本文引用：张 娥，李 宁，许 洁，等. 岩藻聚糖降低巨噬细胞源性泡沫细胞中的脂质蓄积[J]. 中国动脉硬化杂志，2026，34(10)：952-961. DOI：10.20039/j.cnki.1007-3949.2026.10.004.

·金俊飞教授代谢紊乱与心血管疾病专栏· [文章编号] 1007-3949(2026)34-10-0952-10

岩藻聚糖降低巨噬细胞源性泡沫细胞中的脂质蓄积

张 娥[1]，李 宁[1]，许 洁[1]，张慧婧[1]，王 静[1]，宋淑亮[2]
1.山东药品食品职业学院制药工程系，2.山东大学海洋学院，山东省威海市 264200

[摘 要] [目的] 明确岩藻聚糖进入泡沫细胞的途径及其调控转录因子 EB(TFEB)降低脂质蓄积的机制。[方法] 采用氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导 RAW264.7 巨噬细胞构建泡沫细胞模型，通过油红 O 染色及胆固醇含量测定评估岩藻聚糖作用下脂质蓄积。利用 4 种内吞抑制剂(CPZ、mβCD、EIPA、秋水仙碱)结合油红 O 染色、胆固醇检测及 Western blot，分析岩藻聚糖对泡沫细胞内脂质蓄积及 TFEB 核转位的影响。使用雷帕霉素靶蛋白(mTOR)激动剂 MHY1485 及钙调磷酸酶抑制剂 CsA，探讨其对脂质蓄积与 TFEB 核转位的作用。采用 Lyso-Tracker Red 检测溶酶体功能，并通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测自噬-溶酶体通路相关基因(AP-3、AP-4、MCOLN1、LAMP-2)的表达。[结果] 低、高剂量岩藻聚糖显著减少泡沫细胞内脂质蓄积，胆固醇酯含量由模型组的 60.05% 分别降至 34.32% 和 27.71%(均 $P<0.001$)。内吞抑制剂 CPZ、EIPA、mβCD、秋水仙碱处理后胆固醇含量分别升高 21.67%、10.58%、2.10%、36.83%($P<0.05$ 或 $P<0.001$)，与油红 O 染色结果一致。岩藻聚糖显著增加核内 TFEB 表达；CPZ、EIPA、秋水仙碱处理使核内 TFEB 分别降低 24.02%、12.70%、47.79%($P<0.05$ 或 $P<0.001$)，而 mβCD 无显著影响。CsA 与 MHY1485 处理后，核内 TFEB 分别降低 26.12% 和 50.02%($P<0.05$ 或 $P<0.001$)；油红 O 显示大量脂滴，胆固醇酯含量与空白组及岩藻聚糖组相比显著升高(均 $P<0.001$)，与模型组相近。Lyso-Tracker Red 检测显示，岩藻聚糖显著增强溶酶体功能，并上调溶酶体相关基因 AP-3、AP-4、MCOLN1 及 LAMP-2 的表达水平，其中 LAMP-2 的表达上调 34.0% 和 65.6%($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。[结论] 岩藻聚糖通过网格蛋白依赖的内吞及巨胞饮途径进入泡沫细胞，抑制 mTOR 激活，增强 PPP3/钙调磷酸酶活性，促进 TFEB 去磷酸化并转位入核，进而上调自噬-溶酶体通路相关基因(AP-3、AP-4、MCOLN1 和 LAMP-2)表达，增强溶酶体功能，最终有效减少泡沫细胞中的脂质蓄积。

[关键词] 动脉粥样硬化； 自噬-溶酶体； 脂质蓄积； 岩藻聚糖； 内吞； 转录因子 EB
[中图分类号] R5；R363 [文献标识码] A

Fucoidan reduces lipid accumulation in macrophage-derived foam cells

Zhang E[1], Li Ning[1], Xu Jie[1], Zhang Huijing[1], Wang Jing[1], Song Shuliang[2]
1. *Department of Pharmaceutical Engineering, Shandong Drug and Food Vocational College, Weihai, Shandong* 264200, *China*; 2. *Marine College, Shandong University, Weihai, Shandong* 264200, *China*

