

成纤维细胞生长因子 21 通过诱导自噬促进泡沫细胞胆固醇流出

赵金理^{1,2}, 孟军², 曾召林³, 夏林珍¹, 陈姣姣¹, 王佐¹

(1. 南华大学心血管病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001; 2. 南华大学附属第一医院, 湖南省衡阳市 421001; 3. 重庆市南川区人民医院, 重庆市 510370)

[关键词] 成纤维细胞生长因子 21; 泡沫细胞; 自噬; 脂质蓄积; 胆固醇流出

[摘要] **目的** 探讨成纤维细胞生长因子 21 (FGF21) 促进泡沫细胞胆固醇流出的机制。**方法** 在建立 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型的基础上, 以不同浓度 (0、50、100、200、400 $\mu\text{g/L}$) FGF21 处理泡沫细胞 24 h, 以 200 $\mu\text{g/L}$ FGF21 处理泡沫细胞不同时间 (0、6、12、24、48 h), Western blot、激光共聚焦检测 LC3, MDC 染色分析自噬小体, HPLC、油红 O 染色测定细胞内胆固醇蓄积, 液体闪烁计数分析胆固醇流出。**结果** 200、400 $\mu\text{g/L}$ 的 FGF21, 以及 200 $\mu\text{g/L}$ 的 FGF21 作用 24 h 和 48 h, 泡沫细胞总胆固醇 (TC)、游离胆固醇 (FC) 和胆固醇酯 (CE) 水平均显著降低, 而其胆固醇流出显著增强。机制研究发现, FGF21 可诱导泡沫细胞自噬体形成, 且微管相关蛋白 I 轻链 3 (LC3-I) 至微管相关蛋白 II 轻链 3 (LC3-II) 转化率显著增加, 但自噬相关基因 5 (ATG5) siRNA 或 3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 或巴弗洛霉素 A1 (BafA1) 干预自噬后, FGF21 对 TC、FC 和 CE 的降低作用减弱, 同时胆固醇流出减少, 泡沫细胞脂质蓄积加重。**结论** FGF21 通过上调自噬促进泡沫细胞胆固醇流出。

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

Fibroblast growth factor 21 promotes cholesterol efflux from foam cells by inducing autophagy

ZHAO Jinli^{1,2}, MENG Jun², ZENG Zhaolin³, XIA Linzhen¹, CHEN Jiaojiao¹, WANG Zuo¹

(1. Institute of Cardiovascular Disease Research & Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. The First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 3. People's Hospital of Nanchuan District, Chongqing 510370, China)

[KEY WORDS] fibroblast growth factor 21; foam cells; autophagy; lipid accumulation; cholesterol efflux

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanism of fibroblast growth factor 21 (FGF21) in promoting cholesterol efflux from foam cells. **Methods** THP-1 derived foam cells were treated with FGF21 at different concentrations (0, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/L}$) for 24 hours and 200 $\mu\text{g/L}$ FGF21 at different time (0, 6, 12, 24, 48 h), Western blot, laser confocal were used to detect LC3, and MDC staining for autophagosomes analysis, HPLC, oil red O staining for intracellular cholesterol accumulation measurement, and liquid scintillation counting for cholesterol efflux detection. **Results** After 200 $\mu\text{g/L}$, 400 $\mu\text{g/L}$ FGF21 and 200 $\mu\text{g/L}$ FGF21 were applied for 24 h and 48 h, the levels of total cholesterol (TC), free cholesterol (FC) and cholesterol ester (CE) in foam cells were significantly reduced, while their cholesterol efflux was significantly enhanced. Mechanism studies found that FGF21 induced the formation of autophagosomes in foam cells, and the conversion rate of microtubule-associated protein I light chain3 (LC3-I) to microtubule-associated protein II light chain3 (LC3-II) was significantly increased. However, after autophagy was inhibited with autophagy-related gene 5 (ATG5) siRNA or 3-methyladenine (3-MA) or Bafilomycin A1 (BafA1), effect of FGF21 on decreasing TC, FC, CE and lipid accumulation, and increasing cholesterol efflux were reduced. **Conclusion** FGF21 promotes cholesterol efflux in foam cells by up-regulating autophagy.

