

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.05.001

· 基础研究 ·

Cidea 和 Cidec 促进肝脏中脂类的积累 *

赵东宇[#] 郁 苗[#] 汪文敏 任 豪 廖榕玉 徐 俐 周林康[△]

(清华大学生命科学院 北京 100084)

摘要 目的: 探讨 Cidea 和 Cidec 对肝脏中脂滴大小和脂类积累的影响。**方法:** 首先, 检测 ob/ob 肥胖小鼠的脂肪肝中 Cidea 和 Cidec 的表达情况。然后, 采用腺病毒系统在野生型小鼠肝脏中过表达 Cidea 和 Cidec, 以及在 ob/ob 小鼠肝脏中基因沉默 Cidea 和 Cidec, 检测肝脏中脂滴大小和脂类积累情况。**结果:** Cidea 和 Cidec 在脂肪性肝脏中高表达。肝脏细胞中过表达 Cidea 和 Cidec 促进大脂滴的形成并能促进小鼠肝脏中的脂类积累, 且二者有协同作用。在脂肪肝中沉默 Cidea 和 Cidec 能缓解脂肪肝的程度, 且脂合成基因的下调, 线粒体活性增加。Cidea 和 Cidec 的共沉默能进一步降低肝脏中的脂类积累。**结论:** Cidea 和 Cidec 在促进肝脏的脂类积累中起重要作用, 并且二者有协同作用。

关键词: 脂肪肝; 脂滴; Cidea; Cidec

中图分类号: R-33; R575.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)05-801-06

Cidea and Cidec Promote the Lipid Storage in Liver*

ZHAO Dong-yu[#], YU Miao[#], WANG Wen-min, REN Hao, LIAO Rong-yu, XU Li, ZHOU Lin-kang[△]

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

ABSTRACT Objective: To investigate the role of Cidea and Cidec in controlling the lipid droplets size and the lipid storage in liver.

Methods: The expressions of Cidea and Cidec in the liver of wild-type and ob/ob mouse were checked. Cidea and Cidec were overexpressed in the wild-type hepatocytes or knocked down in ob/ob mouse hepatocytes using adenovirus mediated system. The lipid droplets size and lipid level were checked. **Results:** The expressions of Cidea and Cidec were dramatically increased in the liver of ob/ob mice. Overexpression of Cidea and Cidec led to the formation of large lipid droplets in hepatocytes, accompanied by significantly increased lipid storage. Knockdown of Cidea and Cidec alleviated fatty liver of ob/ob mice with downregulated FAS and upregulated of CPT1. Double knockdown of Cidea and Cidec led to further reduced lipid storage. **Conclusion:** Cidea and Cidec had synergism effect in promoting the lipid storage in liver.

Key words: Fatty liver; Lipid droplet; Cidea; Cidec

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

Article ID: 1673-6273(2018)05-801-06

前言

CIDE (cell death-inducing DNA fragmentation factor- α -like effector) 蛋白家族包括 Cidea、Cideb、Cidec 三个成员。最初关于 CIDE 蛋白的研究集中在细胞凋亡上, 细胞中过表达 CIDE 蛋白能够引起细胞凋亡^[1]。近年来, 关于 CIDE 蛋白的研究主要集中在脂代谢的功能^[2]。CIDE 蛋白的组织分布具有明显的特异性。在野生型小鼠中, Cidea 主要表达于褐色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT), Cideb 主要表达于肝脏, 少量表达于小肠和肾脏; Cidec 蛋白主要表达于白色脂肪组织 (white adipose tissue, WAT) 和褐色脂肪组织中^[3]。可见, CIDE 蛋白主要表

达于脂代谢比较活跃的组织中, 提示其与机体的能量代谢密切相关。CIDE 蛋白敲除的小鼠并没有表现出和细胞凋亡相关的表型, 而表现出脂代谢过程的改变^[4-7]。CIDE 敲除小鼠能够明显抑制高脂饮食引起的肥胖和胰岛素抵抗, 其脂肪中积累脂类的能力明显降低, 脂解显著增加。

脂滴 (lipid droplet, LD) 是细胞内储存脂类的细胞器, 由富含中性脂的内核以及外围的磷脂单分子膜构成。同时, 磷脂膜表面富含多种蛋白质, 调控脂滴的生成、融合和降解^[8,9]。脂滴的动态变化和肥胖、脂肪肝、动脉粥样硬化等脂代谢疾病密切相关^[10]。细胞生物学的研究表明 CIDE 蛋白能够定位于脂滴表面, 尤其是富集在脂滴和脂滴接触的地方 (LD-LD contacting site,

* 基金项目: 中国博士后科学基金项目 (2013T60103, 2012M520249); 周林康博士受中国科学 2016-2018 年度青年人才托举计划的支持

[#] 为共同第一作者

作者简介: 赵东宇 (1990-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 生物学, 电话: 010-62797133, E-mail: 1016251255@qq.com

郁苗 (1989-), 女, 博士研究生, 主要研究方向: 生物学, 电话: 010-62797133, E-mail: yumiao918@163.com

[△] 通讯作者: 周林康, 男, 博士, 助理研究员, 主要研究方向: 生物学, 电话: 010-62797133, E-mail: zhoulinkang@mail.tsinghua.edu.cn

