

本文引用: 张星星, 张荣, 杨丽, 等. PLIN2 通过 Rab18 上调 ACSL3 表达促进巨噬细胞脂质蓄积[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(12): 1020-1028. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.12.002.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2023)31-12-1020-09

## PLIN2 通过 Rab18 上调 ACSL3 表达促进巨噬细胞脂质蓄积

张星星<sup>1</sup>, 张荣<sup>1</sup>, 杨丽<sup>1</sup>, 刘兰<sup>2</sup>, 罗健雄<sup>2</sup>, 王语婷<sup>2</sup>, 胡博雅<sup>2</sup>, 袁中华<sup>1,2</sup>

(1. 南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室 湖南省动脉硬化性心血管疾病国际科技创新合作基地,

2. 南华大学药学院药理学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[摘要] [目的] 探讨脂滴包被蛋白 2(PLIN2)增加巨噬细胞内脂质蓄积的机制。[方法] 将实验分为氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)组、不同 PLIN2 表达组、不同活性 Rab18 组,测定高表达和沉默表达 PLIN2 巨噬细胞中的 Rab18 和脂酰辅酶 A 长链合成酶 3(ACSL3)蛋白水平,不同活性 Rab18 的高表达 PLIN2 巨噬细胞中的 PLIN2、Rab18、ACSL3 蛋白表达水平。采用 Western blot 检测蛋白表达水平,采用免疫荧光观察细胞内相关蛋白定位情况,采用油红 O 染色观察细胞内脂质蓄积情况。[结果] 高表达 PLIN2 的细胞中 Rab18、ACSL3 表达水平明显增加( $P<0.05$ ),且 PLIN2 与 Rab18、ACSL3 在细胞内存在共定位的现象。转染 Rab18 显性突变体 Q67L 质粒(Rab18 活性增强)后的 PLIN2 高表达巨噬细胞中 ACSL3 表达水平明显升高( $P<0.05$ ),细胞内脂滴的数量也明显增多( $P<0.05$ )。[结论] PLIN2 可通过 Rab18 上调 ACSL3 表达促进巨噬细胞脂质蓄积。

[关键词] 脂滴包被蛋白 2; Rab18; 脂酰辅酶 A 长链合成酶 3; 脂质蓄积

[中图分类号] R5;R363

[文献标识码] A

### PLIN2 promotes lipid accumulation in macrophages by up-regulating ACSL3 expression through Rab18

ZHANG Xingxing<sup>1</sup>, ZHANG Rong<sup>1</sup>, YANG Li<sup>1</sup>, LIU Lan<sup>2</sup>, LUO Jianxiong<sup>2</sup>, WANG Yuting<sup>2</sup>, HU Boya<sup>2</sup>, YUAN Zhonghua<sup>1,2</sup>

(1. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory of Arterial Hard Chemistry of Hunan Province & Hunan Province Arteriosclerotic Disease International Scientific and Technological Innovation Cooperation Base,

2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanism of perilipin 2 (PLIN2) increasing lipid accumulation in macrophages. **Methods** The experiments were divided into oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) group, different PLIN2 expression groups, and different activity Rab18 groups, the levels of Rab18 and acyl-CoA long chain synthetase 3 (ACSL3) protein in high expression and silent expression of PLIN2 macrophages were measured, and the levels of PLIN2, Rab18, and ACSL3 protein expression in high expression PLIN2 macrophages with different activity Rab18 were measured. Western blot was used to detect protein expression levels, immunofluorescence was used to observe the localization of intracellular related proteins, and oil red O staining was used to observe intracellular lipid accumulation. **Results** The expression levels of Rab18 and ACSL3 in cells with high expression of PLIN2 were increased significantly ( $P<0.05$ ), and there was an intracellular phenomenon of co-localization of PLIN2 with Rab18 and ACSL3. The expression level of ACSL3 in high expression macrophages of PLIN2 after transfection with the Rab18 dominant mutant Q67L plasmid (Rab18 activity increased) was increased significantly ( $P<0.05$ ), and the number of intracellular lipid droplets was also increased significantly ( $P<0.05$ ). **Conclusion** PLIN2 promotes macrophage lipid accumulation through Rab18 by up-regulating ACSL3.

[KEY WORDS] perilipin 2; Rab18; acyl-CoA long chain synthetase 3; lipid accumulation

[收稿日期] 2023-04-28

[修回日期] 2023-06-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81973326);湖南省教育厅科学研究项目(21C0283;21C0290)

[作者简介] 张星星,硕士,研究方向为动脉粥样硬化与心肌缺血损伤病因发病学与防治研究,E-mail:1186509580@qq.com。通信作者袁中华,博士,教授,研究方向为动脉粥样硬化与心肌缺血损伤病因发病学与防治研究,E-mail:yzh5555@163.com。

动脉粥样硬化是以脂质代谢紊乱和炎性病变为特征的病理过程,以动脉粥样硬化为主要病理基础的心血管疾病在全球的致残、致死率一直较高,严重威胁着人们的身心健康。因此,阐明动脉粥样硬化发生发展的分子机制极其重要,其中脂质摄取与代谢水平的异常是其重要的分子机制之一。有研究表明,巨噬细胞来源的泡沫细胞在动脉粥样硬化的形成与发展中起主要作用<sup>[1]</sup>。

脂滴由中性脂核组成,外周包裹着一层磷脂单层,其中含有大量对脂滴水解或合成至关重要的蛋白质,称为脂滴包被蛋白(perilipin, PLIN)。PLIN2 是 PAT 家族成员之一,是在 1246 细胞株的 cDNA 文库中发现,是非脂肪组织中含量最多的 PLIN,广泛分布于哺乳动物细胞的脂滴上<sup>[2-3]</sup>。

