

• 论 著 •

PLIN2 在氧化型低密度脂蛋白诱导的泡沫细胞脂噬中的作用*

谭艳美^{1,2}, 陈三俊³, 谭玉林¹, 吴 智¹, 蒙国照¹, 谭艳飞^{4△}

(1. 湘南学院基础医学院, 湖南 郴州 423000; 2. 湘南学院生物医药微生物组学重点实验室, 湖南 郴州 423000; 3. 郴州市第一人民医院疼痛科, 湖南 郴州 423000; 4. 郴州市第一人民医院内分泌糖尿病科, 湖南 郴州 423000)

[摘 要] **目的** 探讨围脂滴蛋白 2(PLIN2)在泡沫细胞脂噬中的作用,为动脉粥样硬化相关疾病的防治提供更多思路。**方法** 构建氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的泡沫细胞模型,沉默细胞内 PLIN2 基因表达,将细胞分为 5 组:对照组、空质粒组、ox-LDL 处理组、siPLIN2 组、ox-LDL+siPLIN2 组。应用油红 O 染色法观察细胞内脂质蓄积情况,采用 Western blot 观察细胞内 PLIN2 和脂噬相关蛋白 LC3 和 p62 表达情况。**结果** 在 ox-LDL 诱导的泡沫细胞形成过程中 LC3 蛋白表达量随着脂质的增加而增加,p62 则先减少后增加;在 PLIN2 沉默的 RAW264.7 巨噬细胞中 LC3 表达下调;在 PLIN2 沉默的泡沫细胞中,p62 蛋白表达量明显增加,脂噬减弱。**结论** 在 ox-LDL 诱导的泡沫细胞中,敲减 PLIN2 可下调 p62 的表达,减弱细胞内脂噬。

[关键词] 脂噬; 围脂滴蛋白 2; 氧化型低密度脂蛋白; 泡沫细胞
DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.23.002 **中图法分类号:**R-331
文章编号:1009-5519(2023)23-3966-04 **文献标识码:**A

The role of PLIN2 in oxidized low density lipoprotein-induced foam cell lipophagy*

TAN Yanmei^{1,2}, CHEN Sanjun³, TAN Yulin¹, WU Zhi¹, MENG Guozhao¹, TAN Yanfei^{4△}

(1. School of Basic Medicine, Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423000, China; 2. Key Laboratory of Biomedical Microbiology, Xiangnan University, Chenzhou, Hunan 423000, China; 3. Department of Pain, Chenzhou First People's Hospital, Chenzhou, Hunan 423000, China; 4. Department of Endocrinology Diabetes, Chenzhou First People's Hospital, Chenzhou, Hunan 423000, China)

[Abstract] **Objective** Foam cell formation was an important part of the occurrence and development of atherosclerosis. To explore the role of perilipin2(PLIN2) in foam cell lipophagy, and to provide more ideas for the prevention and treatment of atherosclerosis-related diseases. **Methods** The foam cell model induced by oxidized low density lipoprotein(ox-LDL) was constructed, and the expression of PLIN2 gene in the cells was silenced. The cells were divided into five groups: the control group, the empty plasmid group, the ox-LDL treatment group, the siPLIN2 group, the ox-LDL+siPLIN2 group. The oil red O staining was used to observe the lipid accumulation of intracellular, and the Western blot was used to observe the expression of PLIN2 and lipophagy-related proteins LC3 and p62. **Results** During the formation of foam cells induced by ox-LDL, the expression of LC3 increased with the increase of lipid, while p62 decreased first and then increased. The expression of LC3 was down-regulated in PLIN2-silenced RAW264.7 macrophages. In PLIN2-silenced foam cells, the expression of p62 protein was significantly increased and lipophagy was weakened. **Conclusion** In ox-LDL-induced foam cells, knockdown of PLIN2 can down-regulate the expression of p62 and attenuate intracellular lipophagy.