[**ABSTRACT**] **Aim** To elucidate the pathway of fucoidan entering foam cells and the mechanism of regulating transcription factor EB (TFEB) to reduce lipid accumulation. **Methods** The foam cell model was established by inducing RAW264.7 macrophages with oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). Oil red O staining and cholesterol content determination were used to assess lipid accumulation following fucoidan treatment. Four endocytosis inhibitors (CPZ, mβCD, EIPA and Colchicine) were employed, combined with Oil red O staining, cholesterol detection and Western blotting, to analyze the effects of fucoidan on intracellular lipid accumulation and TFEB nuclear translocation. The mammalian target of rapamycin (mTOR) agonist MHY1485 and the calcineurin inhibitor CsA were utilized to investigate their roles in lipid accumulation and TFEB nuclear translocation. Lysosomal function was assessed using Lyso-Tracker Red staining, and the expression of autophagy-lysosome pathway-related genes (AP-3, AP-4, MCOLN1 and LAMP-2) was determined by qRT-PCR and Western blot. **Results** Low and high doses of fucoidan significantly reduced the lipid accumulation in foam cells, and the cholesterol ester content decreased from 60.05% of the model group to 34.32% and

[收稿日期] 2026-07-03 [修回日期] 2026-09-20
[基金项目] 山东省自然科学基金面上项目(ZR2022MH279)；威海市中医药科技项目(2025Ⅱ-7)
[作者简介] 张娥，博士，讲师，主要从事海洋药物活性筛选与机制研究，E-mail：ezhang815@126.com。

27.71% respectively (all $P<0.001$). After treatment with endocytic inhibitors CPZ, EIPA, mβCD and Colchicine, cholesterol contents increased by 21.67%, 10.58%, 2.10% and 36.83%, respectively ($P<0.05$ or $P<0.001$), consistent with the results of Oil red O staining. Fucoidan significantly increased the expression of TFEB in the nucleus; CPZ, EIPA and Colchicine treatments reduced nuclear TFEB by 24.02%, 12.70% and 47.79%, respectively ($P<0.05$ or $P<0.001$), while mβCD had no significant effect. After treatment with CsA and MHY1485, the nuclear TFEB decreased by 26.12% and 50.02%, respectively ($P<0.05$ or $P<0.001$); Oil red O showed a large number of lipid droplets, and the cholesterol ester contents were significantly increased compared to the control group and fucoidan group (all $P<0.001$), similar to the model group. Lyso-Tracker Red detection showed that fucoidan significantly enhanced lysosome function and upregulated the expression of autophagy-lysosome pathway-related genes AP-3, AP-4, MCOLN1 and LAMP-2, with LAMP-2 protein expression upregulated by 34.0% and 65.6% ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Fucoidan enters foam cells through the clathrin-dependent endocytosis and macropinocytosis pathway, inhibits the activation of mTOR, enhances the activity of PPP3/calcineurin, promotes the dephosphorylation and translocation of TFEB into the nucleus, and then upregulates the expression of autophagy-lysosome pathway-related genes (AP-3, AP-4, MCOLN1 and LAMP-2), enhances the lysosomal function, and ultimately effectively reduces the lipid accumulation in foam cells.

[**KEY WORDS**] atherosclerosis; autophagy-lysosome; lipid accumulation; fucoidan; endocytosis; transcription factor EB

动脉粥样硬化(atherosclerosis,As)是一种以动脉内膜脂质沉积为特征的慢性炎症性疾病,巨噬细胞泡沫化是该病发生发展早期的关键事件[1]。其中,转录因子 EB(transcription factor EB,TFEB)介导的自噬-溶酶体途径,在脂质调控过程中发挥着重要作用[2]。正常生理条件下,TFEB 主要以磷酸化状态存在于细胞质中;当细胞受到饥饿等刺激时,TFEB 发生去磷酸化并进入细胞核,激活下游自噬和溶酶体相关靶基因的表达,形成包裹脂滴的自噬小体,与溶酶体融合后水解为游离脂肪酸和甘油,进而实现脂质降解[3]。因此,靶向激活 TFEB-自噬-溶酶体途径是防治 As 的重要机制之一。岩藻聚糖具有丰富且优异的药理活性,可通过抑制胆固醇合成、促进胆固醇逆向转运及增强自噬等方式发挥抗 As 活性[4-6]。本课题组前期研究发现,巨胞饮途径、网格蛋白和小窝蛋白介导的内吞作用,均参与岩藻聚糖的吸收与转运过程[7-9],且岩藻聚糖可通过上调 TFEB 表达激活自噬,减轻泡沫细胞内的脂质蓄积[5]。但岩藻聚糖具体通过何种途径调控 TFEB,进而影响自噬-溶酶体途径介导的脂质降解,仍需进一步探究。