(收稿日期: 2017-05-29 接受日期: 2017-06-25)

LDCS),形成一种潜在的脂肪转移通道^[11,12]。当靠近的两个脂滴存在大小的差异时,大小脂滴内部的压力差就会引起脂滴内的中性脂由小脂滴流向大脂滴,最终导致大脂滴的形成。Perilipin1、Rab8a 等蛋白会在 LDCS 区域促进 CIDE 蛋白的融合功能^[13,14]。

脂肪肝是由于肝脏中大量的脂类积累引起的,主要包括酒精性脂肪肝和非酒精性脂肪肝^[15]。酒精性脂肪肝诱因单一,而非酒精性脂肪肝的发病机制比较复杂^[16]。脂肪肝进一步发展会引起肝脏纤维化,甚至肝癌^[17]。之前有研究表明 Cidea 和 Cidec 在高脂饮食诱导的脂肪肝中有高表达^[18]。单独敲低 Cidea 或者 Cidec 能够缓解脂肪肝的发生^[19,20]。本研究拟在肝脏中同时过表达和基因沉默 Cidea 和 Cidec 基因,研究二者对肝脏中脂类积累的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

实验使用的小鼠均为 C57BL/6J 品系。野生型小鼠购自于清华大学实验动物平台。leptin 缺失的杂合子小鼠购自 Jackson 实验室,自交得到 ob/ob 纯合小鼠。纯化腺病毒用氯化铯等药物购买自 Sigma。细胞转染试剂 Lipofectamine 2000 和 BODIPY 558/568 C12 染料购买自 Life Technology。细胞培养所使用的高糖 DMEM 培养基和胎牛血清购买自 GIBCO。甲醇等有机溶剂购买自京纯。Cidea、Cideb 和 Cidec 抗体均为实验室自制,actin 抗体购自 Sigma-Aldrich。二抗采用的是 GE Health 的 HRP-conjugated 二抗系列。Realtime PCR 采用的 SYBR 试剂盒购买自 Biosystems 公司,采用的机器是 ABI7500 荧光定量 PCR 仪。

1.2 方法

1.2.1 小鼠实验 所有动物实验都在清华大学实验动物平台内完成,并且受到清华大学实验动物伦理委员会的监督。重组腺病毒的包装按照 AdEasy Adenoviral 系统(Stratagene)说明进行。病毒扩增后利用氯化铯密度梯度离心纯化病毒,利用 AdEasy Viral Titer 试剂盒检测病毒滴度。两个月大小鼠尾静脉注射进 200 μ L 体积的 1×10^7 滴度的相应病毒。14 天后进行后续实验。

1.2.2 细胞实验 根据之前的方法稍作改进^[21],37℃预热 KRG buffer (NaCl 7.0g/L,NaHCO₃ 2.0g/L,Glucose 3.6g/L,每升加入 1M HEPES pH=7.45 5 mL,Solution C [480 mM KCl,120 mM MgSO₄,120 mM KH₂PO₄] 10 mL,补水至 1 L,调整 pH 值到 7.4)。麻醉小鼠并固定,打开腹腔暴露出肝脏静脉。将留置针插入静脉,打开滞留阀,剪断肝脏动脉,注入 buffer1(50 mL KRG 中加入 100 μ L 50mM EGTA),此时血液被冲出。待血液冲洗干净后,换成 buffer 2 (50 mL KRG 加入 1 mL 25 mg/mL collagenase 和 100 μ L 1M CaCl₂),此时开始消化肝脏细胞。约 5-10 min 后将肝脏剪下至 10 cm 细胞培养皿中,之后在细胞培养超净台中进行操作。用剪刀将肝脏剪破,吹打几下,用滤网过滤至 50 mL 管子中,加入预冷(4℃)的 DMEM,50×g 离心 4 min,弃上清,加入 DMEM 离心一次。弃上清,加入含 10%血清的 DMEM。利用台盼蓝染色计算活细胞数,6 cm 培养皿放入 10^7 个细胞培养。细胞培养使用的是加有 10%胎牛血清和 1%青 /

链霉素(青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μ g/mL)的高糖 DMEM (dulbecco's modified eagle's medium,GIBCO)培养液。细胞培养于相对湿度 80%,恒温 37℃,5% CO₂ 的培养箱中。细胞转染使用 Lipofectamine 2000(Life Technology)转染试剂,按照产品说明书进行操作。转染 24 h 后加入 1:20000 体积的 BODIPY 558/568 C12 染料和终浓度 200 μ M 的油酸(OA),24 h 后封片,用荧光显微镜观察。