[收稿日期] 2019-11-10

[修回日期] 2020-04-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81600342, 81970389), 湖南省研究生科研创新项目 (CX20190752)

[作者简介] 赵金理, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 675585404@qq.com。通信作者王佐, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 smt121101@163.com。

脂质代谢紊乱可引起动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)病变,成纤维细胞生长因子 21(fibroblast growth factor 21, FGF21)是一种低分子多肽类激素。研究发现, FGF21 具有优良调脂能力和抗 As 作用^[1-2], 可减少泡沫细胞中的脂质蓄积^[3], 然而其作用机制尚未完全阐明。

自噬(autophagy)是细胞内稳态的一种重要调控机制, 脂滴通过自噬可降解为游离胆固醇和脂肪酸, 且自噬参与泡沫细胞中脂质代谢的调节^[4]。研究发现, 激活自噬可促进胆固醇流出, 减少泡沫细胞内脂质蓄积^[5-6]。FGF21 可以通过诱导自噬抑制脂肪肝的形成^[7], 然而, FGF21 在泡沫化细胞中能否通过调控自噬而影响脂质代谢尚不清楚, 故本文拟在泡沫细胞模型上, 研究 FGF21 对自噬的调控及脂质转运的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料

重组人 FGF21 购自美国 Peprotech; LC3A/B 一抗、自噬相关基因 5 (autophagy-related gene 5, ATG5) 一抗、二抗山羊抗兔 IgG H&L (HRP) 均购自美国 Abcam; P62 一抗购自美国 R&D Systems; 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA) 购自美国 Sigma-Aldrich; THP-1 细胞购自中国科学院细胞库; RPMI-1640 培养基、胎牛血清(FBS) 购自美国 HyClone; 佛波酯(PMA) 购自美国 Santa Cruz Biotechnology; ATG5 siRNA 购自中国 GeneChem; Lipofectamine 2000 购自美国 ThermoFisher; ³H 胆固醇购自美国 PerkinElmer; 巴弗洛霉素 A1 (Bafilomycin A1, BafA1) 购自美国 TargetMol; RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒购自美国 ThermoFisher; ATG5、GAPDH 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 细胞培养及油红 O 染色评估泡沫细胞内脂质水平

THP-1 细胞在含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养, 培养基为含 10% FBS 的 RPMI-1640。取对数生长期细胞进行实验。以 160 nmol/L 佛波酯处理 THP-1 细胞 24 h, 将其诱导分化为巨噬细胞, 然后换用含有 50 mg/L ac-LDL 的无血清培养基继续培养 48 h, 使其成为泡沫细胞。用 0.5% 油红 O 对胞内脂质进行染色后, 再以苏木精复染, 光学显微镜下采集图像。

1.3 细胞胆固醇流出

把 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞与 2.5 mCi/L

剂量大小的³H 标记的胆固醇共孵育 24 h 后, 收集细胞, PBS 洗涤细胞后, 用 RPMI-1640 培养基(含 0.1% BSA) 温育过夜。收集细胞, PBS 洗涤细胞后, 在 RPMI-1640 培养基(0.1% BSA 的 2 mL 外排培养基) 中孵育。培养基和细胞中的³H 胆固醇含量用液体闪烁计数进行检测, 分析其 CPM 值。胆固醇流出百分比计算公式为: $[\text{培养液 CPM}/(\text{培养液 CPM} + \text{细胞内 CPM})] \times 100\%$ 。

1.4 高效液相色谱分析胆固醇(酯)

该方法用于检测胞内游离胆固醇(free cholesterol, FC)、总胆固醇(total cholesterol, TC)和胆固醇酯(cholesterol ester, CE)。超声波破碎器震碎细胞, BCA 法进行蛋白定量。将总体积为 15 μL 的反应混合物(10 mmol/L DTT, pH 7.4 Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl 和 500 mmol/L MgCl₂) 加入 0.1 mL 的胆固醇标准液或破碎后的细胞溶液。检测 FC 时加入 0.5 U 胆固醇氧化酶, 检测 TC 时加入胆固醇氧化酶(0.5 U) 和胆固醇酯酶(0.5 U), 37 °C 下 40 min, 取 10 μL 反应液作色谱分析。C18 柱, 柱温 4 °C 洗脱, 流动相为异丙醇: 乙腈: 正庚烷(35:52:13), 流动相流速 1.5 mL/min, 检测波长 216 nm, 胆固醇含量用峰面积计算。

1.5 FGF21 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞自噬的影响

实验分为 4 组: 对照组、BafA1 组(20 nmol/L BafA1 处理 4 h)、FGF21 组(200 μg/L FGF21 处理 24 h)、BafA1+FGF21 组(20 nmol/L BafA1 预处理 4 h+200 μg/L FGF21 处理 24 h)。自噬相关分子表达及自噬形态学变化分别采用 Western blot、激光共聚焦检测、MDC 染色等方法。

1.6 FGF21 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出的影响

以不同浓度(0、50、100、200、400 μg/L) FGF21 处理 24 h, 分析 FGF21 的浓度效应; 以 200 μg/L 的 FGF21 对 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞处理不同时间(0、6、12、24、48 h), 分析 FGF21 作用的时间效应。液体闪烁计数测量³H 胆固醇含量, 分析胆固醇流出。