1 材料和方法

1.1 药物和试剂

从墨角藻中提取的岩藻聚糖(Sigma-Aldrich);氧化型低密度脂蛋白[(oxidized low density lipoprotein,ox-LDL),安宇生物];RAW264.7 小鼠巨噬细胞系(中国科学院细胞库);细胞培养相关耗材(康宁公司);DMEM 培养基、青霉素-链霉素双抗溶液(HyClone);胎牛血清(BioIndustries);0.22 μm 孔径滤膜(Millipore);甲基-β-环糊精(methyl-β-cyclodextrin,mβCD)、秋水仙碱(Colchicine)、环丙沙星(索莱宝);5-(N-乙基-N-异丙基)阿米洛利[5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride,EIPA]、MHY-1485(MedChemExpress);环孢菌素 A(ciclosporin A,CsA)、TRIzol(Sangon Biotech);PCR 试剂盒(Solarbio);溶酶体相关膜蛋白 2[(lysosome-associated membrane protein-2,LAMP-2),万利生物];TFEB(Abcam);细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒、GAPDH 抗体、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)一抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体或抗鼠二抗、超敏化学发光试剂盒(Beyotime)。

1.2 MTT 法检测 ox-LDL 和岩藻聚糖的细胞毒性

取对数期 RAW264.7 细胞,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基制备成密度为 5×10^4 cells/mL 的单细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 100 μL,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。弃去原培养液,分别加入 ox-LDL 和岩藻聚糖,使二者终剂量分别为 0、20、40、60、80 及 100 mg/L 和 0、50、100、200、400 及 800 mg/L,每个浓度设置 3 个复孔,继续培养 48 h。培养结束后,每孔避光加入 10 μL MTT 试剂,37 ℃孵育 4 h,弃去上清。每孔加入 100 μL DMSO,涡旋震荡混匀 10 min。使用酶标仪,以 570 nm 为检测波长、630 nm 为参比波长检测吸光度,计算细胞存活率。

1.3 巨噬细胞源性泡沫细胞模型的构建

取对数期 RAW264.7 细胞,以 8×10^4 cells/mL

的密度接种于96孔板或6孔板中，培养12 h后更换为含80 mg/L ox-LDL的新鲜完全培养基，诱导处理24 h以促进细胞内脂质蓄积，完成泡沫细胞模型的构建[10]。

1.4 泡沫细胞脂质蓄积的检测

按照1.3所述方法构建泡沫细胞模型后，用PBS洗涤细胞3次，以4%多聚甲醛固定细胞，将细胞与油红O溶液在室温下孵育30 min，再用PBS洗涤3次，于倒置显微镜下观察并拍照。按照1.3所述方法构建泡沫细胞模型后，采用胆固醇检测试剂盒检测胆固醇含量，并计算胆固醇酯含量。

1.5 Western blot 检测

采用添加PMSF的RIPA裂解液冰浴裂解细胞30 min，于4 ℃、12 000 g离心10 min后收集上清。细胞质蛋白与核蛋白则按照试剂盒说明书提取：细胞经预冷PBS洗涤、离心收集沉淀后，加入含1 mmol/L PMSF的细胞浆蛋白抽提试剂A，冰浴10 min，再加入抽提试剂B，冰浴1 min，经4 ℃、12 000 g离心5 min后，所得上清即为细胞浆蛋白；将沉淀重悬于添加PMSF的细胞核蛋白抽提试剂中，在冰浴条件下间断剧烈振荡30 min，经4 ℃、12 000 g离心10 min后，所得上清即为核蛋白。上述操作均在冰上或4 ℃环境中进行，最后采用BCA法测定各组分的蛋白浓度。

将分离后的蛋白质经SDS-PAGE电泳分离，转移至PVDF膜，用脱脂牛奶封闭2 h后，分别与抗GAPDH、TFEB、PCNA、LAMP-2的一抗室温孵育2 h，再用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或抗鼠二抗孵育2 h，随后使用超敏化学发光试剂盒显影得到蛋白条带，最后采用Image J软件对条带进行量化分析。