近年来,对 PAT 家族与脂质代谢相关疾病之间的关系研究逐渐深入。Ozeki 等<sup>[4]</sup>发现胞内 Rab18 与 PLIN2 在脂滴中共存,两种脂滴蛋白有可能存在相互作用。Rab18 是脂滴相关蛋白,是脂滴动力学的重要调节因子,其缺乏会导致脂滴生长和成熟缺陷。PLIN2 表达降低时 Rab18 表达减弱,细胞内脂滴数量逐渐减少,因此 PLIN2 可能是 Rab18 的一个上游调节基因。有研究通过质谱分析发现 Rab18 和脂酰辅酶 A 长链合成酶 3 (acyl-CoA long chain synthetase 3, ACSL3) 可能是有相互作用关系的两种蛋白,并且两者都定位于脂滴,Rab18 参与脂滴动态调节、脂质代谢和内质网膜转运,ACSL3 参与多种脂质代谢过程<sup>[5-6]</sup>。ACSL3 能促进脂滴的合成,增加细胞内脂滴含量。在脂滴的形成过程中,Rab18 激活并定位到脂滴同时和 ACSL3 形成复合物,Rab18 KO 细胞中脂滴部分的 ACSL3 含量降低,提示 Rab18 可能调控 ACSL3 的表达。因此,本研究主要通过构建高表达和沉默表达 PLIN2 巨噬细胞,采用 Western blot 和免疫荧光实验说明 PLIN2 对 Rab18 和 ACSL3 有促进作用,然后构建不同活性的 Rab18 分别加入高表达 PLIN2 巨噬细胞中,通过 qRT-PCR、Western blot 和油红 O 染色说明 PLIN2 通过 Rab18 上调 ACSL3 表达促进巨噬细胞脂质蓄积。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

THP-1 细胞购自上海生物科学研究院细胞库;胎牛血清购自 Biological Industries 公司;RPMI-1640 培养基购自 Hyclone 公司;Lipo6000<sup>TM</sup> 转染试剂购

自上海碧云天生物科技公司;pQCXIP 反转录病毒载体质粒购自 Invitrogen (美国)公司;鼠抗/兔抗 PLIN2、鼠抗 Rab18 一抗、鼠抗 GAPDH 一抗及山羊抗鼠 IgG 二抗购自 Proteintech (中国)公司;其他试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.2 细胞培养

在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养 THP-1 细胞,视细胞生长状态换液,细胞贴壁率约 75% 时传代。

### 1.3 质粒的提取与鉴定

从 -80 °C 冰箱取出含 pQCXIP、pQCXIP-HA-PLIN2、pSuper-retro-PLIN2 siRNA 及 pSuper-retro-scramble siRNA 反转录病毒载体质粒的菌液,接种环蘸取菌液进行等量一致划线,37 °C 温箱培养过夜。任意挑取 3 个阳性单菌群分别接种于有氨苄青霉素的 LB 液体培养基。采用酶切技术进行质粒性质检验,利用紫外分光光度计测定吸光度值。

取出冻存的 3 种不同活性 Rab18 (WT 型、Q67L 型、S22N 型)慢病毒载体甘油菌,用接种环各蘸取 3 种菌液进行划线。挑选 3 个培养水平良好的单个菌群,用 10 μL 无菌 Tip 吸头挑起单个菌落,分别放入 3 个液体培养基试管内。通过紫外分光光度计测定吸光度值,经酶切技术的方法检测质粒性质。

### 1.4 细胞处理

选取对数生长期良好的 THP-1 细胞,在细胞超净台中加入 0.3 kg/L 丙二醇甲醚醋酸酯(2-acetoxy-1-methoxypropane, PGMEA),置于细胞培养箱孵育 24 ~ 48 h,使其从悬浮细胞诱导成为贴壁巨噬细胞,加入细胞培养基,置于细胞培养箱备用。转染 pQCXIP-HA-PLIN2 及 pSuper-retro-PLIN2 siRNA 入 PA317 细胞,收集重组反转录病毒,再进行细胞感染,确定嘌呤霉素筛选浓度,用病毒感染细胞,再将提取的 3 种不同活性的 Rab18 质粒转染至细胞中。采用 Western blot 检测 PLIN2、Rab18 及 ACSL3 的蛋白表达,采用油红 O 染色检测细胞内脂质蓄积情况。

### 1.5 氧化型低密度脂蛋白处理

用 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)孵育细胞 24 h,提取细胞总蛋白,采用 Western blot 检测 PLIN2、Rab18 及 ACSL3 蛋白表达,采用油红 O 染色检测细胞内脂质蓄积情况。

### 1.6 Western blot 检测

苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)和裂解液处理细胞后,离心(4 °C, 12 000 r/min,

10 min),加上样缓冲液混匀,煮沸(100 °C, 10 min)变性,冰上冷却,提取总蛋白。使用 BCA 试剂盒定量。制备 10% 分离胶和 5% 浓缩胶,蛋白经 SDS-PAGE 分离后转移至 PDVF 膜上,转膜结束后用脱脂牛奶封闭,再分别加入相应一抗,摇床震荡孵育 6~8 h(4 °C 过夜),加入对应的二抗,摇床摇动孵育 1.5 h(室温),TBST 洗 PVDF 膜 3 次,显影。

### 1.7 免疫共沉淀

配制蛋白样品,取 0.5 g 蛋白样品加 1 µg 纯化后的抗体吹打混合均匀,置于 4 °C 低速摇床过夜,制备抗原抗体复合物。于 1.5 mL 离心管中加 30 µL 混合均匀的 Protein A+G 琼脂糖,掌型离心机短时间离心并轻轻吸出上层液体;加 500 µL PBS 洗涤 Protein A+G 琼脂糖,离心机短时间离心并缓慢吸出上清液;此步骤重复 2 次。清洗完毕的 Protein A+G 琼脂糖加入已制备的抗原抗体复合物,于 4 °C 孵育 2 h,短时间离心,缓慢吸出上层液体;再加入 PBS 清洗 2 次(方法同上)。上述步骤所得的沉淀加入 30 µL 2×SDS-PAGE 电泳蛋白上样缓冲液,混合均匀后短时间离心,将蛋白样品沉入到管底部;将蛋白用于干式恒温锅煮沸 5 min,短时间离心并取出上层液体,采用 Western blot 进行检测。

### 1.8 油红 O 染色

避光下配制油红 O 工作液,4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,PBS 洗涤 3 次,每次 10 min;将油红 O 染色液加入 24 孔板中,每孔至少 1 000 µL,观察到细胞出现明显的颗粒状物体后吸出染液,PBS 再洗涤 3 次,每次 10 min;30 min 后显微镜下观察细胞脂质染色情况,PBS 洗涤 3 次(每次 10 min),再用苏木精染核 5 s,最后用 PBS 洗涤 3 次。封片后在显微镜下拍片并保存。