1.7 自噬抑制对 FGF21 促进胆固醇流出的影响

实验分 6 组: 对照组、FGF21 组(200 μg/L FGF21)、自噬抑制剂 3-MA 组(5 mmol/L 3-MA 处理 6 h)、3-MA+FGF21 组(5 mmol/L 3-MA 预处理 6 h+200 μg/L FGF21)、ATG5 siRNA 阴性对照+FGF21 组(200 μg/L FGF21+ATG5 siRNA 阴性对照)、ATG5 siRNA+FGF21 组(200 μg/L FGF21+ATG5 siRNA)。

各组处理时间均为 24 h, 通过 HPLC、油红 O 染色分析细胞内脂质蓄积, 液体闪烁计数测量³H 胆固醇含量和分析胆固醇流出。

1.8 MDC 染色激光共聚焦分析

将细胞用 MDC 染色后, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。于激光共聚焦显微镜下观察细胞中绿色斑点并拍照和图像分析(每个绿色斑点即表示一个自噬体)。

1.9 实时 PCR

提取总 RNA, 测定纯度。取总 RNA 2 μ L 用 ThermoFisher 公司反转录试剂盒反转录合成 cDNA, 再取反转录产物 2 μ L 在 DyNAmo SYBR Green qPCR Kit 应用生物系统进行 PCR 循环扩增, 扩增体系为 25 μ L。上海生工设计 ATG5、GAPDH 的引物序列(ATG5: Forward 序列为 5'-AAAGATGTGCTTCGAGATGTGT-3', Reverse 序列为 5'-CACTTTGT-CAGTTACCAACGTCA-3'; GAPDH: Forward 序列为 5'-TGGCCTTCCGTGTTCTACC-3', Reverse 序列为 5'-CGCCTGCTTACCACCTTCT-3')。操作步骤: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

1.10 蛋白免疫印迹

制备 SDS 聚丙烯酰胺凝胶。在凝胶泳道中加入相同浓度的蛋白样品电泳(先恒压 80 V, 30 min; 再 120 V, 60~90 min), 电泳过程中注意观察溴酚蓝指示剂的位置。电泳结束后, 转 PVDF 膜, 转膜完成后, 用含有 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭液室温封闭 2~4 h。然后将膜与对应的一抗在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 TBST 洗涤 3 次, 根据一抗种属选择合适的二抗, 将膜与二抗在室温下孵育 1.5~2 h, 用 TBST 洗涤 3 次。使用化学发光法, 在凝胶成像发光系统中显影、拍照并保存结果。

1.11 统计分析

分析切片采用 Image Pro Plus 6.0 软件, 灰度值分析采用 Gel-Proanalyzer, 统计分析采用 GraphPad Prism 8.0 软件。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 One-way ANOVA 单因素方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 FGF21 减少泡沫细胞中的脂质蓄积并促进胆固醇流出

随着 FGF21 浓度的增加和作用时间的延长, 胞

内 TC、FC 和 CE 水平呈递减的趋势, 胆固醇流出呈递增趋势。统计分析结果表明, 与对照组比较, 200 μ g/L 和 400 μ g/L FGF21 处理 24 h(表 1), 以及 200 μ g/L FGF21 处理 24 h 和 48 h(表 2), 均显著降低了细胞内 TC、FC 和 CE 水平, 其细胞内胆固醇流出也显著增加(图 1)。

表 1. 不同浓度 FGF21 对泡沫细胞胆固醇含量的影响($n=3$)

Table 1. Effect of different concentrations of FGF21 on cholesterol content in foam cells($n=3$)

FGF21 浓度(μ g/L)	TC(mg/g)	FC(mg/g)	CE(mg/g)
0	472 \pm 36	196 \pm 22	276 \pm 22
50	469 \pm 24	192 \pm 19	277 \pm 19
100	368 \pm 25	157 \pm 21	211 \pm 26
200	288 \pm 29 ^a	126 \pm 18 ^a	162 \pm 25 ^a
400	285 \pm 21 ^a	125 \pm 20 ^a	160 \pm 21 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与 0 μ g/L FGF21(对照组)比较。

表 2. 200 μ g/L FGF21 处理不同时间对泡沫细胞胆固醇含量的影响($n=3$)

Table 2. Effect of 200 μ g/L FGF21 on cholesterol content at different time in foam cells($n=3$)

FGF21 处理时间	TC(mg/g)	FC(mg/g)	CE(mg/g)
0 h	498 \pm 24	197 \pm 22	301 \pm 28
6 h	480 \pm 21	192 \pm 23	288 \pm 22
12 h	468 \pm 21	188 \pm 21	280 \pm 23
24 h	284 \pm 22 ^a	125 \pm 18 ^a	159 \pm 20 ^a
48 h	282 \pm 25 ^a	126 \pm 19 ^a	159 \pm 22 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与 FGF21 处理 0 h(对照组)比较。

