 之所以能定位于脂滴表面,与其特征性结构域密不可分^[2,3,13-14]。

Perilipin、adipophilin、TIP47 定位于脂滴表面,因三者的氨基末端均有约 100 个氨基酸的区域的高度保守序列,故取每一个蛋白名字的首字母命名即为“PAT”家族蛋白,而这一段高度保守序列被称为 PAT-1 结构域^[23]。然而 perilipin 的脂滴定位于 PAT-1 结构域关系不大,主要是有其中间段的三个疏水区(perilipin243-260aa, 320-342aa 和 349-364aa)决定,疏水区之间的存在激素敏感性脂肪酶(Hormone-Sensitive Lipase,HSL)相互作用位点(222aa,276aa),对于脂肪细胞脂滴的贮存和甘油三酯的快速动员发挥双向调节的核心作用^[13-16]。与 perilipin 不同,adipophilin 并没有长的疏水区域,其脂滴定位由两个独立的结构域共同决定,其一是其氨基端的 PAT-1 结构域(adipophilin1-181aa),其二是 adipophilin 277-426aa 的 11-mer 重复序列及疏水区,上述两个区域也是诱导脂滴的形成关键区域^[17]。虽然也没有长的疏水区域,TIP47 的脂滴定位为仅需要其 11-mer 重复序列即可^[18]。2003 年 Wolins 等发现了 S3-12,它虽然没有 PAT-1 结构域,但含有与 perilipin、adipophilin 及 TIP47 相似的 11-mer 重复序列,同时其羧基末端也含有与 adipophilin 及 TIP47 相似的疏水帽状结构(WLVGPF 序列),故也将其归为 PAT 家族^[19]。新近发现的 perilipin5,又被称为 LSDP5(lipid storage droplet protein 5)、MLDP(myocardial lipid droplet protein)或 OXPAT(oxidative tissue-enriched PAT protein),因含有特征性的 PAT-1 结构域,同时羧基末端含有与 S3-12 相同的 WLVGPF 序列,被归为 PAT 家族^[8-10]。我们前期研究发现,perilipin5 在肝细胞内主要影响脂滴的甘油三酯分解代谢^[11],然而其是否与 perilipin 类似通过与脂解酶的相互结合调节脂解还不清楚,其各结构域的具体功能仍有待研究,各结构域与其脂滴定位及脂解功能之间关系尚未得到回答。

根据已有的研究结果及现代生物信息学技术分析,本研究设计和构建 perilipin5 (1-188aa)、(189-382aa)、(383-463aa)的截断体片段,其中 perilipin5 (1-188aa)含有 PAT-1 结构域及 11-mer 重复序列,(189-382aa)内含数个短小的疏水区,(383-463aa)含有与 S3-12 相同的 WLVGPF 序列。位于保证研究的严谨性,我们也构建了上述三段截断体的缺失片段,即 perilipin5(1-382aa)(缺失 383-463aa)、perilipin5 (189-382aa)(缺失 1-188aa)、perilipin5(Δ 189-382aa)(缺失 189-382aa)。为便于观察 perilipin5 截断体胞内的表达分布情况,选择 HA 作为 perilipin5 截断体胞内分布的指示剂,成功构建融合表达 HA-perilipin5 截短体的真核表达载体,瞬时转染细胞后 Western blot 验证了 HA-perilipin5 截短体融合蛋白的表达。通过荧光显微镜结果来看,perilipin5 (全长)定位为脂滴表面,与文献报道相一致。1-188aa 的缺失导致蛋白丧失脂滴定位,而只要存在 1-188aa 均表现出脂滴的定位,提示 perilipin5 的 1-188aa 对于其脂滴定位具有决定性作用。1-188aa 内含有 PAT-1 结构域及 11-mer 重复序列,那么是 PAT-1 结构域决定脂滴定位还是 11-mer 重复序列决定脂滴定位,还是两者共同决定尚有待我们进一步研究。同时 perilipin5 脂滴定位结构域与其脂解功能之间的关系,各结构域与脂解蛋白是否存在相互作用位点,仍需深入探讨。而本研究 perilipin5 截断体载体的构建为上述研究奠定了基础。