1.2.3 Realtime PCR 使用 Trizol (Invitrogen)- 三氯甲烷方法提取 RNA 后取 5 μ g 总 RNA 用 Invitrogen Superscript 反转试剂盒按说明书进行反转得到 cDNA。按照说明进行操作。使用的引物:Actin:正向引物 ACACTGTGCCCATCTACGAG,反向引物 CAGCACTGTGTTGGCATAGAG;Cidea:正向引物 TCCTCGGCTGTCTCAATG,反向引物 TGGCTGCTCTTCTGTATCG;Cideb:正向引物 TCTGTGATCATAAGCGGACA,反向引物 GCAGCAGCGAGGAAGTCCAA;Cidec:正向引物 GTGTCCACTTGTGCCGTCTT,反向引物 CTCGCTTGTTGTCTTGATT;FAS:正向引物 TCCAAGACTGACTCGGCTACTGAC,反向引物 GCAGCCAGGTTTCGGAATGCTATC;Cpt1:正向引物 ACCACTGGCCGCATGT,反向引物 CTCCATGGCGTAGTAGTTGCT。

1.2.4 Western Blot 肝脏组织采用 RIPA 裂解液裂解,使用 Bio-rad 进行蛋白定量。使用 Bio-rad 的 western blot 电泳系统和湿转膜法。一抗过夜孵育,二抗孵育 1 h,之后进行显影。

1.2.5 脂类抽提与薄层层析 50 mg 组织中加入 1.25 mL PBS 缓冲液后匀浆。加入 5 mL 甲醇-氯仿(体积比 2:1)剧烈震荡,1000 rpm 离心 10 分钟。收集中间的蛋白层,用 0.2 M 氢氧化钾溶液溶解,用 Bradford 法测定蛋白浓度。将下层有机相用玻璃注射器转移至新的玻璃管中,在氮气吹干,加入一定体积的甲苯重悬。薄层层析:用上样针将样品点在层析板上,在层析液(正己烷:乙醚:乙酸=70:30:1)的作用下铺开,使用染色液(10% w/v 的磷酸铜,10%v/v 的磷酸溶液)染色 30 s 后 120℃高温显色 10 min。扫描显色后的 TLC 板,利用 Quantity One 4.6 软件进行定量分析。

1.2.6 H&E 染色 组织小块在 10%福尔马林溶液中固定 1 h,脱水透明后用石蜡包埋、切片、切片、切片,利用苏木精-伊红染色(H&E 染色)在显微镜下观察组织形态,使用 nikon 相机拍照。

1.2.7 统计学分析 将来自独立平行实验的数据进行统计学分析,使用 Graphpad Prism 5.0 作图。利用 t-检验比较不同组数据之间的差异,P 值 <0.05 认为存在明显差异。P<0.05 时用一个 * 表示,P<0.01 时用两个 ** 表示,P<0.001 时用三个 *** 表示。

2 结果

2.1 Cidea 和 Cidec 在脂肪肝中高度表达

取正常饲料喂养的三个月的野生型(wild-type, WT)小鼠和 ob/ob 小鼠的肝脏,使用 Real-time PCR 和 western blot 观察其中的 CIDE 家族蛋白的表达变化(图 1)。结果显示:和 WT 小鼠相比,ob/ob 小鼠肝脏中的 Cidea 和 Cidec 的 mRNA 水平和蛋白表达水平均显著提高,而 Cideb 的表达没有变化,提示在脂肪肝发生过程中 Cidea 和 Cidec 可能起到重要的作用。

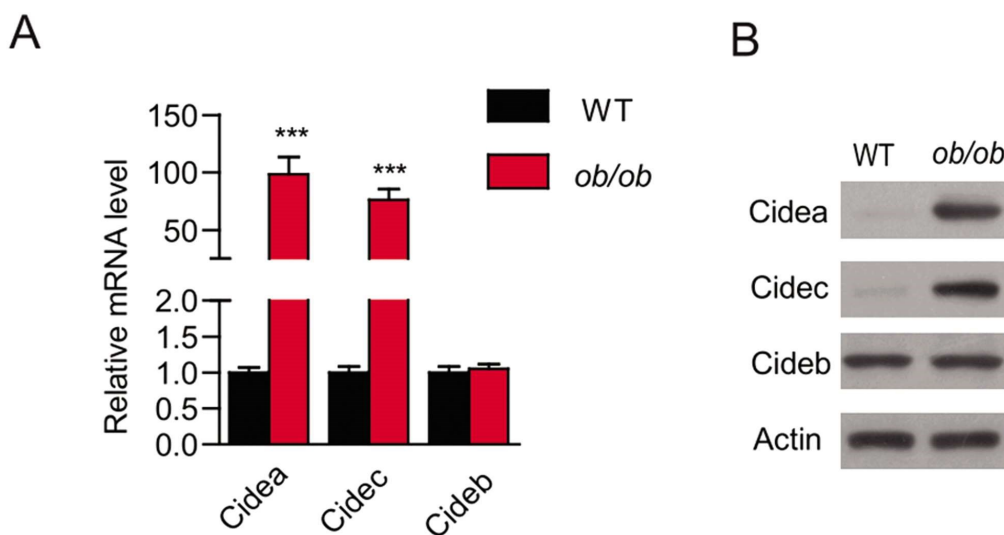


图1 WT小鼠和 ob/ob 小鼠肝脏中 CIDE 家族蛋白的表达

分离野生型(WT)小鼠和 ob/ob 小鼠的肝脏,小鼠三个月大,每种基因型四只。A:实时荧光定量 PCR(Realtime PCR)实验检测相对 mRNA 水平,WT 小鼠为对照组。展示平均值和标准差,*** 表示 t 检验 $P < 0.001$ 。B:肝脏蛋白样品进行蛋白质免疫印迹实验(western blot)。

Fig.1 Expression profiles of CIDE proteins in the liver of wild and ob/ob mice

(A)Relative mRNA levels of CIDE proteins. (B) Western blotting analysis showing levels of CIDE proteins in the liver. $n=4$. *** $P < 0.001$.