[Key words] Lipophagy; Perilipin2; Oxidized low density lipoprotein; Foam cells

* 基金项目:湖南省教育厅科学研究项目(20C1701);湖南省卫生健康委员会立项课题(D202303067556);湘南学院校级科学研究项目(2020XJ39)。
作者简介:谭艳美(1990—),硕士研究生,助理实验师,主要从事动脉粥样硬化发病机制与防治方面的研究。△ 通信作者,E-mail: 150412891@qq.com。

脂噬是一种选择性的自噬进程,能有效识别并调控脂质代谢,选择性地将脂滴包裹在细胞溶酶体中,脂滴在溶酶体中被酸性脂肪酶降解后送至细胞外的高密度脂蛋白(HDL)中,进而促进胆固醇流出,维持脂质代谢的稳态^[1-2]。有研究发现,脂噬减弱会促进动脉粥样硬化(AS)、糖尿病等代谢性疾病的发生和发展^[3],也就是说,AS 的发生很有可能与细胞内脂噬的减弱有关。

围脂滴蛋白(perilipin2, PLIN2)是 PAT 家族中的成员之一,在 AS 发展进程中具有重要作用。有研究证明,PLIN2 也可通过激活自噬和刺激胆固醇的外流影响人类对 AS 的易感性^[4],同时在 PLIN2 缺陷的心肌细胞中,脂噬减弱引起细胞内甘油三酯蓄积^[5]。

脂质的异常蓄积是 AS 发生发展的关键环节,因此研究脂质蓄积的机制对防治 AS 具有重要意义。结合课题组前期对 PLIN2 在 AS 发生发展中的作用机制研究,本研究拟探讨 PLIN2 在氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的泡沫细胞形成过程中是否有抑制脂噬的作用,以期为 AS 的防治和机制研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 RAW264.7 巨噬细胞购自中科院上海细胞生物研究所细胞库;DMEM 高糖培养基(Gibco, 8122691);特级胎牛血清(武汉普诺赛生命科技有限公司, 164210);oxLDL(广州奕元生物技术有限公司, YB-002);油红 O (Sigma, SHBL1039);LC3A/B 兔 mAb(Cell Signaing Technology, 12741);SQSTM1/p62 抗体(Cell Signaing Technology, 5114);兔 PLIN2 的单克隆(Abcam, ab108323);GAPDH 多克隆抗体(Proteintech, 10494-1-AP);辣根过氧化物酶(HRP)-偶联亲和纯山羊抗兔 IgG(proteintech, SA00001-2);特超敏电化学发光(ECL)试剂盒(Beyotime, P0018AM);LipofectamineTM3000(Thermo Fisher, L3000001);si-musPLIN2(HonorGene)。

1.2 方法

1.2.1 泡沫细胞模型建立 取对数生长期 RAW 264.7 巨噬细胞接种于 6 孔板中,每孔含完全培养基 2 mL,加入终浓度为 100 μ g/mL 的 ox-LDL 处理 12、24、48 h,油红 O 染色观察细胞内脂质蓄积情况。

1.2.2 小干扰 RNA 的构建和转染 NCBI 基因数据库查找鼠源 PLIN2 蛋白编码区序列,设计合成小干扰 RNA,具体序列为正义链:5'-GUUCAGAAGC-CGAGCAACUAU-3';反义链 5'-AUAGUUGCUCG-GCUUCUGAAC-3'。

转染前 1 d 将细胞接种至培养板中,预计转染时

细胞汇片达到 70%~90%。转染时,按说明书先用无血清培养基稀释 LipofectamineTM3000 和 siRNA,充分混匀,再在每管已稀释的 LipofectamineTM3000 试剂中按 1:1 比例加入稀释的 siRNA,室温孵育 10~15 min,最后将 siRNA-脂质复合物加入细胞中,孵育 2~4 d,分析转染细胞。

1.2.3 分组 为研究 PLIN2 敲减后 ox-LDL 诱导的泡沫细胞内脂噬基因的变化情况,将细胞分为 5 组,分别为对照组、空质粒组、ox-LDL 处理组、siPLIN2 组和 siPLIN2+ox-LDL 处理组。

1.2.4 油红 O 染色 避光条件下配备油红 O 工作液,去离子水与油红 O 储备液比例为 2:3,混匀后用 0.2 μ m 滤膜过滤 3 次备用。将已做处理的 12 孔板取出,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,每次 10 min,每孔加入 4%多聚甲醛 1 mL 固定细胞 30 min,固定完毕, PBS 洗涤 3 次。每孔加入 1 mL 油红 O 工作液染色 30 min,显微镜下观察细胞脂滴染色情况, PBS 洗涤 3 次。每孔加入苏木素 1 mL 染核 5 s, PBS 洗涤 3 次,显微镜观察染核情况。载玻片滴适量甘油,取出孔板中盖玻片,待表面液体蒸发将其覆于甘油上,封片保存拍照。