1.6 抑制内吞途径对岩藻聚糖调控泡沫细胞脂质蓄积的影响

按照1.3所述方法构建泡沫细胞模型，分为空白组、模型组和抑制剂组，每孔设置3个复孔；抑制剂组分别加入6.25 mg/L氯丙嗪(chlorpromazine，CPZ)、2.5 g/L mβCD、3.125 mg/L EIPA和10 μg/L秋水仙碱处理2 h；除空白组和模型组更换为普通培养基外，抑制剂组更换为含800 mg/L岩藻聚糖的完全培养基，继续培养24 h。采用1.4中的检测方法测定泡沫细胞脂质蓄积；采用Western blot检测PCNA、TFEB相关蛋白的表达水平。各抑制剂的工作浓度参考本课题组前期研究[7-9,11]及已有文献[12]报道确定。

1.7 TFEB 磷酸化对岩藻聚糖调控泡沫细胞脂质蓄积的影响

按照1.3所述方法构建泡沫细胞模型，分为空白组、模型组和磷酸化调节剂组，每孔设置3个复孔；磷酸化调节剂组分别加入MHY-1485和CsA处理2 h；除空白组和模型组更换为普通培养基外，磷酸化调节剂组更换为含800 mg/L岩藻聚糖的完全培养基，继续培养24 h。采用1.4中的检测方法测定泡沫细胞脂质蓄积；采用Western blot检测PCNA、TFEB相关蛋白的表达水平。

1.8 Lyso-Tracker Red 法检测岩藻聚糖调控下的溶酶体功能

按照1.3所述方法构建泡沫细胞模型后弃去培养基，空白组更换为普通培养基，其余两组分别更换为含800 mg/L岩藻聚糖和100 nmol/L巴佛洛霉素A1的培养基继续培养。分别在0 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h和24 h取出培养板，吸去培养基，每孔加入1 mL Lyso-Tracker Red工作液，孵育10 min后吸去工作液，每孔重新加入1 mL培养基，置于荧光显微镜下拍照。

1.9 岩藻聚糖调控自噬-溶酶体通路相关基因的表达检测

实验分为空白组、模型组、低剂量组(ox-LDL+400 mg/L岩藻聚糖)、高剂量组(ox-LDL+800 mg/L岩藻聚糖)，每组设置3个复孔。取处于对数生长期的RAW264.7细胞，以5×10^4 cells/mL的密度接种于6孔板中培养24 h。除空白组外，其余各组均加入80 mg/L ox-LDL，继续培养24 h后弃培养基；除空白组和模型组不作处理，其余各组分别加入对应浓度的岩藻聚糖，继续培养24 h。培养结束后，采用TRIzol试剂提取总RNA，依次完成反转录与PCR扩增，引物序列见表1。

表1. 相关mRNA引物序列

Table 1. Related mRNA primer sequences

项目	引物序列(5′-3′)	扩增产物大小/bp
MCOLN1	Forward：TCCAGCTGAAGACAATTAACCT	53
	Reverse：GTGCGCTTTATTGTCAAATGTG	53
AP-3	Forward：CATCTGTAGCCAGTCCAACTAC	55
	Reverse：CATAGAGCACCTCACAGATACC	55
AP-4	Forward：GCTTGGACATGTCTGATGTTTT	53
	Reverse：TGGTTTTAAAGGTGCGTATGTG	53
LAMP-2	Forward：GTGTGTGAAGAAGACCAAACTC	54
	Reverse：CTAATGCTGTAGTTTCCAACGG	54
β-actin	Forward：CTACCTCATGAAGATCCTGACC	54
	Reverse：CACAGCTTCTCTTTGATGTCAC	53

1.10　统计学分析

采用 SPSS 软件完成统计分析。所有实验独立重复 3 次，结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用 Student's t 检验或单因素方差分析，后续使用 Bonferroni 法进行事后检验，以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结　果