2.2 Cidea 和 Cidec 定位于脂滴的表面并促进大脂滴的形成

为了研究 Cidea 和 Cidec 蛋白对肝脏细胞中脂滴的影响,我们从三个月大的野生型小鼠中分离肝脏细胞 (hepatocyte) 进行体外培养。随后,我们将细胞分为三组,分别转染绿色荧光蛋白(GFP)、带有 GFP 标签的 Cidea 和带有 GFP 标签的 Cidec。表达 24 小时后加入终浓度 $200 \mu\text{M}$ 的油酸(OA)促使中性脂合成和给中性脂染色的红色 BODIPY 染料,再过 24 小时后封片使

用荧光显微镜观察(图 2)。结果显示:过表达 Cidea 和 Cidec 后肝细胞中的脂滴数目减少,脂滴大小明显增大,Cidea 和 Cidec 均定位在脂滴表面脂滴-脂滴接触区域(LDCS),这表明 Cidea 和 Cidec 能够通过促进脂滴融合来使脂滴增大。同在脂肪细胞中的功能一致^[2],Cidea 和 Cidec 在肝脏细胞中也可以定位于 LDCS。

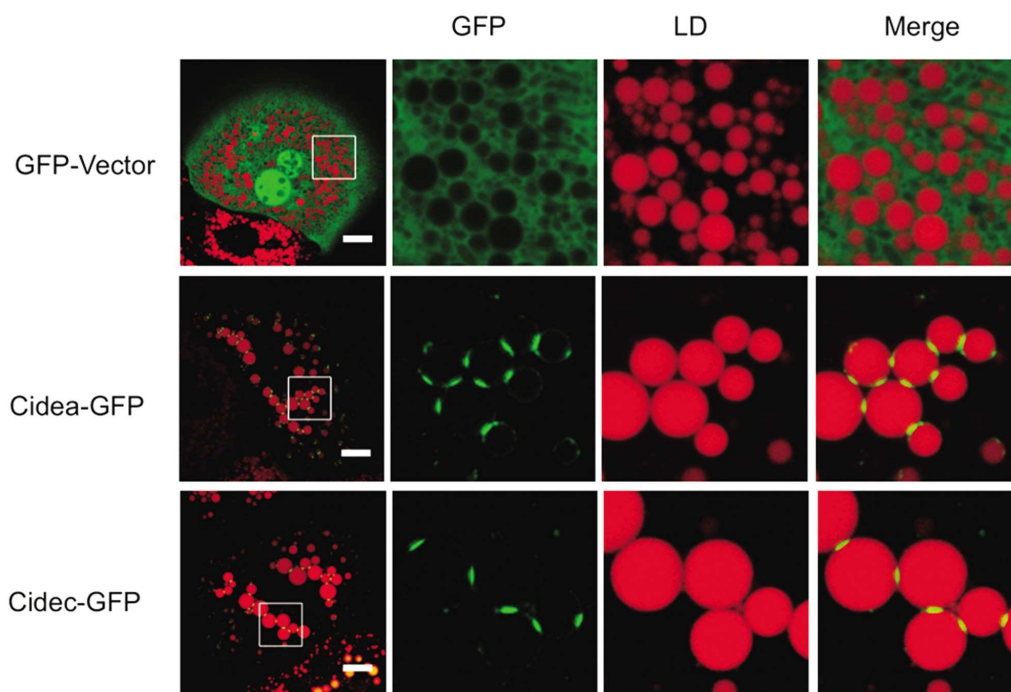


图2 Cidea 和 Cidec 在肝细胞中定位在脂滴-脂滴接触区域并促进脂滴增大

在野生型肝细胞中分别转染 GFP-Vector、Cidea-GFP 和 Cidec-GFP,24 后使用终浓度 $200 \mu\text{M}$ 的油酸(OA)和红色 BODIPY 染料处理,再过 24 小时后封片,使用荧光显微镜观察。标尺 = $10 \mu\text{m}$ 。

Fig.2 Cidea and Cidec localized on the surface of LDs

Protein localization of Cidea and Cidec in primary hepatocytes. GFP-vector, Cidea-GFP and Cidec-GFP plasmids were transfected into hepatocytes. Oleic acid was added to promote the formation of LDs for 24h. LDs were labeled with bodipy 556/568 (C12, red). Scale bars, $10 \mu\text{m}$.