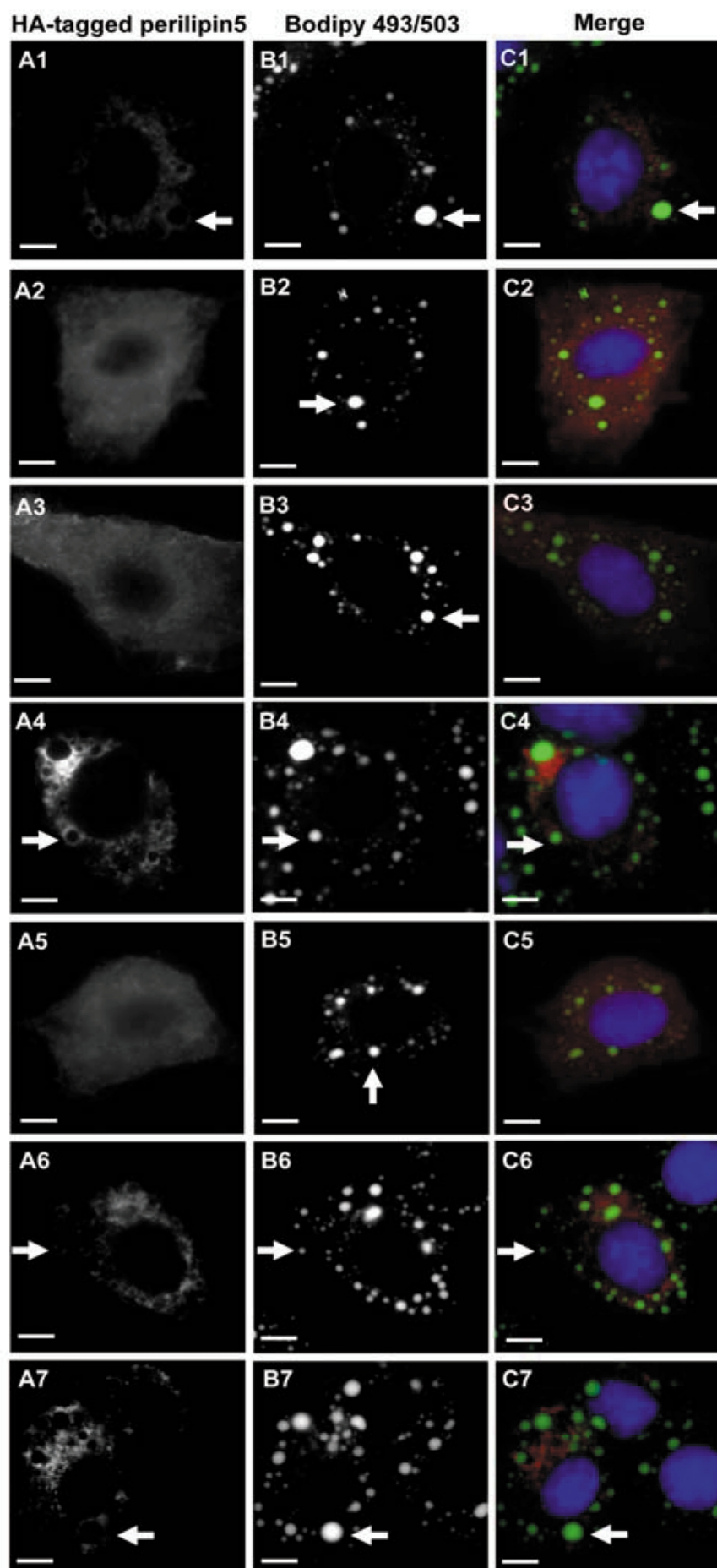


图 5 perilipin5 基因功能区截短体的亚细胞定位

Fig.5 Distribution of perilipin5 truncations in transfected cells

参考文献(References)