1.2.5 Western blot 细胞裂解法提取细胞总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳后湿转至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭 2 h,稀释后的一抗(PLIN2、LC3、p62、GAPDH)孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min, HRP 标记二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,采用 ECL 试剂盒显影。

1.3 统计学处理 所有实验均经 3 次独立验证,实验所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,由 GraphPad Prism5 统计软件完成, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

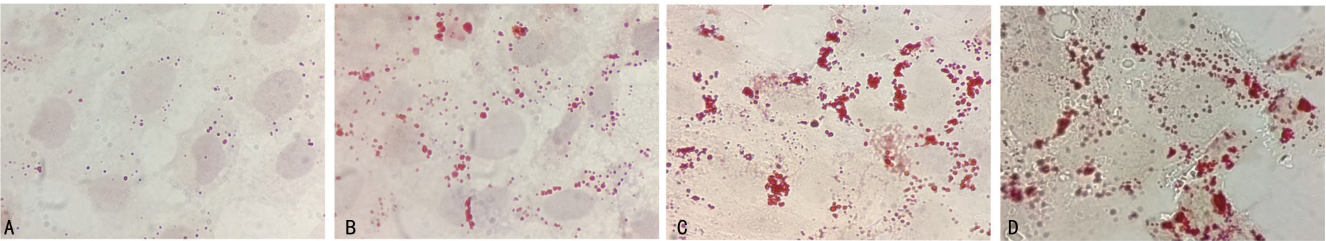
2 结果

2.1 泡沫细胞模型构建 随着 ox-LDL 处理时间延长,细胞内脂质颗粒逐渐增加,处理 12 h 脂质颗粒少量增加,处理 24 h 脂质颗粒增加明显,处理 48 h 脂质颗粒相对 24 h 时略多,但细胞形态也变得不规则,提示 ox-LDL 处理时间过长会改变细胞形态,后续泡沫细胞模型构建实验选择 100 μ g/mL 的 oxLDL 处理 24 h。见图 1。

2.2 泡沫细胞内 PLIN2 和脂噬相关基因表达情况 PLIN2 在 ox-LDL 处理的细胞内随着时间延长蛋白含量逐渐增加,48 h 增加显著。LC3 在泡沫细胞中随着脂质增加呈现递增趋势,48 h 达到高峰;而 p62 蛋白表达量与对照组相比是下降的,在 ox-LDL 处理 24 h 时降至最低,48 h 略有增加。见图 2。也就是

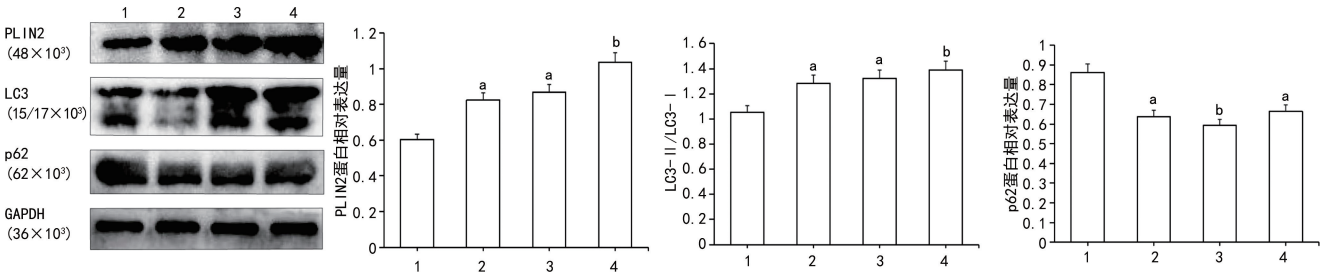
说,随着泡沫细胞内脂质的增多,PLIN2 和 LC3 在细胞内的蛋白表达量也是增加的,而 p62 则呈先下降后

增加的趋势,提示脂噬在泡沫细胞形成时随着细胞内脂质蓄积增多是先增强后减弱的。



注:A.无 ox-LDL 处理;B.ox-LDL 处理 12 h;C.ox-LDL 处理 24 h;D.ox-LDL 处理 48 h。

图 1 ox-LDL 处理巨噬细胞不同时间点细胞内脂质蓄积情况(油红 O 染色,100×)