2.3 野生型小鼠肝脏中过表达 Cidea 和 Cidec 促进脂类的积累

进一步使用重组腺病毒(Adenovires, AD)系统在两个月大的野生型小鼠中分别过表达 Cidea 和 Cidec 以及同时过表达 Cidea 和 Cidec。分离肝脏进行的 western blot 检测证明过表达是成功的(图 3A)。使用薄层层析检测肝脏中的中性脂即甘油三酯(TAG),发现单一过表达 Cidea 和 Cidec 都会导致肝脏中的甘油三酯含量增加,而同时过表达二者会导致肝脏中甘油三酯

含量的进一步上升(图 3B)。随后,我们进行的 H&E 染色也证明了这一点(图 3C)。在单一过表达 Cidea 和 Cidec 的肝脏中白色的中性脂部分有所增加,而同时过表达二者时白色中性脂部分明显增加了。由此可见,Cidea 和 Cidec 的过表达可以促进肝脏中中性脂的积累,同时过表达二者其促进脂积累的效果进一步增加。

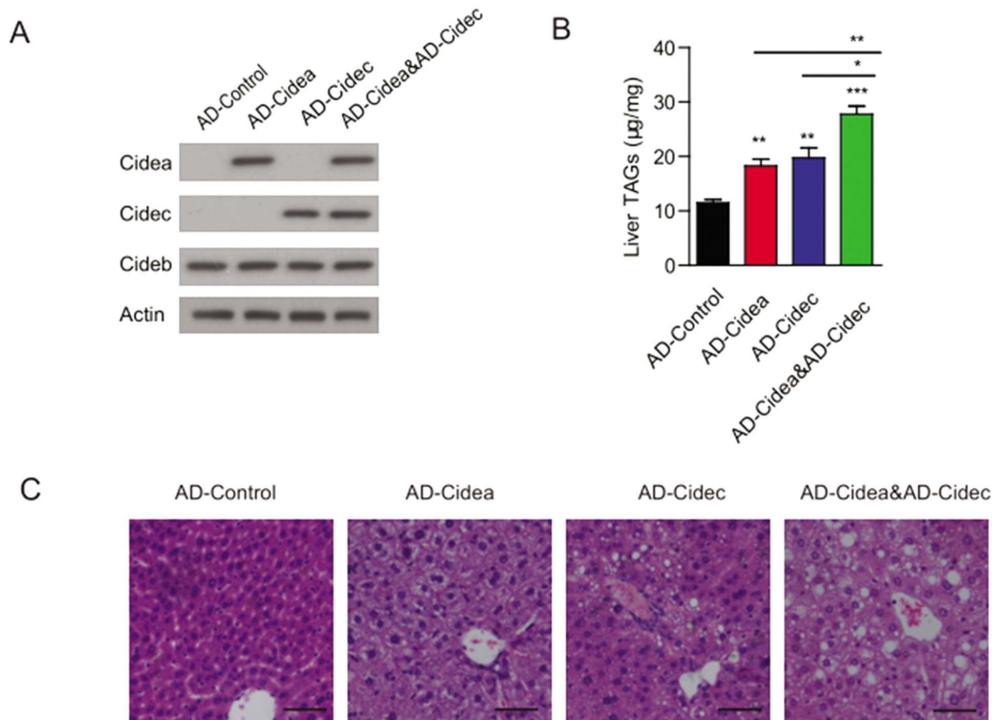


图3 过表达 Cidea 和 Cidec 促进肝脏中的中性脂积累

两个月大小鼠 4 只一组分为四组,尾静脉注射重组腺病毒(AD-virus),14 天后进行实验。四组注射的腺病毒分别为:对照组腺病毒 AD-Control;重组 Cidea 腺病毒 AD-Cidea;重组 Cidec 腺病毒 AD-Cidec;AD-Cidea 和 AD-Cidec 共同注射。A:Western blot 检测肝脏中 Cidea 和 Cidec 的表达。

B:薄层层析(TLC)检测肝脏中的甘油三酯(TAG)含量。展示平均值和标准差,*表示 t 检验 $P<0.05$,**表示 t 检验 $P<0.01$,***表示 t 检验 $P<0.001$ 。

C:H&E 染色。标尺 =50 μm。

Fig.3 Overexpress of Cidea and Cidec promote lipid storage in the liver of WT mice

Representative Western blot showing the protein expression of Cidea and Cidec. (B) Liver TAG levels. n=4. (C) liver section by H&Estaining. Scale bar, 50 μm. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

2.4 脂肪肝中沉默 Cidea 和 Cidec 降低脂肪的积累

随后,在两月龄的 ob/ob 小鼠中,我们同样重组了腺病毒系统的 Cidea 和 Cidec shRNA,利用它们来降低其 ob/ob 肝脏中的 Cidea 和 Cidec 的表达。分离肝脏进行的 western blot 检测证明 shRNA 的确显著地抑制了两种蛋白的表达(图 4A)。使用 H&E 染色观察肝脏切片,可以看出分别抑制 Cidea 和 Cidec 的表达时,肝脏中白色的中性脂部分都有所减少,而同时抑制二者的表达时脂滴进一步减少(图 4B)。使用薄层层析检测肝脏中的 TAG 可以得到同样结果,单一抑制 Cidea 和 Cidec 的表达都会导致肝脏中的甘油三酯含量降低,而同时抑制二者会导致肝脏中甘油三酯含量的进一步降低(图 4C)。随后,我们使用 Realtime PCR 检测了肝脏中脂肪酸合成的关键酶脂肪酸合成酶(FAS)和脂肪酸β氧化分解的关键蛋白肉碱-软脂酰转移酶1(CPT1)的 mRNA 水平。结果显示:抑制 Cidea 或者 Cidec 表达时 FAS 的 mRNA 水平降低,CPT1 的表达水平上升,而同时抑