### 1.9 细胞免疫荧光

用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,PBS 清洗 3 次;用 0.1% Triton X-100(每孔 1 000 µL)处理 24 孔板中的细胞 20 min,PBS 清洗 3 次,每次 8 min;制备适量封闭液,加入孔板中封闭 1 h 后孵育对应的一抗(4 °C 过夜),PBS 清洗 3 次,每次 7 min;二抗孵育(常温),PBS 清洗 3 次,每次 8 min;使用 10 mg/L DAPI 加入孔板内染核 5~10 min,PBS 清洗 3 次,每次 8 min;使用抗荧光淬灭剂进行封片,避光,在荧光显微镜下拍摄并保存。

### 1.10 qRT-PCR 检测

qRT-PCR 提取各组细胞中的总 RNA,去除混合的 DNA 和 DNA 酶,使用 Fast King RT-PCR 合成试剂盒从总 RNA 合成第一链 cDNA。按照说明书进

行循环,反应程序:95 °C 预变性 15 min;95 °C 变性 10 s,55 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环。以 GAPDH 为内参照,通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 mRNA 的相对表达量。

### 1.11 统计学分析

利用 Graph Pad Prism 8.0、Image-Pro Plus 及 SPSS 软件统计并分析所得数据,然后作出图形。实验所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较使用 *t* 检验,多组间比较使用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ox-LDL 对巨噬细胞 PLIN2、Rab18 及 ACSL3 蛋白表达的影响

将巨噬细胞分为对照组和 ox-LDL 组,采用 Western blot 检测 PLIN2、Rab18 及 ACSL3 的表达。结果发现,ox-LDL 组 PLIN2 蛋白的表达增加 103.5%,Rab18 蛋白的表达增加 125.7%,ACSL3 蛋白的表达增加 128.3%,与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;图 1)。

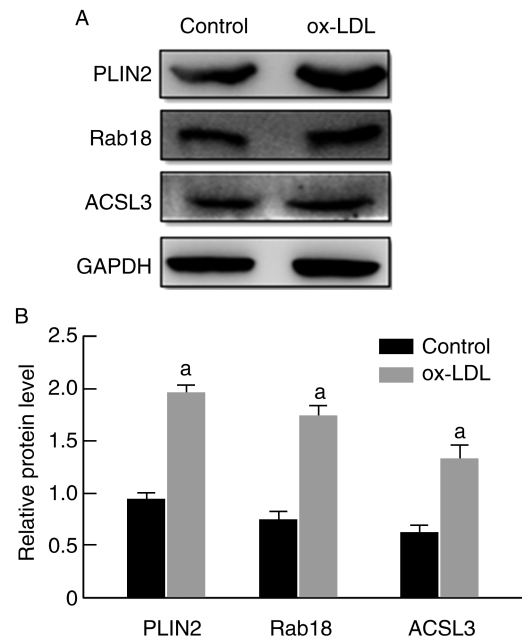


图 1. ox-LDL 对巨噬细胞 PLIN2、Rab18 及 ACSL3 蛋白表达的影响( $n=3$ )

50 mg/L ox-LDL 孵育巨噬细胞 24 h,Western blot 检测 PLIN2、Rab18 及 ACSL3 蛋白表达(A),并利用 Image-Pro Plus 对蛋白条带进行灰度值分析(B)。a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较。

Figure 1. Effect of ox-LDL on the expression of PLIN2, Rab18 and ACSL3 proteins in macrophages( $n=3$ )

## 2.2 荷脂巨噬细胞 PLIN2、Rab18 及 ACSL3 之间的结合情况

采用免疫共沉淀技术进一步检测荷脂巨噬细胞中 PLIN2、Rab18 及 ACSL3 的结合情况。沉淀下来的蛋白经变性分离后进行 Western blot 检测,由 Flag-PLIN2 迁移的蛋白沉淀中检测出 Rab18 和 ACSL3(图 2A),由 Flag-Rab18 迁移的蛋白沉淀中检测出 PLIN2 和 ACSL3(图 2B),表明在荷脂巨噬细胞中 PLIN2 与 Rab18、Rab18 与 ACSL3 相互结合。通过免疫荧光法进一步验证 PLIN2 与 Rab18、Rab18

与 ACSL3 的定位情况,对细胞核和目的蛋白分别进行标记染色,细胞核标记为蓝色,图 3A、3B 中 PLIN2 标记为红色,Rab18、ACSL3 标记为绿色,图 3C 实验中 Rab18 标记为红色,ACSL3 标记为绿色。结果显示,PLIN2 与 Rab18、Rab18 与 ACSL3 荧光标记颜色重合为黄色,表明在巨噬细胞中 PLIN2 与 Rab18、Rab18 与 ACSL3 位置相同,也进一步证明了 PLIN2 与 Rab18、Rab18 与 ACSL3 在细胞内互相结合。

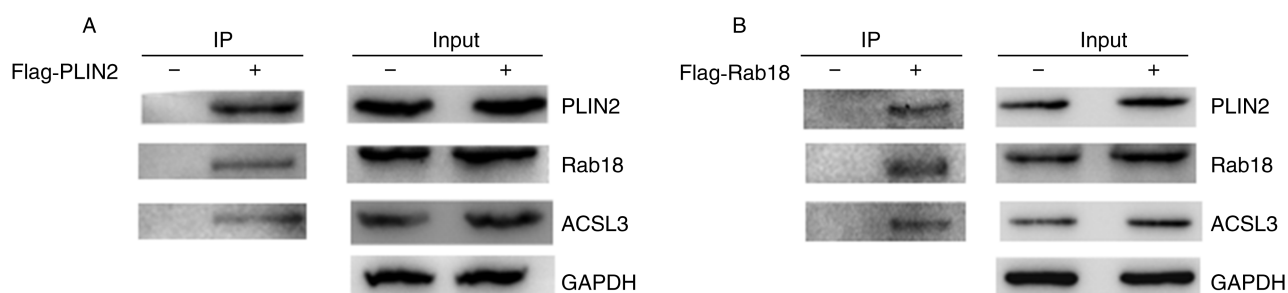


图 2. 荷脂巨噬细胞 PLIN2、Rab18 和 ACSL3 之间的结合情况

50 mg/L ox-LDL 处理巨噬细胞 24 h 后,Western blot 检测 Flag-PLIN2 迁移的蛋白沉淀中 Rab18 和 ACSL3 的表达(A)以及 Flag-Rab18 迁移的蛋白沉淀中 PLIN2 和 ACSL3 的表达(B)。