2.1　岩藻聚糖可剂量依赖性降低泡沫细胞中的脂质蓄积

采用 MTT 法分别检测 ox-LDL 与岩藻聚糖对 RAW264.7 细胞的细胞毒性。结果显示，ox-LDL 和岩藻聚糖分别以 0～100 mg/L 和 0～800 mg/L 的剂量处理 RAW264.7 细胞 24 h 后，细胞存活率均未出现显著变化，说明该剂量范围内 ox-LDL 和岩藻聚糖均无明显细胞毒性（图 1A-B）。采用 ox-LDL 诱导 RAW264.7 细胞建立泡沫细胞模型，通过油红 O 染色与胆固醇酯含量测定，评估岩藻聚糖对泡沫细胞脂质蓄积的影响。结果显示，模型组细胞存在显著脂质蓄积，油红 O 染色可观察到大量脂滴形成，胆固醇酯含量高达 60.05%。经不同剂量岩藻聚糖干预后，泡沫细胞内的脂质蓄积明显减轻，脂滴数量显著减少：当岩藻聚糖剂量为 400 mg/L 时，细胞胆固醇酯含量降至 34.32%（$P<0.001$）；当岩藻聚糖剂量提升至 800 mg/L 时，胆固醇酯含量进一步降至 27.71%（$P<0.001$）。作为阳性对照，经 342.3 mg/L 海藻糖处理后，细胞胆固醇酯含量降至 22.95%，与空白组的 21.36% 接近（图 1C-H）。