制二者的表达时 FAS 的 mRNA 水平有进一步显著降低,而 CPT1 的 mRNA 表达水平进一步显著上升(图 4D 和图 4E)。由此可见,Cidea 和 Cidec 的作用是促进肝脏中中性脂的积累并抑制脂肪分解,而且二者在这方面具有协同作用。

3 讨论

在本研究中,我们探讨了 CIDE 蛋白家族中的 Cidea 和 Cidec 蛋白对肝脏脂类积累的影响。Cidea 和 Cidec 的 mRNA 和蛋白在脂肪性肝脏中高度表达。在肝脏细胞中过表达 Cidea 和 Cidec 能够明显诱导大脂滴的形成。在正常小鼠肝脏中过表达 Cidea 和 Cidec 能够促进脂类的积累,并且二者的共表达能够进一步促进脂类的积累。同样的,在脂肪肝中基因沉默 Cidea 或者 Cidec 能够缓解脂肪肝的程度,肝脏内脂类的降低主要是通过抑制脂肪合成的通路并增强脂肪降解氧化的通路来实现的。相对于单独沉默 Cidea 或者 Cidec,在脂肪肝中同时沉默 Cidea 和 Cidec 会有更明显的降低肝脏脂类的效果。

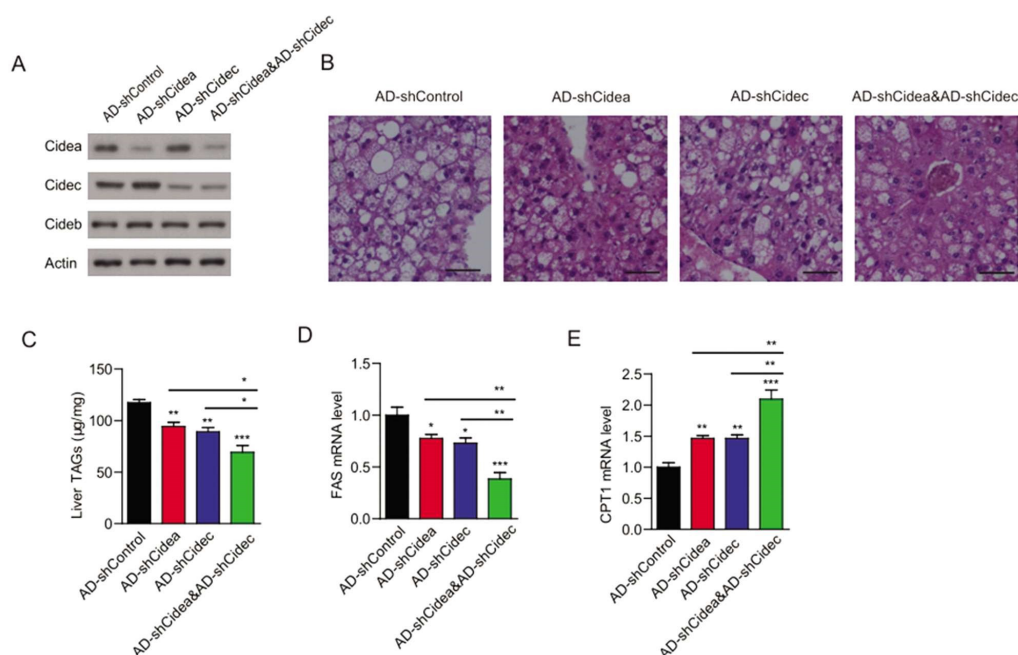


图4 抑制 Cidea 和 Cidec 的表达降低肝脏中的脂含量

两月龄 ob/ob 小鼠 4 只一组分为四组,尾静脉注射重组腺病毒(AD-virus),14 天后采样检测。四组注射的腺病毒分别为:对照组腺病毒 AD-shControl;重组 Cidea-shRNA 腺病毒 AD-shCidea;重组 Cidec-shRNA 腺病毒 AD-shCidec;AD-shCidea 和 AD-shCidec 共同注射。A:Western blot 检测肝脏中 Cidea 和 Cidec 的表达。B:H&E 染色。标尺=50 μm。C:薄层层析(TLC)检测肝脏中的甘油三酯(TAG)含量。D:Realtime PCR 检测肝脏中脂肪酸合酶(FAS)的 mRNA 水平。E:Realtime PCR 检测肝脏中肉碱-软脂酰转移酶 1(CPT1)的 mRNA 水平。展示平均值和标准差, *表示 t 检验 $P<0.05$,**表示 t 检验 $P<0.01$,***表示 t 检验 $P<0.001$ 。