Figure 2. Binding between PLIN2, Rab18 and ACSL3 in lipid loading macrophages

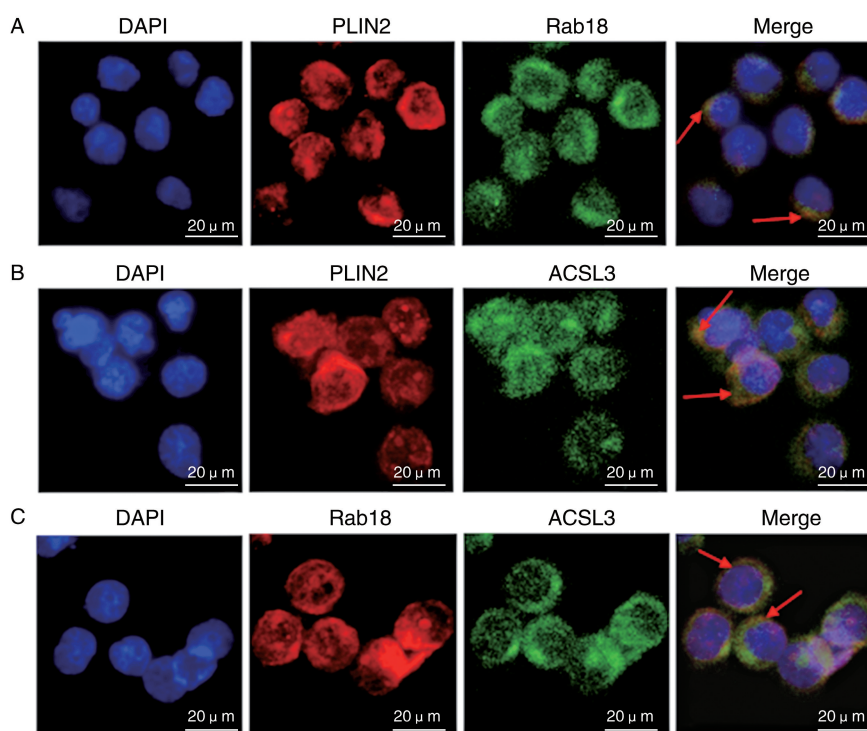


图 3. PLIN2、Rab18 及 ACSL3 之间的定位情况

50 mg/L ox-LDL 处理巨噬细胞 24 h 后,采用免疫荧光检测 PLIN2 与 Rab18 的定位(A)、PLIN2 与 ACSL3 的定位(B)以及 Rab18 与 ACSL3 的定位(C)。

Figure 3. Localization between PLIN2, Rab18 and ACSL3

### 2.3 PLIN2 对荷脂巨噬细胞 Rab18 和 ACSL3 表达的影响

为了探索 PLIN2 对荷脂巨噬细胞中 Rab18 和 ACSL3 的影响,制备 PLIN2 高表达细胞和 PLIN2 沉默表达细胞,采用 Western blot 检测 PLIN2、Rab18 及 ACSL3 的表达。结果发现,HA-PLIN2 组 PLIN2

蛋白表达水平升高 121.9%, siRNA-PLIN2 组 PLIN2 蛋白表达水平降低 67.2%,提示病毒感染有效。HA-PLIN2 组 Rab18 和 ACSL3 的表达显著增加, siRNA-PLIN2 组 Rab18 和 ACSL3 的表达显著降低。说明 PLIN2 对 Rab18 和 ACSL3 的表达有促进作用(图 4)。

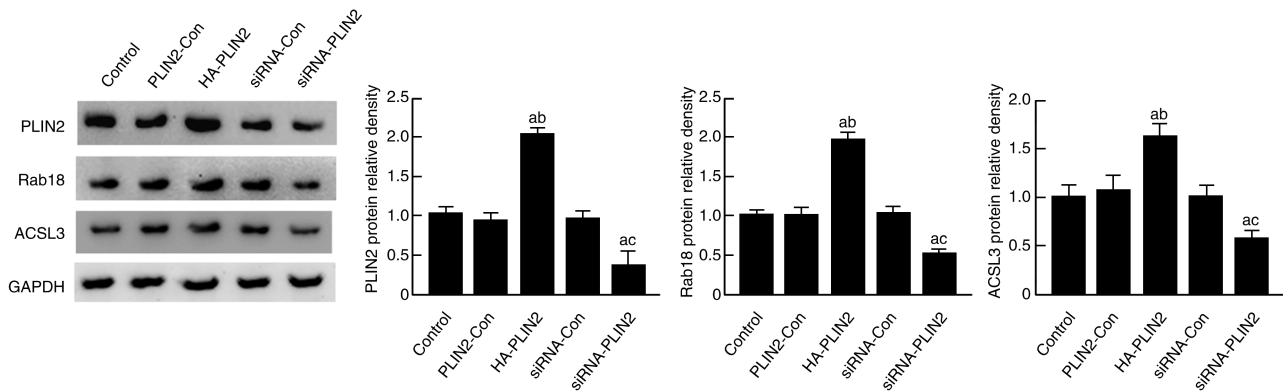


图 4. PLIN2 对 Rab18 和 ACSL3 表达的影响 ( $n=3$ )

巨噬细胞分别转染 pQCXIP、pQCXIP-HA-PLIN2、pSuper-retro-scramble siRNA、pSuper-retro-PLIN2 siRNA,再加入 ox-LDL 孵育 24 h, Western blot 检测各组中 PLIN2、Rab18 及 ACSL3 蛋白表达情况(A),利用 Image-Pro Plus 对条带中 PLIN2(B)、Rab18(C)及 ACSL3(D)的表达进行灰度值分析。a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与 PLIN2-Con 组比较;c 为  $P<0.05$ ,与 siRNA-Con 组比较。

Figure 4. The effect of PLIN2 on the expression of Rab18 and ACSL3 ( $n=3$ )