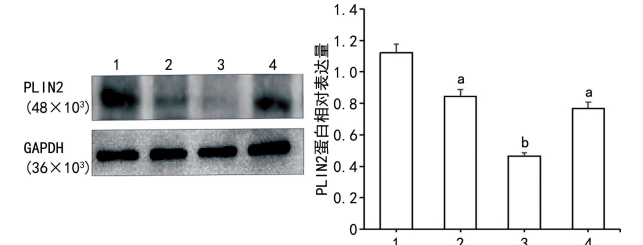
注:1 为对照组;2 为 ox-LDL 处理 12 h;3 为 ox-LDL 处理 24 h;4 为 ox-LDL 处理 48 h。与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。

图 2 在 ox-LDL 诱导的泡沫细胞中 PLIN2 和脂噬相关基因表达情况

2.3 转染 按步骤转染 siPLIN2 后 48 h 检测细胞内 PLIN2 蛋白含量,当转染浓度为 30 pmol/ μ L 时转染效率最高,达到 60%以上;当转染浓度为 20 pmol/ μ L 和 50 pmol/ μ L 时,转染效率在 50%以下,见图 3。说明转染浓度为 30 pmol/ μ L 时,PLIN2 基因在 RAW264.7 细胞内沉默效果最佳。

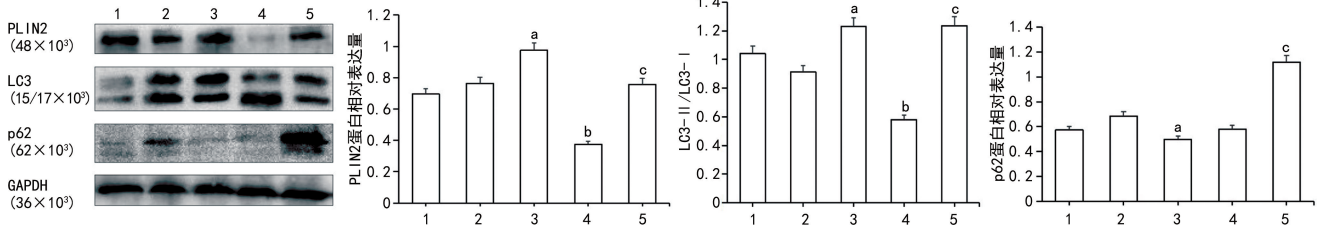
p62 的表达。

2.4 沉默 PLIN2 脂噬相关基因变化 PLIN2 基因敲除的巨噬细胞内 LC3 的蛋白表达量明显降低,但在 PLIN2 基因敲除的泡沫细胞内 LC3 并没有明显的变化。然而,p62 在 PLIN2 敲除的巨噬细胞内没有明显变化,但在 PLIN2 敲除的泡沫细胞内却有明显的升高,见图 4。说明 PLIN2 影响了泡沫细胞内脂噬基因



注:1 为对照组;2 为 20 pmol/ μ L (siPLIN2);3 为 30 pmol/ μ L (siPLIN2);4 为 50 pmol/ μ L (siPLIN2)。与对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.001$ 。

图 3 siPLIN2 转染浓度筛选



注:1 为对照组;2 为空质粒组;3 为 ox-LDL 处理组;4 为 siPLIN2 处理组;5 为 siPLIN2+ox-LDL 处理组。与对照组比较,^a $P<0.05$;与空质粒组比较,^b $P<0.05$;与 ox-LDL 处理组比较,^c $P<0.05$ 。

图 4 沉默 PLIN2 对 ox-LDL 诱导的泡沫细胞中脂噬相关基因的影响

3 讨论

近年来,自噬在 AS 发生发展中的作用得到了广泛的关注,有研究表明,促进内皮细胞自噬可延缓 AS

斑块的形成,进而治疗相关疾病^[6]。那么,脂噬作为一种特殊类型的选择性自噬,可在细胞内选择性降解脂滴维持细胞内脂质代谢平衡,而且当细胞内的脂噬

不足或过度脂噬时都会引起机体脂代谢紊乱导致疾病的发生^[7]。有文献报道,在 AS 保护作用中脂噬在巨噬细胞自噬中发挥了重要作用^[8],体内和体外选择性激活和追踪脂噬,充分了解 AS 中的脂噬机制,确定巨脂噬和微脂噬在 AS 脂代谢中的作用,发现脂噬在治疗 AS 相关疾病的治疗潜力是研究者的目的^[9]。本研究以 PLIN2 与细胞内脂质蓄积的关系为切入点,初步探讨 PLIN2 在 ox-LDL 诱导的巨噬细胞源性泡沫细胞脂噬中的作用,为发现脂噬在 AS 中的治疗潜力提供依据。