上述结果表明，ox-LDL 和岩藻聚糖均无细胞毒性，且岩藻聚糖可通过剂量依赖性方式减少泡沫细胞中的脂质蓄积。

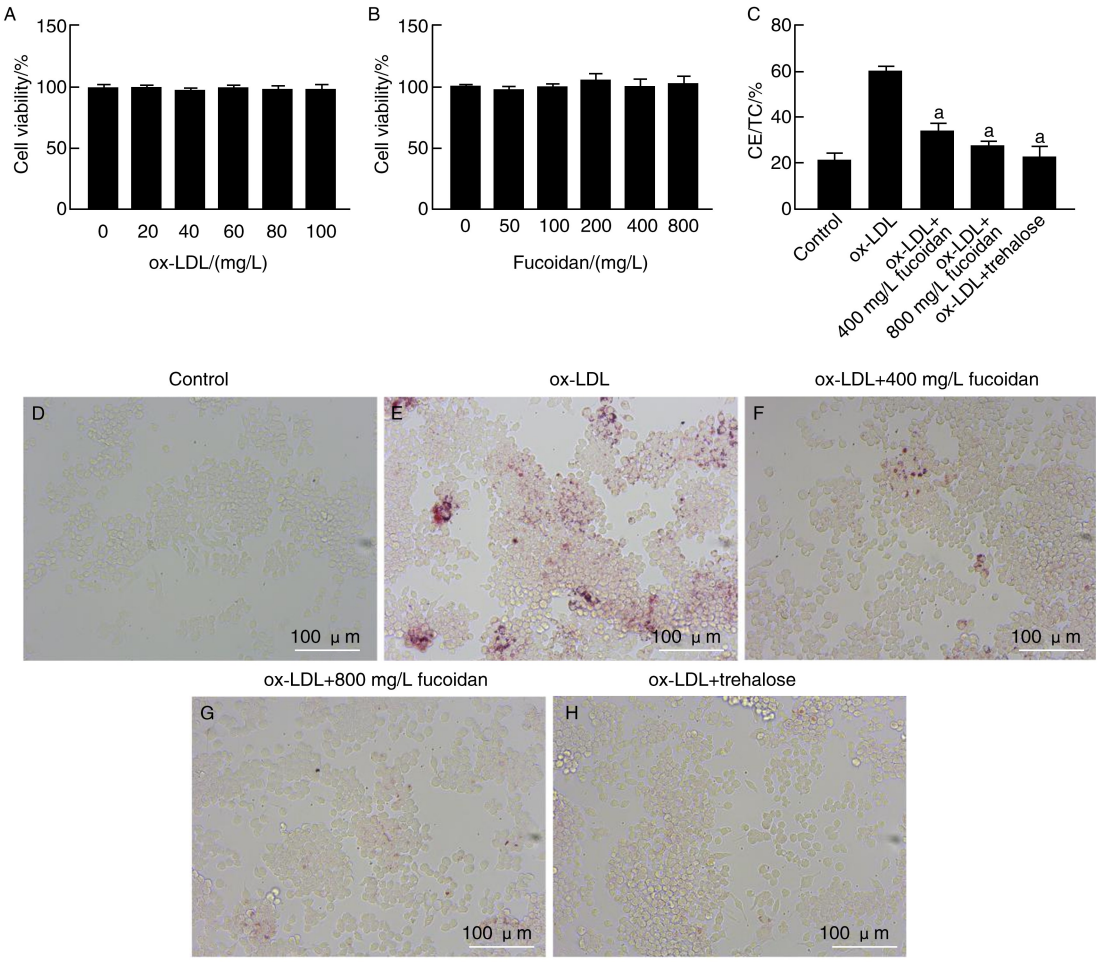


图 1. ox-LDL 和岩藻聚糖的细胞毒性及岩藻聚糖对泡沫细胞脂质蓄积的影响（$n=3$）

A：ox-LDL 的细胞毒性测定结果；B：岩藻聚糖的细胞毒性测定结果；C：胆固醇酯含量测定结果；D-H：油红 O 染色结果。a 为 $P<0.001$，与模型组（ox-LDL 组）比较。

Figure 1. Cytotoxicity of ox-LDL and fucoidan and the effect of fucoidan on lipid accumulation in foam cells（$n=3$）

2.2 岩藻聚糖通过网格蛋白与巨胞饮介导的内吞途径发挥降脂作用

为进一步探究岩藻聚糖的降脂作用是否依赖细胞内吞过程，采用 4 种内吞抑制剂分别阻断不同内吞途径，通过油红 O 染色评估其对岩藻聚糖降脂效果的影响。结果显示，空白组、岩藻聚糖组及 mβCD 组细胞内脂滴较少，未见明显脂滴积累；模型组、CPZ 组、EIPA 组及秋水仙碱组均出现大量脂滴蓄积。与岩藻聚糖组相比，CPZ 组、EIPA 组、mβCD 组及秋水仙碱组胆固醇酯含量分别升高 21.67%（$P<0.01$）、10.58%（$P<0.05$）、2.10% 及 36.83%（$P<0.001$），该结果与油红 O 染色的观察结果一致（图 2）。

上述结果表明，岩藻聚糖主要通过网格蛋白介导的内吞途径和巨胞饮途径进入细胞并发挥降脂作用，与脂筏介导的内吞途径关联较弱；同时，抑制胞内转运过程可显著阻断岩藻聚糖的生物活性。