### 2.4 PLIN2 高表达时 PLIN2、Rab18 及 ACSL3 之间的作用关系

用免疫共沉淀法进一步检测 PLIN2 高表达时 PLIN2、Rab18 及 ACSL3 之间的作用关系,结果发现,由 Flag-PLIN2 迁移的蛋白沉淀中可检测到 Rab18 和 ACSL3(图 5A),由 Flag-Rab18 迁移的蛋白沉淀中可检测到 PLIN2 和 ACSL3(图 5B)。说明在 PLIN2 高表达荷脂巨噬细胞中 PLIN2 与 Rab18、Rab18 与 ACSL3 均存在相互作用的关系。将细胞

核和目的蛋白进行标记染色,细胞核标记蓝色,在图 6A 中,PLIN2 标记为绿色,Rab18 标记为红色;在图 6B 中,PLIN2 标记为红色,ACSL3 标记为绿色。结果显示,HA-PLIN2 组 Rab18 与 ACSL3 发光程度明显增加,证实了 PLIN2 可促进 Rab18 与 ACSL3 的表达。PLIN2 与 Rab18、PLIN2 与 ACSL3 荧光标记重合为黄色,也进一步验证了 PLIN2、Rab18 及 ACSL3 之间存在互相作用的关系。

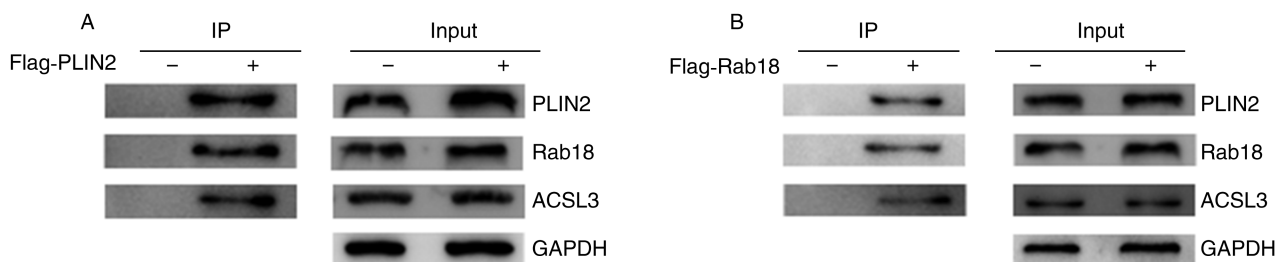


图 5. PLIN2 高表达时 PLIN2、Rab18 和 ACSL3 之间的作用关系

巨噬细胞转染 pQCXIP-HA-PLIN2,再加入 ox-LDL 孵育 24 h,采用 Western blot 检测由 Flag-PLIN2 迁移的蛋白沉淀中 Rab18 和 ACSL3 的表达(A)、由 Flag-Rab18 迁移的蛋白沉淀中 PLIN2 和 ACSL3 的表达(B)。

Figure 5. The relationship between PLIN2, Rab18 and ACSL3 during high expression of PLIN2

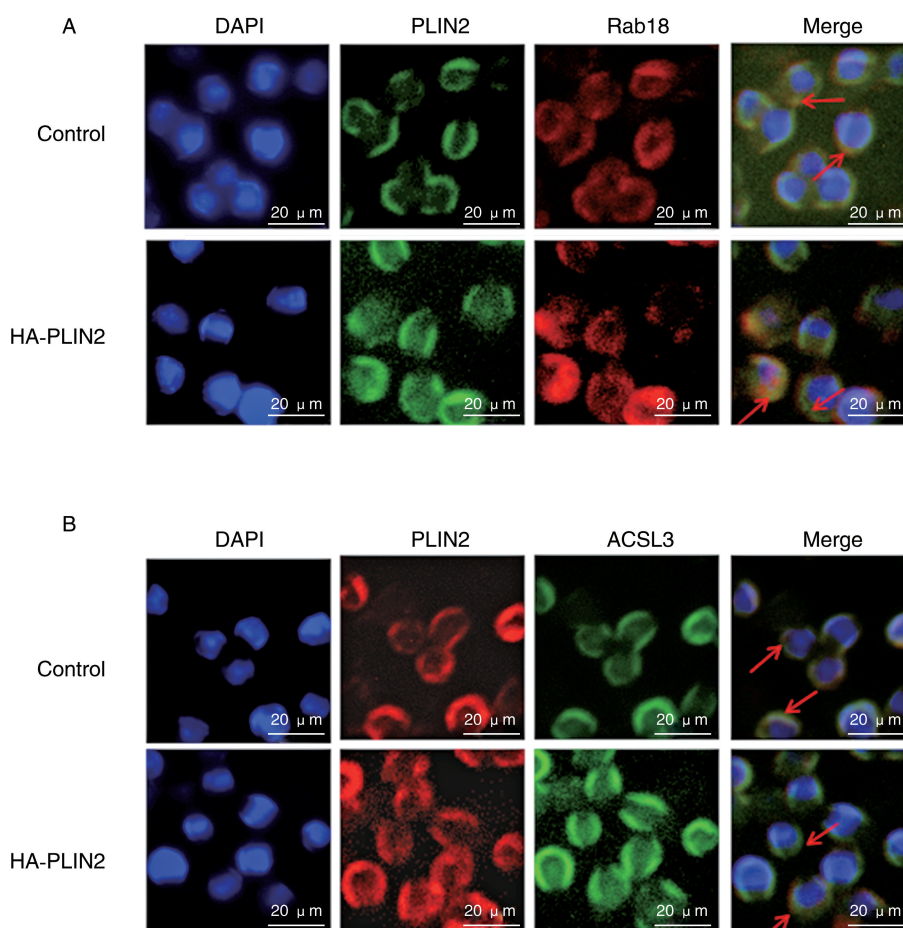


图 6. PLIN2 高表达时 PLIN2、Rab18 及 ACSL3 之间的定位情况

50 mg/L ox-LDL 处理巨噬细胞 24 h 后,采用免疫荧光检测 PLIN2 与 Rab18 的定位(A)、PLIN2 与 ACSL3 的定位(B)。

Figure 6. Localization between PLIN2, Rab18 and ACSL3 during high expression of PLIN2