PLIN2 是 JIANG 等^[10]在 1992 年利用差别杂交筛选技术在脂肪细胞中分离提取到的一种蛋白,后来发现其与脂肪代谢密切相关,不仅促使细胞内脂质蓄积,还抑制细胞内胆固醇的外流,有学者将 PLIN2 认为是细胞内脂质蓄积的标志物^[11]。有研究表明,PLIN2 在 AS 发展进程中一方面可促进巨噬细胞内炎症反应发生;另一方面其也可加速泡沫细胞内脂质的蓄积^[12-13]。近年有文献报道,在心肌细胞中 PLIN2 缺乏会下调细胞内脂噬,从而引起心肌细胞胞内脂质蓄积^[4],说明 PLIN2 与细胞内脂噬有关,那么在 AS 的泡沫细胞脂噬中 PLIN2 是否也发挥了作用。本研究表明,在 ox-LDL 诱导的泡沫细胞中,脂噬相关蛋白 LC3 的蛋白表达量会随着胞内脂质的增加而增加,此趋势与 PLIN2 蛋白表达量变化是一致的,而脂噬相关蛋白 p62 则随着脂质的增多呈先下降后增加的趋势,与 LC3 相反,表明在 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞源性泡沫细胞形成过程中脂噬是先增强后减弱的,这与郑舒展等^[14]发现的 ox-LDL 诱导的 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞形成 24 h 内,LC3 比值升高、p62 水平降低、脂噬增强,24 h 后 LC3 比值降低、p62 水平升高、脂噬减弱存在一致性。

另外,本研究还发现,在 RAW264.7 巨噬细胞中敲除 PLIN2 后 LC3 蛋白表达量降低,提示 PLIN2 可能有影响 LC3 表达的作用。有文献提示,在 PLIN2 缺乏的心肌细胞中溶酶体和脂滴共定位减少,脂噬减弱^[4],这与本研究中 PLIN2 敲除后 LC3 蛋白表达量下降的结果一致,说明 PLIN2 有调控脂噬的作用。

同时,本研究还发现,在 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 泡沫细胞中敲除 PLIN2 后 LC3 蛋白表达量变化不明显,但 p62 蛋白表达量增加,提示 PLIN2 在泡沫细胞脂噬中有下调 p62 蛋白表达,增强脂噬的作用。而有文献报道,白藜芦醇可通过上调人脂肪变性 HHL-5 细胞的 PLIN2 表达,促进脂噬相关分子 LC3 β 和 Rab7 的表达,从而增强脂噬缓解细胞内脂质蓄积^[15],与本研究中泡沫细胞内 PLIN2 增强脂噬的

结果一致。但是,PLIN2 调节泡沫细胞内脂噬的机制尚不清楚,有待进一步研究。

综上所述,本研究证明了在 RAW264.7 巨噬细胞内 PLIN2 有调控脂噬的作用,在 ox-LDL 诱导的泡沫细胞形成过程中,脂噬随着细胞内脂质增加先增强后减弱,同时,在 PLIN2 敲除的泡沫细胞内,p62 蛋白表达量明显增加,脂噬减弱。在 AS 发生发展过程中,泡沫细胞的形成是重要的一环,若能通过增强脂噬,延缓泡沫细胞和 AS 斑块的形成速度,那么在治疗冠心病、脑血管疾病和糖尿病等 AS 相关疾病的方法和手段上便可以提供更多的可能。

参考文献

- [1] LI S, ZHAO H J, WANG Y, et al. Regulation of autophagy factors by oxidative stress and cardiac enzymes imbalance during arsenic or/and copper induced cardiotoxicity in Gallus gallus[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 148: 125-134.
- [2] ZHU S, WANG Y, CHEN W, et al. High-density lipoprotein (HDL) counter-regulates serum amyloid A (SAA)-induced sPLA2-IIe and sPLA2-V expression in macrophages[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0167468.
- [3] GARCIA E J, VEVEA J D, PON L A. Lipid droplet autophagy during energy mobilization, lipid homeostasis and protein quality control [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2018, 23(8): 1552-1563.
- [4] SALIBA-GUSTAFSSON P, PEDRELLI M, GERTOW K, et al. Subclinical atherosclerosis and its progression are modulated by PLIN2 through a feed-forward loop between LXR and autophagy[J]. *J Intern Med*, 2019, 286(6): 660-675.
- [5] MARDANI I, DALEN K T, DREVINCE C, et al. Plin2-deficiency reduces lipophagy and results in increased lipid accumulation in the heart[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6909.
- [6] HUA Y Q, ZHANG J, LIU Q Q, et al. The induction of endothelial autophagy and its role in the development of atherosclerosis [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 831847.
- [7] 谭艳美, 谭艳飞, 蒙国照, 等. 脂噬在脂代谢疾病中的调控作用[J]. *中南医学科学杂志*, 2022, 50(5): 777-780.