2.2 FGF21 促进泡沫细胞自噬

BafA1 可抑制自噬, 实验结果显示, 相对于对照组, BafA1 与 THP-1 源性泡沫细胞共孵育 24 h 后, 微管相关蛋白 I 轻链 3 (microtubule-associated protein I light chain3, LC3-I) 至微管相关蛋白 II 轻链 3 (microtubule-associated protein II light chain3, LC3-II) 转化率显著增加, 同时 P62 水平上调。而与 BafA1 组或 FGF21 组相比较, BafA1+FGF21 组的 LC3-I 至 LC3-II 转化率进一步增加(图 2A), 上述研究结果表明 FGF21 可以增加自噬体或自噬溶酶体的形成, 结合 MDC 激光共聚焦法对 GFP-LC3 检测结果(图 2B), 表明 FGF21 对泡沫细胞自噬具有促进作用。

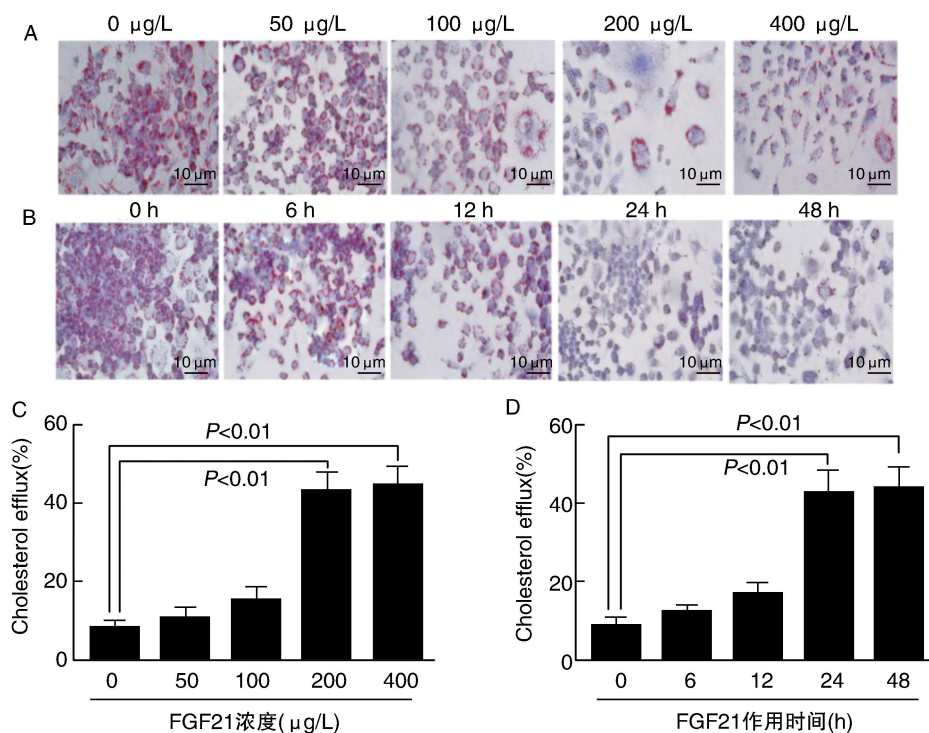


图 1. FGF21 对泡沫细胞脂质蓄积和胆固醇流出的影响 ($n=3$) A 和 B 分别为不同浓度 FGF21 处理 24 h 和 200 $\mu\text{g/L}$ FGF21 处理不同时间对 THP-1 源性泡沫细胞脂质蓄积的影响; C 和 D 分别为不同浓度 FGF21 处理 24 h 和 200 $\mu\text{g/L}$ FGF21 处理不同时间对胆固醇流出的影响。

Figure 1. Effect of FGF21 on foam cells lipid accumulation and cholesterol efflux ($n=3$)