### 2.5 不同活性 Rab18 对 PLIN2 高表达荷脂巨噬细胞内 ACSL3 蛋白表达的影响

研究 PLIN2 是否通过 Rab18 促进 ACSL3 蛋白的表达,将细胞分为四组:对照组、Rab18 低活性(LA)组、Rab18 野生型(WT)组、Rab18 高活性(HA)组。用 ox-LDL 孵育 24 h 后采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测各组细胞的转染情况。结果发现,与对照组相比,Rab18(HA)组 Rab18(Q67L)、Rab18(WT)组 Rab18(WT)和 Rab18(LA)组 Rab18(S22N)的 mRNA 表达均增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;图 7)。Western blot 结果显示,与对照组相比,Rab18(LA)组 Rab18 的表达量升高 80.3%,Rab18(WT)组 Rab18 的表达量升高 93.8%,Rab18(HA)组 Rab18 的表达量升高 129.2%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),证明三种质粒转染成功。各转染组间 PLIN2 的表达量无明显差异,提示 Rab18 可能

是 PLIN2 的下游基因。Rab18(HA)组与 Rab18(WT)组相比 ACSL3 的表达量增加( $P < 0.05$ ),Rab18(LA)组与 Rab18(WT)组相比 ACSL3 的表达量减少( $P < 0.05$ ;图 8)。以上结果提示 Rab18 对 ACSL3 蛋白表达有促进作用。

### 2.6 不同活性 Rab18 对 PLIN2 高表达荷脂巨噬细胞内脂质蓄积水平的影响

研究 PLIN2 是否可以通过 Rab18 上调 ACSL3 的表达从而促进脂质蓄积,实验分为四组:对照组、Rab18(WT)组、Rab18(HA)组和 Rab18(LA)组。结果发现,与对照组相比,Rab18(LA)组中脂质蓄积水平无明显变化,Rab18(WT)组和 Rab18(HA)组脂质蓄积水平明显上升,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;图 9),再次验证了 Rab18 是通过其活性来发挥生物学作用。提示 PLIN2 通过 Rab18 上调 ACSL3 从而促进巨噬细胞内脂质蓄积。

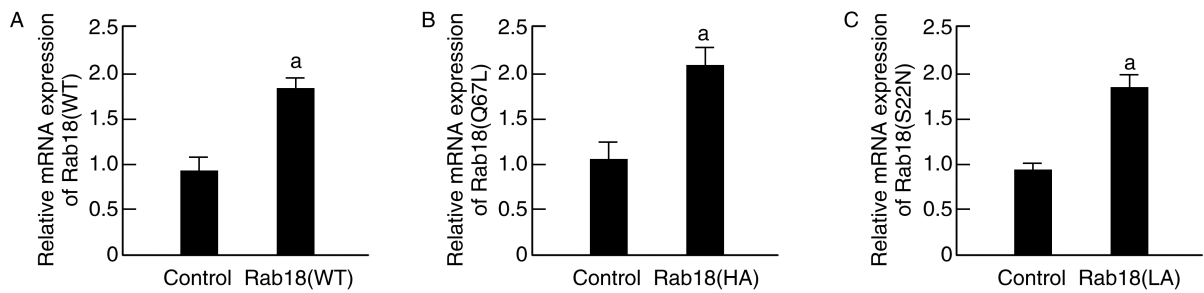


图 7. 转染 Rab18 不同载体的细胞 Rab18 (Q67L)、Rab18 (WT)、Rab18 (S22N) mRNA 的表达 ( $n=3$ )

转染 Rab18 不同载体的 PLIN2 高表达巨噬细胞,再加入 ox-LDL 孵育 24 h,用 qRT-PCR 测量 Rab18 (WT) mRNA (A)、Rab18 (Q67L) mRNA (B)、Rab18 (S22N) mRNA (C) 的表达水平。a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较。

Figure 7. The mRNA expression of Rab18 (Q67L), Rab18 (WT) and Rab18 (S22N) in cells transfected with different vectors of Rab18 ( $n=3$ )

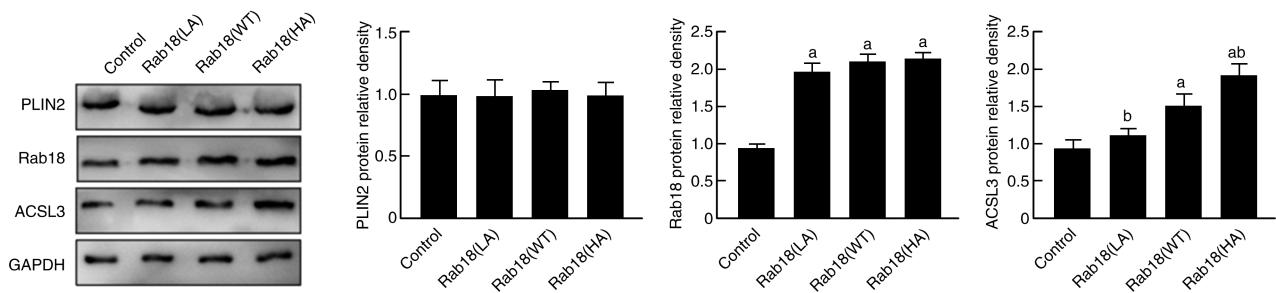


图 8. 不同活性 Rab18 对 ACSL3 蛋白表达的影响 ( $n=3$ )

分别把 3 种 Rab18 载体转染入 PLIN2 高表达巨噬细胞,再加入 ox-LDL 孵育 24 h,采用 Western blot 检测 ACSL3 蛋白表达水平 (A),利用 Image-Pro Plus 对条带中 PLIN2 (B)、Rab18 (C) 及 ACSL3 (D) 的表达进行灰度值分析。

a 为  $P<0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.05$ ,与 Rab18 (WT) 组比较。

Figure 8. Effect of Rab18 with different activity on ACSL3 protein expression ( $n=3$ )

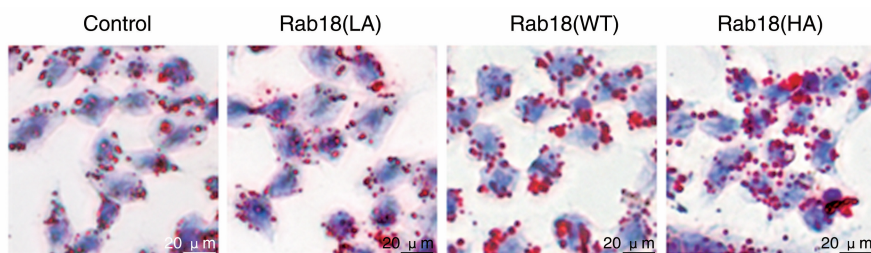


图 9. 不同活性 Rab18 对 PLIN2 高表达巨噬细胞内脂质蓄积水平的影响

Figure 9. Effect of Rab18 with different activity on lipid accumulation level in macrophages with high expression of PLIN2