(下转第 3976 页)

[11] BARBIN C M, VASUDEVAN A, CHOI J W, et al. Frequency of abnormal fractional flow reserve measurements among major coronary arteries[J]. Cardiovasc Revasc Med, 2019, 20(2): 143-146.

[12] KOO B K, ERGLIS A, DOH J H, et al. Diagnosis of ischemia-causing coronary stenoses by noninvasive fractional flow reserve computed from coronary computed tomographic angiograms. Results from the prospective multi-center DISCOVER-FLOW (diagnosis of ischemia-causing stenoses obtained via noninvasive fractional flow reserve) study[J]. J Am Coll Cardiol, 2011, 58(19): 1989-1997.

[13] MIN J K, LEIPSIC J, PENCINA M J, et al. Diagnostic accuracy of fractional flow reserve from anatomic CT angiography [J]. JAMA, 2012, 308(12): 1237-1245.

[14] NØRGAARD B L, LEIPSIC J, GAUR S, et al. Diagnostic performance of noninvasive fractional flow reserve derived from coronary computed tomography angiography in suspected coronary artery disease: The NXT trial (analysis of coronary blood flow using CT angiography: Next steps) [J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63(12): 1145-1155.

[15] DOUGLAS P S, DE BRUYNE B, PONTONE G, et al. 1-year outcomes of FFRCT-guided care in patients with suspected coronary disease: The PLATFORM study [J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 68(5): 435-445.

[16] CURZEN N P, NOLAN J, ZAMAN A G, et al. Does the routine availability of CT-derived FFR influence management of patients with stable chest pain compared to CT angiography alone?: The FFR (CT) RIPCORDER study [J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2016, 9(10): 1188-1194.

[17] LIU X, MO X, ZHANG H, et al. A 2-year investigation of the impact of the computed tomography-derived fractional flow reserve calculated using a deep learning algorithm on routine decision-making for coronary artery disease management [J]. Eur Radiol, 2021, 31(9): 7039-7046.

(收稿日期: 2023-08-30 修回日期: 2023-09-20)

(上接第 3969 页)

[8] LIU Q, WANG Y M, GU H F. Lipophagy in atherosclerosis[J]. Clin Chim Acta, 2020, 511: 208-214.

[9] LAVAL T, OUIMET M. A role for lipophagy in atherosclerosis[J]. Nat Rev Cardiol, 2023, 20(7): 431-432.

[10] JIANG H P, SERRERO G. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein[J]. Proc Natl Acad Sci, 1992, 89(17): 7856-7860.

[11] STRAUB B K, GYOENGYOESI B, KOENIG M, et al. Adipophilin/perilipin-2 as a lipid droplet-specific marker for metabolically active cells and diseases associated with metabolic dysregulation [J]. Histopathology, 2013, 62(4): 617-631.

[12] TAN Y M, ZHANG H, GUO D M, et al. Adipophilin involved in lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264. 7 cell via extracellular signal-regulated kinase 1/2-peroxisome proliferator-activated receptor gamma pathway [J]. DNA Cell Biol, 2017, 36(12): 1159-1167.

[13] 刘清南, 赵晓慧, 李帅, 等. Plin2 通过 NF- κ B 通路参与 oxLDL 诱导巨噬细胞 LOX1 的表达(英文) [J/OL]. 生物化学与生物物理进展, 2023, 50(11): 2697-2708.

[14] 郑舒展, 陈茂, 杜延飞, 等. 脂自噬通过减少巨噬细胞脂质含量抑制泡沫细胞形成 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(11): 1980-1987.

[15] 杨依林, 张艳, 秦玉, 等. 白藜芦醇通过 PLIN2 调控 ATGL/CGI58 和 Rab7/LC3 β 促进肝脂质分解 [J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(7): 614-625.

(收稿日期: 2023-08-14 修回日期: 2023-10-10)