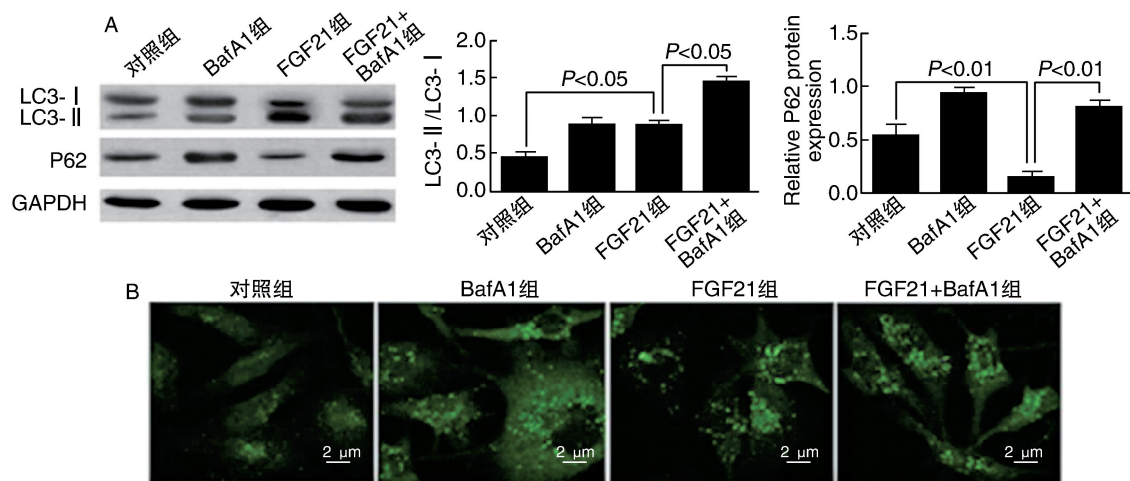


图 2. FGF21 对泡沫细胞自噬的影响 A 为 Western blot 检测自噬相关蛋白表达水平及其定量分析 ($n=3$); B 为 MDC 染色激光共聚焦法检测自噬小体。

Figure 2. Effect of FGF21 on autophagy in foam cells

2.3 抑制自噬减弱 FGF21 对泡沫细胞脂质蓄积的负性调控作用

ATG5 是自噬发生的重要自噬相关基因, 其与自噬的发生与发展关系密切, 为证实 FGF21 通过诱导自噬调节泡沫细胞内的脂质蓄积和胆固醇流出, 使用 siRNA 技术沉默 ATG5, 结果发现, 对 ATG5 的沉默效果显著 (图 3)。油红 O 染色结果显示胞内脂

质蓄积明显增加, 胆固醇流出检测结果显示 ATG5 沉默后, FGF21 促进胆固醇流出显著减弱 (图 4)。高效液相色谱检测泡沫细胞中的脂质水平, 结果发现抑制自噬后明显减弱 FGF21 降低 TC、FC 和 CE 的作用 (表 3)。各组之间的 CE/TC 值比较虽无显著差异, 但 FGF21 组和 ATG5 siRNA 阴性对照 + FGF21 组还是表现出了下降的趋势。

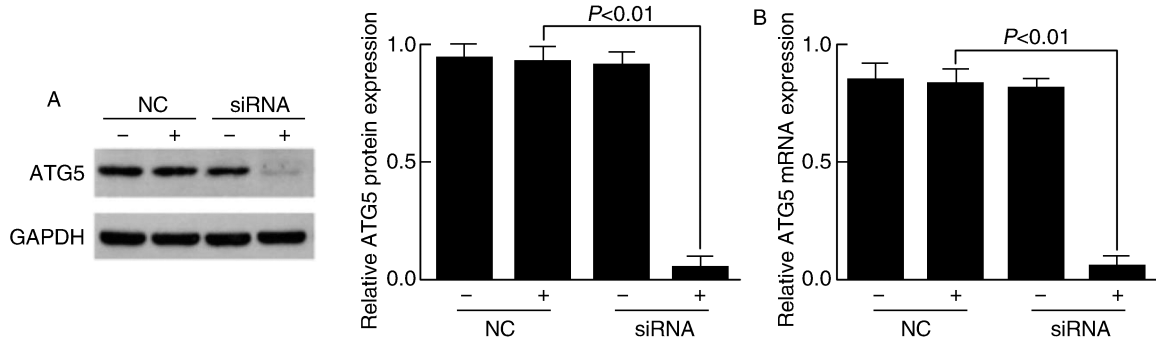


图 3. ATG5 siRNA 干扰效率检测 A 为 Western blot 检测 ATG5 蛋白水平;B 为 RT-PCR 检测 ATG5 mRNA 水平。NC 为阴性对照组,“-”为转空载体,“+”为转染乱码序列;siRNA 为 ATG5 干扰组,“-”为转空载体,“+”为转染 ATG5 的干扰序列。