Fig.4 Knockdown of Cidea and Cidec alleviate lipid storage in ob/ob mice liver

Representative Western blot showing the protein expression of Cidea and Cidec. (B) liver section by H&Estaining. Scale bar, 50 μm. (C) Liver TAG levels. n=4. (D&E) Relative mRNA level, n=4. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Cidea 和 Cidec 蛋白的降解速度较快,其半衰期仅有 0.5-1 小时^[23,24]。Cidea 和 Cidec 都能够定位于内质网和脂滴上,内质网上的 Cidea 和 Cidec 蛋白可通过蛋白酶体途径发生降解,而脂滴上的 Cidea 和 Cidec 蛋白稳定性相对较高。脂滴上的 Cidec 蛋白受到乙酰化的修饰,大大提高了其稳定性^[25]。Cidea 和 Cidec 蛋白的表达和脂类的储存是正相关的。CIDE 蛋白的高表达促进了大脂滴的形成和脂类的积累,而脂滴的形成进一步促进了 Cidea 和 Cidec 的蛋白稳定性。相对于 Cidea 和 Cidec 的单表达,肝脏中 Cidea 和 Cidec 的共表达能进一步促进脂类积累,这可能是由于二者共存时能够促进彼此的稳定性。Cideb 蛋白在正常小鼠肝脏中表达,在脂肪肝中并没有进一步的增加。之前的研究表明 Cideb 缺失的小鼠分泌出来的 VLDL 中 TAG 的含量明显降低^[26,27]。Cideb 也具有促进脂滴融合的功能,但其功能相对于 Cidea 和 Cidec 明显较弱^[12]。这些结果显示 Cideb 在正常肝脏的脂代谢中发挥重要作用,当肝脏中有大量脂类积累时,由于 Cidea 和 Cidec 的高表达,Cidea 和 Cidec 主要调控肝脏中的脂类储存,此时 Cideb 的功能不能显现出来。

脂肪肝发生过程伴随着一系列转录因子的激活。其中和脂代谢密切相关的是 SREBP 和 PPAR γ ^[28]。SREBP 包括 SREBP1c 和 SREBP2 两个基因。SREBP1c 的下游基因包括 FAS、SCD1、ELOVL6 等在脂肪肝中有明显增加。已有研究表明 Cidea 蛋白是 SREBP1c 的下游基因^[19,29]。食物中的饱和脂肪酸可以通过 SREBP1c 途径激活 Cidea。PPAR γ 在脂肪组织中高度表达,其和脂肪细胞的分化及脂类积累密切相关。PPAR γ 在脂肪肝中

也有明显增加,其和脂肪的合成,积累密切相关^[30]。有报道表明 Cidec 是 PPAR γ 的下游基因,在 Cidec 基因的启动子区域含有 PPAR γ 的结合位点^[20]。在脂肪肝中,Cidea 和 Cidec 分别作为 SREBP 和 PPAR γ 的下游基因,可能在维持脂肪肝的脂滴形成和脂类储存中起到重要作用。之前的研究多关于在单独 Cidea 或者 Cidec 对肝脏脂积累的影响^[19,20],本研究的创新之处在于联合考虑 Cidea 和 Cidec 两个蛋白对肝脏脂积累的影响。发现二者的联合沉默效果要好于单独蛋白沉默。

肝脏中脂代谢的稳态平衡在肝脏的功能维持中起到重要作用。肝脏中开始有脂类积累时,Cidea 和 Cidec 蛋白表达增加。肝脏中过多的脂类以脂滴的形式储存起来。Cidea 和 Cidec 作为脂滴表面蛋白,能够促进脂滴的融合。在一定的程度内,较大的脂滴储存脂类的能力增加,能够起到将脂类"锁定"在脂滴内的功能。此时沉默 Cidea 和 Cidec 能够起到缓解脂肪肝的作用,脂滴变小导致的脂类释放可以由增强的线粒体活性消耗掉。当肝脏中脂类的储存继续增加时,超过脂滴能够容忍的范围,此时过多的脂类会发生降解,或者进入线粒体进行氧化。过多的脂类的代谢产物以及自由基等会引起肝脏细胞的代谢紊乱甚至凋亡^[31],使得细胞内的脂代谢进入恶性循环。细胞内代谢的失衡会通过某种未知的方式引起 Cidea 和 Cidec 蛋白的降低。并进一步导致脂类的"流散",引起肝脏的病变。后续的关于 CIDE 蛋白在脂肪性肝病不同阶段的表达情况以及其对肝脏脂代谢的影响需要进一步的研究。

参 考 文 献(References)