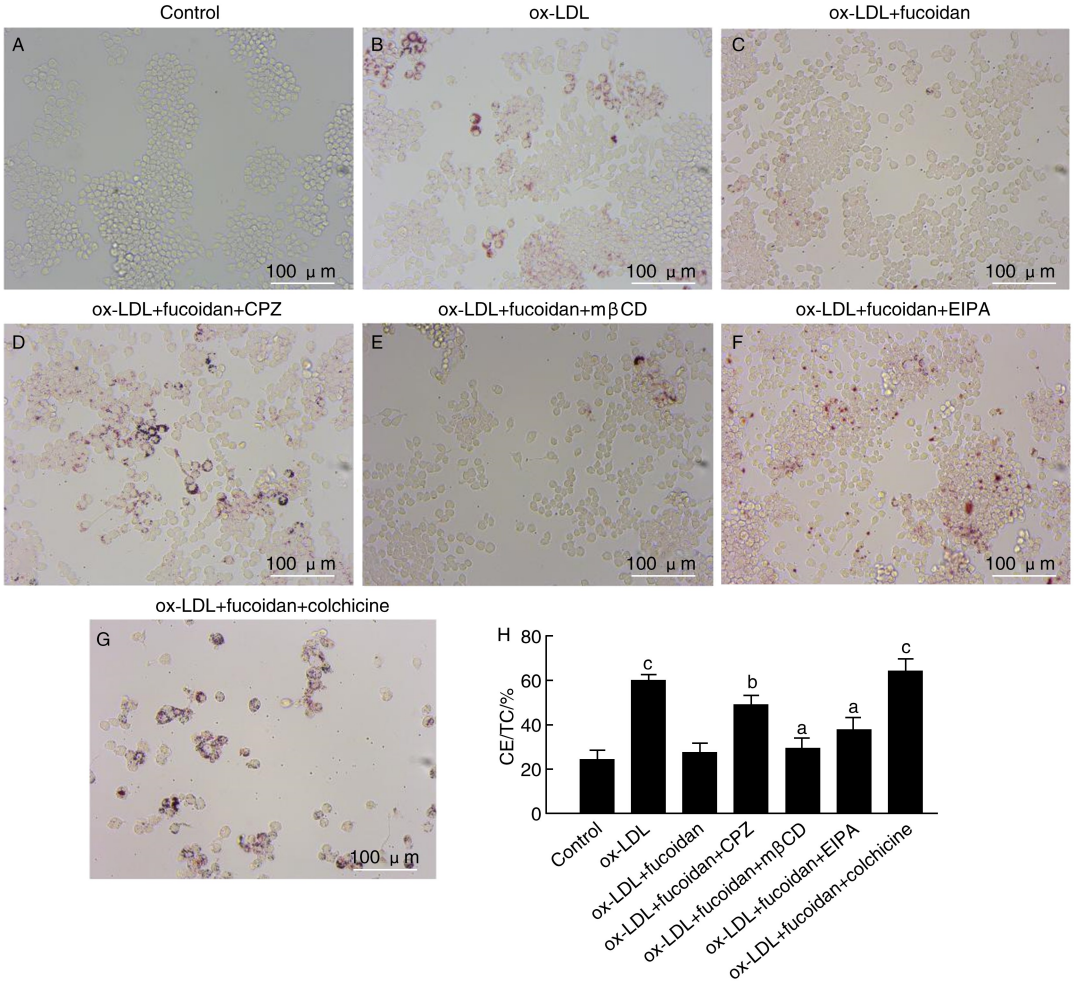


图 2. 不同内吞抑制剂对岩藻聚糖降脂效果的影响（$n=3$）

A-G：油红 O 染色结果；H：胆固醇酯含量测定结果。

a 为 $P<0.05$，b 为 $P<0.01$，c 为 $P<0.001$，与岩藻聚糖组（ox-LDL+fucoidan 组）比较。

Figure 2. Effects of different endocytosis inhibitors on the lipid-lowering effect of fucoidan（$n=3$）

2.3 岩藻聚糖通过调控 TFEB 核转位发挥降脂作用

研究表明，TFEB 只有转位至细胞核才能发挥生物学功能[13]，为进一步明确不同内吞途径对岩藻聚糖发挥作用的贡献，采用 Western blot 检测各组细胞中 TFEB 的蛋白表达水平。结果显示，与空白组及模型组相比，岩藻聚糖处理可显著提升细胞核内 TFEB 的含量；但除 mβCD 组外，经 CPZ、EIPA 和秋水仙碱三种内吞抑制剂处理后，各组核内 TFEB 水平分别降低 24.02%、12.70% 和 47.79%（$P<0.05$ 或 $P<0.001$）。这些结果提示，CPZ 与秋水仙碱可显著抑制岩藻聚糖的作用，EIPA 也会对其功能产生一定影响（图 3）。