### 3 讨论

动脉粥样硬化是冠心病、脑梗死等疾病的主要发病原因之一,对人类健康有极其严重的危害。脂滴是一种多功能、高度连接的细胞器,在细胞代谢和内环境稳定中发挥着核心作用,且脂滴表层有多种脂滴相关蛋白<sup>[7]</sup>。在多种脂滴相关蛋白中,PLIN2 的表达量较为丰富。PLIN2 是一种脂肪细胞

分化相关蛋白,在脂肪细胞分化的极早期高度表达<sup>[8-9]</sup>。PLIN2 能够促进细胞脂滴生成、维持脂滴形态及加重动脉粥样硬化<sup>[10-11]</sup>。因此,阐明 PLIN2 表达的机制,对动脉粥样硬化的发生发展具有重要意义。小 GTP 结合蛋白 Rab18 是位于脂滴表面的 PLIN,能参与调节脂质代谢和脂滴形成<sup>[12]</sup>,与以动脉粥样硬化为病理基础的心血管疾病密切相关<sup>[13]</sup>。ACSL3 是脂滴相关蛋白中的一种,敲低 ACSL3 可显

著降低细胞中甘油三酯含量<sup>[14-15]</sup>。有研究表明,小鼠成肌细胞中 PLIN2、Rab18 和 ACSL3 在内质网和脂滴上有双重定位,Rab18 在小鼠成肌细胞的脂滴生物发生和生长过程中从内质网募集到脂滴,且 Rab18 的脂滴靶向性是通过与 PLIN2 相互作用而增强的,脂滴相关的 Rab18 加强了脂滴对 ACSL3 的靶向作用,从而促进脂肪酸和甘油三酯转化<sup>[5]</sup>。并且在脂滴最初形成时能够从内质网转位到脂滴上<sup>[16-17]</sup>。由此猜测在巨噬细胞中 PLIN2、Rab18 与 ACSL3 之间也可能存在相互作用。

本研究中,使用 50 mg/L ox-LDL 孵育巨噬细胞 24 h,构建荷脂细胞模型。Western blot 检测到孵育 24 h 后细胞内 PLIN2、Rab18 和 ACSL3 蛋白的表达水平显著升高;通过油红 O 染色观察到孵育 24 h 后细胞内脂滴数量明显增多。大量文献报道,在细胞的脂质过度摄取途径中,PLIN2 的蛋白水平上调,说明可能是 PLIN2 增加了脂滴内胆固醇酯和甘油三酯的合成<sup>[18]</sup>。研究表明,在任何状态下 PLIN2 均与脂质蓄积水平呈正相关<sup>[19]</sup>。Rab18 蛋白的表达水平随着巨噬细胞中脂滴数量的增加而增加。同样,巨噬细胞中 ACSL3 的蛋白表达量也随细胞内脂质水平增加而增加。

Rab18 与 PLIN2 共定位于脂滴上,在脂滴的形成过程中 PLIN2 比 Rab18 更早检测到<sup>[4]</sup>。本研究发现,在细胞荷脂的过程中,PLIN2、Rab18 与 ACSL3 的表达均增加,为了检测荷脂的 THP-1 细胞中两种蛋白是否相互结合,利用免疫共沉淀技术进行检测,结果显示 THP-1 细胞荷脂过程中 PLIN2 与 Rab18、Rab18 与 ACSL3 存在结合的关系。此外,利用免疫荧光技术进一步验证 PLIN2 与 Rab18、Rab18 与 ACSL3 存在共定位,证明 PLIN2、Rab18 与 ACSL3 三种蛋白可能相互影响。

本研究使用反转录病毒载体转染法建立过表达和沉默表达 PLIN2 的 THP-1 细胞,随后进行 ox-LDL 孵育,观察 Rab18 和 ACSL3 的蛋白表达水平。Western blot 结果显示,当过表达 PLIN2 时,荷脂巨噬细胞内 Rab18 和 ACSL3 的蛋白表达量显著上调;免疫荧光检测验证了 PLIN2 高表达巨噬细胞中 PLIN2 与 Rab18、Rab18 与 ACSL3 存在共定位;利用免疫共沉淀法观察到 PLIN2 高表达巨噬细胞中 PLIN2 与 Rab18、Rab18 与 ACSL3 依然存在相互作用的关系。综上,推测 PLIN2 可能通过 Rab18 调节 ACSL3 的表达。

Rab18 的分子开关可调节 Rab18,使 Rab18 在

活化或失活状态下互相转变<sup>[20]</sup>。因为细胞内 Rab18 是通过转变不同形式来发挥生物学功能,所以参考文献<sup>[21]</sup>,将 Rab18 (WT)、Rab18 (Q67L) 和 Rab18 (S22N) 质粒分别转染入 PLIN2 高表达巨噬细胞中,制备野生型、高活性和低活性 Rab18 的 PLIN2 过表达巨噬细胞来观察不同活性 Rab18 在 PLIN2 高表达巨噬细胞中对 ACSL3 表达水平及脂质蓄积的影响。与对照组相比,不同活性 Rab18 细胞中 Rab18 mRNA 的表达均明显上调,说明各活性 Rab18 细胞制备成功。不同活性 Rab18 细胞组间 Rab18 蛋白的表达量无统计学意义,表明不同活性 Rab18 所发挥的作用与其蛋白表达水平相关性不大,而与其自身生物学功能息息相关,这也与文献<sup>[21]</sup>的实验结果相一致。但与 Rab18 (WT) 组相比,Rab18 (LA) 组 ACSL3 的表达明显下调、细胞内脂滴数量明显减少,而 Rab18 (HA) 组 ACSL3 的表达明显上调、细胞内脂滴数量明显增加。细胞内脂滴数量的变化与 ACSL3 蛋白表达量的变化一致。由此说明,PLIN2 通过活化的 Rab18 作用于脂滴,进而调节脂质代谢。