- [1] Chen Z, Guo K, Toh SY, et al. Mitochondria localization and dimerization are required for CIDE-B to induce apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(30): 22619-22622
- [2] Xu L, Zhou LK, & Li P. CIDE Proteins and Lipid Metabolism[J]. *Arterioscl Thromb Vas*, 2012, 32(5): 1094-1098
- [3] Inohara N, Koseki T, Chen S, et al. CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor[J]. *Embo J*, 1998, 17(9): 2526-2533
- [4] Nishino N, Tamori Y, Tateya S, et al. FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118 (8): 2808-2821
- [5] Toh SY, Gong JY, Du GL, et al. Up-Regulation of Mitochondrial Activity and Acquirement of Brown Adipose Tissue-Like Property in the White Adipose Tissue of Fsp27 Deficient Mice [J]. *Plos One*, 2008, 3 (8)
- [6] Li JZ, Ye J, Xue B, et al. Cideb regulates diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin sensitivity by controlling lipogenesis and fatty acid oxidation[J]. *Diabetes*, 2007, 56(10): 2523-2532
- [7] Zhou ZH, Toh SY, Chen ZM, et al. Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity [J]. *Nat Genet*, 2003, 35 (1): 49-56
- [8] Walther TC & Farese RV, Jr. Lipid droplets and cellular lipid metabolism[J]. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 687-714
- [9] Wilfling F, Haas JT, Walther TC, et al. Lipid droplet biogenesis[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 29: 39-45
- [10] Krahmer N, Farese RV, Jr., & Walther TC. Balancing the fat: lipid droplets and human disease[J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(7): 973-983
- [11] Gong JY, Sun ZQ, Wu LZ, 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
- [12] Xu WY, Wu LZ, Yu M, et al. Differential Roles of Cell Death-inducing DNA Fragmentation Factor-alpha-like Effector (CIDE) Proteins in Promoting Lipid Droplet Fusion and Growth in Subpopulations of Hepatocytes [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291 (9): 4282-4293
- [13] Sun ZQ, Gong JY, Wu H, et al. Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes[J]. *Nat Commun*, 2013, 4
- [14] Wu LZ, Xu DJ, Zhou LK, et al. Rab8a-AS160-MSS4 Regulatory Circuit Controls Lipid Droplet Fusion and Growth[J]. *Dev Cell*, 2014, 30 (4): 378-393
- [15] Cholanikeril G, Perumpail RB, Pham EA, et al. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Epidemiology, Natural History, and Diagnostic Challenges[J]. *Hepatology*, 2016, 64(3): 954
- [16] Maher JJ. Modeling fatty liver disease in animals: Is there an optimal approach, and is the effort worthwhile?[J]. *Hepatology*, 2016, 64(5): 1398-1400
- [17] Sookoian S, Pirola CJ. Nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome: Shared genetic basis of pathogenesis[J]. *Hepatology*, 2016, 64(5): 1417-1420
- [18] Jinno Y, Nakakuki M, Sato A, et al. Cide-a and Cide-c are induced in the progression of hepatic steatosis and inhibited by eicosapentaenoic acid[J]. *Prostag Leukotr Ess*, 2010, 83(2): 75-81
- [19] Zhou L, Xu L, Ye J, et al. Cidea promotes hepatic steatosis by sensing dietary fatty acids[J]. *Hepatology*, 2012, 56(1): 95-107
- [20] Matsusue K, Kusakabe T, Noguchi T, et al. Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPAR gamma target gene Fsp27[J]. *Cell Metab*, 2008, 7(4): 302-311
- [21] Zhou LK, Park SY, Xu L, et al. Insulin resistance and white adipose tissue inflammation are uncoupled in energetically challenged Fsp27-deficient mice[J]. *Nat Commun*, 2015, 6
- [22] Wu L, Zhou L, Chen C, et al. Cidea controls lipid droplet fusion and lipid storage in brown and white adipose tissue[J]. *Sci China Life Sci*, 2014, 57(1): 107-116
- [23] Chan SC, Lin SC, Li P. Regulation of Cidea protein stability by the ubiquitin-mediated proteasomal degradation pathway [J]. *Biochem J*, 2007, 408(2): 259-266
- [24] Nian Z, Sun Z, Yu L, et al. Fat-specific protein 27 undergoes ubiquitin-dependent degradation regulated by triacylglycerol synthesis and lipid droplet formation[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(13): 9604-9615
- [25] Qian H, Chen Y, Nian Z, et al. HDAC6-mediated acetylation of lipid droplet-binding protein CIDEA regulates fat-induced lipid storage[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(4): 1353-1369
- [26] Ye J, Li JZ, Liu Y, et al. Cideb, an ER- and lipid droplet-associated protein, mediates VLDL lipidation and maturation by interacting with apolipoprotein B[J]. *Cell Metab*, 2009, 9(2): 177-190
- [27] Li XH, Ye J, Zhou LK, et al. Opposing roles of cell death-inducing DFF45-like effector B and perilipin 2 in controlling hepatic VLDL lipidation[J]. *Journal of Lipid Research*, 2012, 53(9): 1877-1889
- [28] Shimano H. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a dominant transcription factor for gene regulation of lipogenic enzymes in the liver[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2000, 10(7): 275-278
- [29] Wang R, Kong X, Cui A, et al. Sterol-regulatory-element-binding protein 1c mediates the effect of insulin on the expression of Cidea in mouse hepatocytes[J]. *Biochem J*, 2010, 430(2): 245-254
- [30] Barak Y & Kim S. Genetic manipulations of PPARs: effects on obesity and metabolic disease[J]. *PPAR Res*, 2007, 2007: 12781
- [31] Sookoian S & Pirola CJ. Nonalcoholic fatty liver disease: Biomarkers support decisions around pharmacological intervention[J]. *Hepatology*, 2017, 65(4): 1417-1419