- [1] Martin S, Parton RG. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(5): 373-378
- [2] 刘志强, 刘清南, 陶媛, 等. PAT 家族蛋白研究进展[J]. *中南医学科学杂志*, 2012, 40(2):199-204
Liu Zhi-qiang, Liu Qing-nan, Tao Yuan, et al. Advances in PAT family proteins [J]. *Journal of Nanhua University(Medical Edition)*, 2012, 40(2):199-204
- [3] 刘梅芳, 徐国恒. PAT 家族蛋白在细胞内脂滴代谢过程中的作用[J]. *生理科学进展*, 2006, 37(2): 103-107
Liu Mei-fang, Xu Guo-heng. Function of PAT family proteins in the lipid metabolism [J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2006, 37(2): 103-107
- [4] Li H, Song Y, Li F, et al. Identification of lipid droplet-associated proteins in the formation of macrophage-derived foam cells using microarrays[J]. *Int J Mol Med*, 2010, 26(2):231-239
- [5] Li H, Song Y, Zhang LJ, et al. Cell death-inducing DFF45-like effector b (Cideb) is present in pancreatic beta-cells and involved in palmitate induced beta-cell apoptosis [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2012, 28(2): 145-155
- [6] 李航, 李青, 张静, 等. Cideb 蛋白在小鼠正常组织中的分布及其在胰腺组织内的定位[J]. *医学研究生学报*, 2007, 20(10):1030-1032
Li Hang, Li Qing, Zhang Jing, et al. Disposition of cideb in mouse normal tissue and its localization in pancreas[J]. *Journal of medical postgraduates*, 2007, 20(10):1030-1032
- [7] 宋越, 李航, 张丽英, 等. 脂肪分化相关蛋白在巨噬细胞和泡沫细胞中的表达[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(4):309-311
Song Yue, Li Hang, Zhang Li-ying, et al. Expression profile of ADRP in macrophage and foam cell [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2009, 25(4):309-311
- [8] Dalen, KT, Dahl T, Holter E, et al. LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1771 (2): 210-227
- [9] Yamaguchi, T, Matsushita S, Motojima K, et al. MLDP, a novel PAT family protein localized to lipid droplets and enriched in the heart, is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(20): 14232-14240
- [10] Wolins, NE, Quaynor BK, Skinner JR, et al. OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization[J]. *Diabetes*, 2006, 55(12): 3418-3428
- [11] Li H, Song Y, Zhang LJ, et al. LSDP5 enhances triglyceride storage in hepatocytes by influencing lipolysis and fatty acid β -oxidation of lipid droplet[J]. *Plos one*, 2012, 7(6): e36712
- [12] 刘芳, 李青, 叶菁, 等. 脂肪储存小滴蛋白 5 基因的克隆与原核表达[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2009, 25(4):306-308
Liu Fang, Li Qing, Ye Jing, et al. Cloning and prokaryotic expression of lipid storage droplet protein 5 gene [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2009, 25(4):306-308
- [13] 张利红, 张立杰, 杨公社. 一种调控脂解的重要蛋白——围脂滴蛋白 (Perilipin)[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22 (12): 931-934
Zhang Li-hong, Zhang Li-jie, Yang Gong-she. Perilipin: one important protein in lipolysis regulation[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 22 (12):931-934
- [14] 刘梅芳, 朱苏红, 王俊杰. Perilipin 对脂肪细胞内三酰甘油的代谢调控作用[J]. *医学综述*, 2009, 15(17):2572-2575
Liu Mei-fang, Zhu Su-hong, Wang Jun-jie. Metabolic regulation roles of perilipin on triglyceride in adipocyte [J]. *Medical Recapitulate*, 2009, 15(17):2572-2575
- [15] Moore HP, Silver RB, Mottillo EP, et al. Perilipin targets a novel pool of lipid droplets for lipolytic attack by hormone-sensitive lipase [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(52): 43109-43120
- [16] Anne G, Anna S, Vidya S, et al. The central domain is required to target and anchor perilipinA to lipid droplets [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(1): 625-635
- [17] Noriko Nakamura, Toyoshi Fujimoto. Adipose differentiation-related protein has two independent domains for targeting to lipid droplets [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306 (2):333-338
- [18] Bulankina AV, Deggerich A, Wenzel D, et al. TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets[J]. *J Cell Biol*, 2009, 185(4): 641-655
- [19] Wolins NE, Skinner JR, Schoenfish MJ, et al. Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(39): 37713-37721