另有研究报道,PLIN2 和 Rab18 定位于不同类型的脂滴,Rab18 蛋白过表达后降低了 HepG2 细胞中 PLIN2 蛋白的数量,差异可以归因于不同的细胞类型<sup>[22]</sup>。由于人体动脉组织的特殊性,而大动物模型具有价格昂贵与模型诱导周期长的缺点,目前大多数的研究仍然依赖于小动物模型,这对动脉粥样硬化的基础研究造成了一定困难。同时,小动物模型具有斑块位置、性质、特征与人体的不一致性,模型诱导的周期与人类动脉粥样硬化形成时间的差异性,疾病模型单一与临床机体的复杂性之间的矛盾等,导致了动物实验中的结论在运用到人类疾病研究中需慎重<sup>[23]</sup>。

综上所述,本研究证实,在巨噬细胞中 PLIN2 可通过 Rab18 上调 ACSL3 表达进而增加细胞内脂质蓄积。PLIN2、Rab18 和 ACSL3 均是脂滴相关蛋白并在细胞内脂质调节过程中起关键作用,其调节细胞内脂质蓄积的机制对减少脂滴的形成及蓄积,抑制巨噬细胞源性泡沫细胞形成,进而减缓动脉粥样硬化发生具有重要意义。

#### [参考文献]

- [1] ZIRLIK A, GRUBER E J, AYGUN A Y, et al. Macrophage uptake of oxidized and acetylated low-density lipoproteins and generation of reactive oxygen species are regulated by linear stiffness of the growth surface[J]. PLoS One, 2021,

- 16(12): e0260756.
- [2] TIAN S, LEI P, TENG C, et al. Targeting PLIN2/PLIN5-PPAR $\gamma$ : sulforaphane disturbs the maturation of lipid droplets[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63(20): e1900183.
- [3] 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 U S A*, 1992, 89(17): 7856-7860.
- [4] OZEKI S, CHENG J, TAUCHI-SATO K, et al. Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 12): 2601-2611.
- [5] DENG Y, ZHOU C, MIRZA A H, et al. Rab18 binds PLIN2 and ACSL3 to mediate lipid droplet dynamics[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2021, 1866(7): 158923.
- [6] FERNÁNDEZ L P, MERINO M, COLMENAREJO G, et al. Metabolic enzyme ACSL3 is a prognostic biomarker and correlates with anticancer effectiveness of statins in non-small cell lung cancer[J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(12): 3135-3152.
- [7] FADER KAISER C M, ROMANO P S, VANRELL M C, et al. Biogenesis and breakdown of lipid droplets in pathological conditions[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 826248.
- [8] LI F Z, FANG S. Adipophilin: roles in physiology and pathology[J]. *J Clin Pathol*, 2023, 76(2): 98-102.
- [9] MAKIYAMA T, OBAMA T, WATANABE Y, et al. Sar1 affects the localization of perilipin 2 to lipid droplets[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(12): 6366.
- [10] 袁旭, 孟磊, 陈雁斌, 等. 脂肪分化相关蛋白通过抑制中性胆固醇酯水解酶表达促进 RAW264.7 细胞内脂质积蓄[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(2): 115-121.
- YUAN X, MENG L, CHEN Y B, et al. Adipose differentiation-related proteins promote lipid accumulation in RAW264.7 cells by inhibiting the expression of neutral cholesteryl ester hydrolase[J]. *Chin J Arterioscler*, 2018, 26(2): 115-121.
- [11] GUO S, HOU L, DONG L, et al. PLIN2-induced ectopic lipid accumulation promotes muscle ageing in gregarious locusts[J]. *Nat Ecol Evol*, 2023, 7(6): 914-926.
- [12] BHUIN T, ROY J K. Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport[J]. *Exp Cell Res*, 2014, 328(1): 1-19.
- [13] DEJGAARD S Y, PRESLEY J F. Rab18 regulates lipolysis via Arf/GBF1 and adipose triglyceride lipase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 520(3): 526-531.
- [14] DING N, WANG W, TENG J, et al. miR-26a-5p regulates adipocyte differentiation via directly targeting ACSL3 in adipocytes[J]. *Adipocyte*, 2023, 12(1): 1-10.
- [15] ZHANG L, WU B, WANG D. The mechanism of long-chain acyl-CoA synthetase 3 in inhibiting cell proliferation, migration, and invasion in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Am J Cancer Res*, 2023, 13(3): 835-851.
- [16] KIMURA H, ARASAKI K, OHSAKI Y, et al. Syntaxin 17 promotes lipid droplet formation by regulating the distribution of acyl-CoA synthetase 3 [J]. *J Lipid Res*, 2018, 59(5): 805-819.
- [17] CHANG Y S, TSAI C T, HUANGFU C A, et al. ACSL3 and GSK-3 $\beta$  are essential for lipid upregulation induced by endoplasmic reticulum stress in liver cells[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(3): 881-893.
- [18] 李晓歌, 蒋思怿, 张瑞, 等. 脂滴膜转运蛋白 Rab18 与脂质代谢的关系研究[J]. *生理科学进展*, 2020, 51(4): 293-298.
- LI X G, JIANG S P, ZHANG R, et al. Relationship between lipid droplet membrane transport protein Rab18 and lipid metabolism[J]. *Adv Physiol Sci*, 2020, 51(4): 293-298.
- [19] LARIGAUDERIE G, FURMAN C, JAYE M, et al. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(3): 504-510.
- [20] KASSAN A, HERMS A, FERNÁNDEZ-VIDAL A, et al. Acyl-CoA synthetase 3 promotes lipid droplet biogenesis in ER microdomains [J]. *J Cell Biol*, 2013, 203(6): 985-1001.
- [21] GREENBERG A S, COLEMAN R A, KRAEMER F B, et al. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(6): 2102-2110.
- [22] XU B, ZHAO H, WANG S, SUN X, QIN X. Increased ADRP expression in human atherosclerotic lesions correlates with plaque instability[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4): 5414-5421.
- [23] 董亚兰, 胡德胜. 动脉粥样硬化的炎症应答特征及运用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(4): 304-312.
- DONG Y L, HU D S. Characteristics and application of inflammatory response in atherosclerosis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(4): 304-312.

(此文编辑 文玉珊)