Figure 3. Detection of ATG5 siRNA interference efficiency

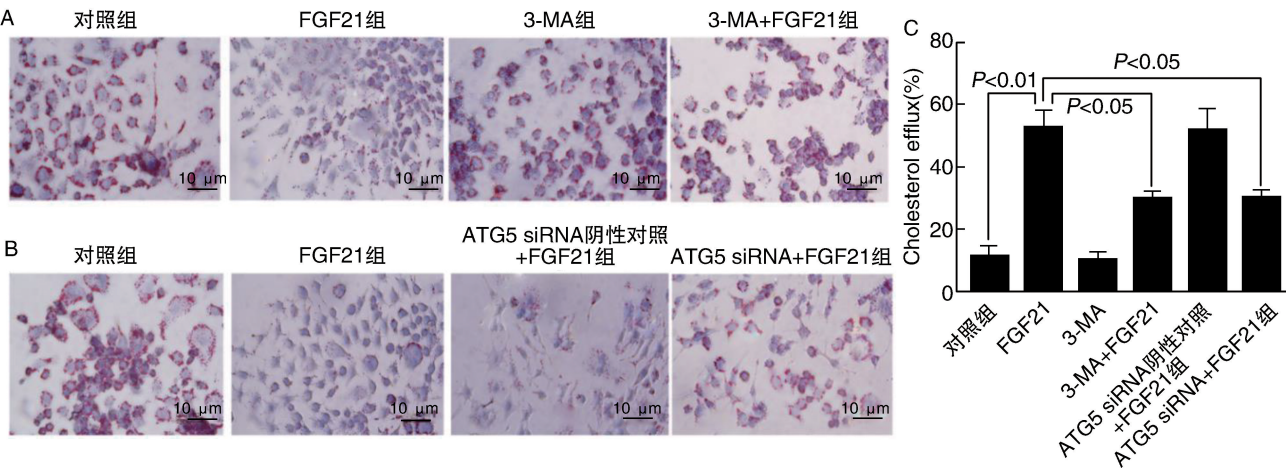


图 4. 抑制自噬减弱 FGF21 对泡沫细胞胆固醇蓄积的负性调控 A、B 为泡沫细胞中脂质油红 O 染色检测;C 为液体闪烁计数测量³H 胆固醇含量(n=3)。

Figure 4. Inhibition of autophagy attenuates the negative regulation of FGF21 on cholesterol accumulation in foam cells

表 3. 抑制自噬减弱 FGF21 对泡沫细胞胆固醇蓄积的负性调控作用(n=3)

Table 3. Inhibition of autophagy attenuates the negative regulation of FGF21 on cholesterol accumulation in foam cells(n=3)

分组	TC (mg/g)	FC (mg/g)	CE (mg/g)	CE/TC (%)
对照组	488±24	187±22	301±28	61.7
FGF21 组	286±23 ^a	123±18 ^a	163±21 ^a	57.0
3-MA 组	466±24	186±22	280±23	61.0
3-MA+FGF21 组	458±21 ^b	178±24 ^b	280±22 ^b	61.1
ATG5 siRNA 阴性对照+FGF21 组	288±24	124±21	164±23	56.9
ATG5 siRNA+FGF21 组	453±21 ^b	176±24 ^b	277±22 ^b	61.1

a 为 P<0.05,与对照组比较;b 为 P<0.05,与 FGF21 组比较。

3 讨论

脂代谢异常是诱发 As 血管病变的重要因素, FGF21 作为一种肽类激素,主要合成部位在肝脏、白色脂肪组织及胰腺,是一种多功能的分子,参与糖代谢、脂代谢及能量代谢等生物学过程的调节,由

于其良好的糖脂代谢调控能力,而备受心血管病领域广大研究者的青睐^[8]。冠心病患者血浆中 FGF21 表达代偿性增高^[9],动物实验发现,FGF21 的缺乏可引起 ApoE^{-/-}小鼠 As 病变加剧,并伴有高胆固醇血症^[10-11],FGF21 敲除后脂代谢出现异常^[12]。因此,认为 FGF21 具有良好的抗 As 作用潜能^[13]。

研究者对 FGF21 抗 As 机制也进行了大量的研究,它可通过上调高脂饮食大鼠血液中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽和降低丙二醛等脂质过氧化物^[14],激活 Nrf2/ARE 信号通路而增强其抗氧化能力^[15]。FGF21 可以通过激活 AMP 活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)抑制 As 进展^[16],它还能通过调控 NF- κ B/I κ B 途径抑制炎症因子的生成发挥作用^[17],通过 FGFR1/Syk/NLRP3 途径阻止血管平滑肌细胞的增殖和迁移而抑制糖尿病小鼠动脉血管内膜增生也是 FGF21 抗 As 的重要作用机制^[18]。

FGF21 通过脂质代谢途径抑制 As 进展方面的报道较多。研究发现,FGF21 能降低甘油三酯(triglyceride, TG)、极低密度脂蛋白胆固醇(very low density lipoprotein cholesterol, VLDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C),升高高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)^[11]。FGF21 可通过影响脂代谢的转录因子而调控脂代谢作用,如 FGF21 通过激活 FGFR2- β klotho 受体抑制胆固醇调节元件结合蛋白 2(sterol-regulatory element binding protein 2, SREBP-2)表达降低肝脏总胆固醇水平^[11],FGF21 还通过对抗 Mylip/IdolCnpy2 途径升高低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)水平和增强 LDL-C 摄取^[19],但 FGF21 能否调控 HDL 上的载脂蛋白 A I 的表达尚不清楚,因此有必要进行这方面的研究,以便能了解 FGF21 调脂作用更多的分子机制。抑制泡沫细胞的形成是 FGF21 调节脂代谢抗 As 作用的重要分子机制,研究发现 FGF21 通过上调三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1)促进泡沫细胞胆固醇流出,通过肝脏 X 受体促进 ABCA1 表达^[3]。

自噬对脂质代谢调控的研究相对较晚,但由于自噬对脂质代谢(特别是巨噬细胞源性泡沫细胞形成)非常显著的调控能力,研究者对这一领域表现出了很大的兴趣。研究发现,自噬可减少泡沫细胞中脂质蓄积^[20-21],促进泡沫细胞中的胆固醇流出^[22],自噬受损可加速泡沫细胞的形成^[23]。目前主要集中在不同的药物和分子对自噬的调控及其对脂代谢异常的影响方面,如青蒿素通过 AMPK/mTOR/ULK1 途径促进巨噬细胞自噬,减轻高脂饮食 ApoE^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化^[24];槲皮素通过调节 ox-LDL 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞泡沫细胞中 MST1(mammalian Ste20-like kinase 1)介导的自噬来

抑制动脉粥样硬化的进展^[25];长链非编码 RNA 的 LncRNA DYNLRB2-2 通过增强自噬抑制 THP-1 巨噬细胞泡沫化^[26],等等。因此,FGF21 是否通过自噬途径调控脂代谢(特别是泡沫细胞形成和胆固醇流出)就成为一个十分诱人的课题,由于 FGF21 可诱导自噬^[27],故 FGF21 存在通过上调自噬减少泡沫细胞内脂质蓄积的可能性,我们的实验结果证实了这一点,即 FGF21 诱导泡沫细胞中的自噬,增加 LC3-I 向 LC3-II 转化和降解的作用,并抑制 P62 表达,从而促进泡沫细胞的胆固醇流出,显著降低泡沫细胞内 TC、FC 和 CE 水平。但 3-MA 或 ATG5 siRNA 抑制自噬则明显减弱 FGF21 促进胆固醇流出和降低泡沫细胞内脂质蓄积。在研究结果当中我们还注意到,FGF21 对 CE/TC 值虽有下降的趋势,但统计分析其差异不显著。这一方面可能是因为胆固醇酯在酶的作用下,分解为胆固醇,因此,CE 与 TC 的下降速率基本一致,CE/TC 的比值因此无显著变化;另一方面,也可能是 FGF21 对胆固醇和胆固醇酯的非特异性转移造成的。我们在实验中还发现,自噬抑制后,并不能完全抑制 FGF21 对胞内脂质的降解,这一方面可能是自噬抑制的效果问题,即 3-MA 和 ATG5 siRNA 并没有完全抑制掉自噬;另一方面,可能由于 FGF21 存在除自噬以外的其它促胆固醇流出途径,如 FGF21 上调 ABCA1 促进胞内胆固醇流出^[28]。虽然 FGF21 具有很强的调脂作用,但尚未有动物模型上逆转 As 斑块实验证据,很大程度是受实验技术手段所限,相信随着相关技术手段的改进,FGF21 应用 As 防治会有很好的前景。

综上,本研究在泡沫细胞模型上,验证了 FGF21 降低泡沫细胞内脂质蓄积并促进泡沫细胞内的胆固醇流出是通过上调自噬起作用的假说,从全新的视角阐明了 FGF21 拮抗泡沫化作用机制,为将 FGF21 运用于 As 防治提供了新的实验依据,至于 FGF21 上调自噬的原因尚不清楚,但很可能通过上调自噬相关基因起作用,因此,进一步深入探索 FGF21 上调自噬的分子机制十分必要。

[参考文献]

- [1] Adams AC, Kharitonov A. FGF21: the center of a transcriptional nexus in metabolic regulation[J]. Curr Diabetes Rev, 2012, 8(4): 285-293.
- [2] Fisher FM, Maratos-Flier E. Understanding the physiology of FGF21[J]. Annu Rev Physiol, 2016, 78: 223-241.
- [3] Shang W, Yu XJ, Wang HL, et al. Fibroblast growth factor

- 21 enhances cholesterol efflux in THP-1 macrophage-derived foam cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(1): 503-508.
- [4] Ouimet M, Franklin V, Mak E, et al. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase[J]. *Cell Metab*, 2011, 13(6): 655-667.
- [5] Wang X, Li L, Niu X, et al. mTOR enhances foam cell formation by suppressing the autophagy pathway[J]. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(4): 198-204.
- [6] Hsu S, Koren E, Chan Y, et al. Effects of everolimus on macrophage-derived foam cell behavior[J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 15(5): 269-277.
- [7] Zhu S, Wu Y, Ye X, et al. FGF21 ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by inducing autophagy[J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 420(1-2): 107-119.
- [8] Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(3): 235-253.
- [9] Lin Z, Wu Z, Yin X, et al. Serum levels of FGF-21 are increased in coronary heart disease patients and are independently associated with adverse lipid profile[J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15534.
- [10] Yan X, Gou Z, Li Y, et al. Fibroblast growth factor 21 inhibits atherosclerosis in apoE^{-/-} mice by ameliorating Fas-mediated apoptosis[J]. *Lipids Health Dis*, 2018, 17(1): 2-8.
- [11] Lin Z, Pan X, Wu F, et al. Fibroblast growth factor 21 prevents atherosclerosis by suppression of hepatic sterol regulatory element-binding protein-2 and induction of adiponectin in mice[J]. *Circulation*, 2015, 131(21): 1861-1871.
- [12] Yan X, Chen J, Zhang C, et al. FGF21 deletion exacerbates diabetic cardiomyopathy by aggravating cardiac lipid accumulation[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(7): 1557-1568.
- [13] Tabari FS, Karimian A, Parsian H, et al. The roles of FGF21 in atherosclerosis pathogenesis[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2019, 20(1): 103-114.
- [14] Zhu W, Wang C, Liu L, et al. Effects of fibroblast growth factor 21 on cell damage in vitro and atherosclerosis in vivo[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2014, 92(11): 927-935.
- [15] Jia H, Cheng J, Zhou Q, et al. Fibroblast growth factor 21 attenuates inflammation and oxidative stress in atherosclerotic rat via enhancing the Nrf1-ARE signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(3): 1308-1317.
- [16] Min BK, Oh CJ, Park S, et al. Therapeutic effect of dichloroacetate against atherosclerosis via hepatic FGF21 induction mediated by acute AMPK activation[J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(10): 1-12.
- [17] Yu Y, He J, Li S, et al. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) inhibits macrophage-mediated inflammation by activating Nrf2 and suppressing the NF-κB signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 38: 144-152.
- [18] Wei W, Li XX, Xu M. Inhibition of vascular neointima hyperplasia by FGF21 associated with FGFR1/Syk/NLRP3 inflammasome pathway in diabetic mice[J]. *Atherosclerosis*, 2019, 289: 132-142.
- [19] Do HT, Tselykh TV, Mäkelä J, et al. Fibroblast growth factor-21 (FGF21) regulates low-density lipoprotein receptor (LDLR) levels in cells via the E3-ubiquitin ligase Mylip/Idol and the Canopy2 (Cnpy2)/Mylip-1 interacting saposin-like protein (Msap) [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(16): 12602-12611.
- [20] 许秋莲, 杨阳, 田野. 巨噬细胞自噬在动脉粥样硬化中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(1): 97-100.
- [21] Yao F, Lv YC, Zhang M, et al. Apelin-13 impedes foam cell formation by activating Class III PI3K/Beclin-1-mediated autophagic pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 466(4): 637-643.
- [22] Li D, Chen A, Lan T, et al. SCAP knockdown in vascular smooth muscle cells alleviates atherosclerosis plaque formation via up-regulating autophagy in ApoE^{-/-} mice[J]. *Faseb J*, 2019, 33(3): 3437-3450.
- [23] Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention[J]. *Nat Med*, 2002, 8(11): 1235-1242.
- [24] Cao Q, Du H, Fu X, et al. Artemisinin attenuated atherosclerosis in high-fat diet-fed ApoE^{-/-} mice by promoting macrophage autophagy via AMPK/mTOR/ULK1 pathway[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2019. DOI: 10.1097/FJC.0000000000000794.
- [25] Cao H, Jia Q, Yan L, et al. Quercetin suppresses the progression of atherosclerosis by regulating MST1-mediated autophagy in ox-LDL-induced RAW264.7 macrophage foam cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23). DOI: 10.3390/ijms20236093.
- [26] Li Y, Sun T, Shen S, et al. LncRNA DYNLRB2-2 inhibits THP-1 macrophage foam cell formation by enhancing autophagy[J]. *Biol Chem*, 2019. DOI: 10.1515/hsz-2018-0461.
- [27] Hu SQ, Cao SJ, Tong ZC, et al. FGF21 protects myocardial ischemia-reperfusion injury through reduction of miR-145-mediated autophagy[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(11): 3677-3688.
- [28] Lin XL, He XL, Zeng JF, et al. FGF21 increases cholesterol efflux by upregulating ABCA1 through the ERK1/2-PPARγ-LXRα pathway in THP1 macrophage-derived foam cells[J]. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(8): 514-521.

(此文编辑 许雪梅)