结合内吞抑制剂对泡沫细胞脂质代谢的影响，上述结果提示，岩藻聚糖主要通过网格蛋白依赖的

内吞途径和巨胞饮途径进入细胞，通过影响 TFEB 核转位发挥降脂作用。此外，抑制微管依赖的胞内转运也可显著阻断岩藻聚糖的作用。

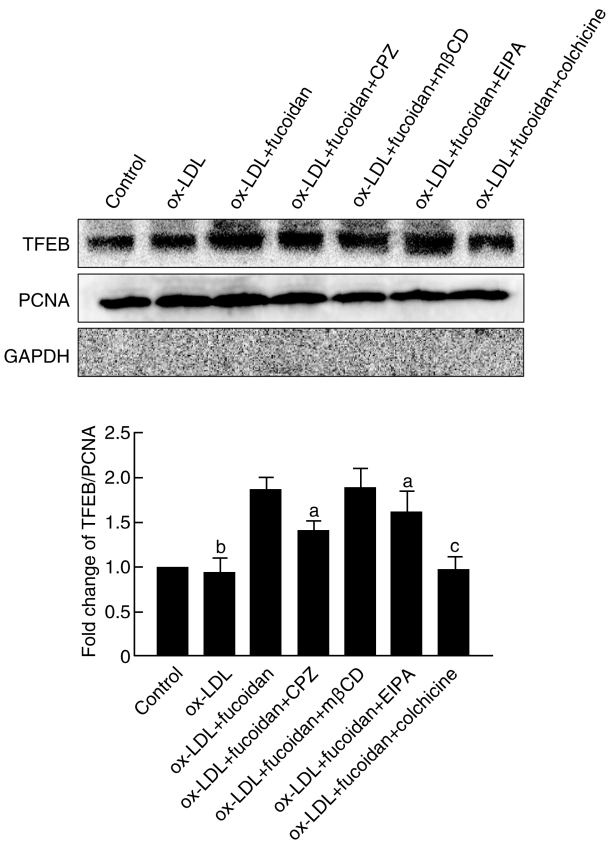


图 3. 不同内吞抑制剂对岩藻聚糖作用的影响（$n=3$）

a 为 $P<0.05$，b 为 $P<0.01$，c 为 $P<0.001$，与岩藻聚糖组（ox-LDL+fucoidan 组）比较。

Figure 3. Effects of different endocytosis inhibitors on the action of fucoidan（$n=3$）

2.4　岩藻聚糖通过调控雷帕霉素靶蛋白和钙调磷酸酶活性促进 TFEB 去磷酸化及核转位

TFEB 只有经过去磷酸化才能进入细胞核发挥功能，其磷酸化状态受雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）和钙调磷酸酶调控[14]。为明确岩藻聚糖是否通过该磷酸化途径调控 TFEB，采用 mTOR 激动剂 MHY1485 和钙调磷酸酶抑制剂 CsA 进行干预。结果显示，经 CsA 或 MHY1485 处理后，细胞核内的 TFEB 含量显著降低，与岩藻聚糖单独处理组相比，分别下降了 26.12% 和 50.02%（$P<0.05$ 或 $P<0.001$；图 4）。

鉴于 MHY1485 可以激活 mTOR、CsA 能够抑制钙调磷酸酶活性，上述结果提示，岩藻聚糖促进 TFEB 去磷酸化的作用，很可能与其调节 mTOR 及钙调磷酸酶的功能有关。

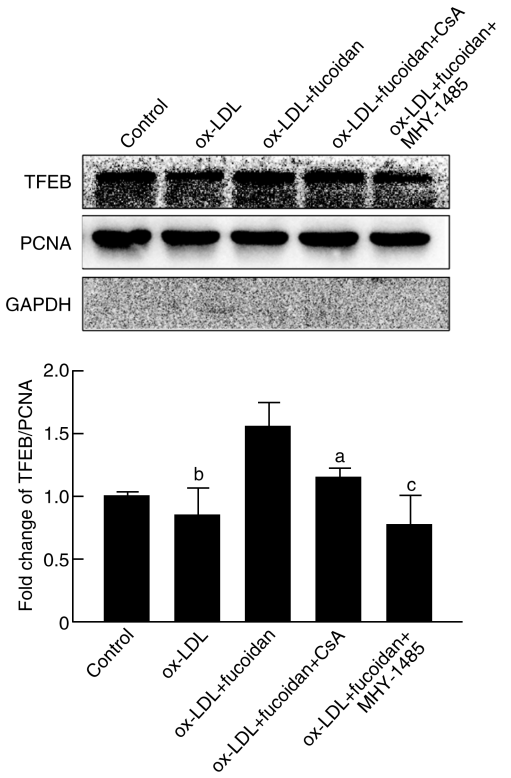


图 4. 不同磷酸化调节剂对岩藻聚糖作用的影响（$n=3$）

a 为 $P<0.05$，b 为 $P<0.01$，c 为 $P<0.001$，与岩藻聚糖组（ox-LDL+fucoidan 组）比较。

Figure 4. Effects of different phosphorylation regulators on the action of fucoidan（$n=3$）

油红 O 染色结果验证了上述结果，经 CsA 或 MHY-1485 处理后，岩藻聚糖未能有效减少泡沫细胞中的脂质蓄积，细胞中仍可见大量脂滴（图 5A-E）。胆固醇酯含量测定结果进一步表明，CsA 和 MHY-1485 的干预均显著抑制岩藻聚糖的降脂效果（图 5F）。上述结果表明，CsA 和 MHY-1485 可以阻断岩藻聚糖的降脂作用。由于 CsA 可抑制钙调磷酸酶活性、MHY-1485 可激活 mTOR，二者均能促进 TFEB 磷酸化，据此推测，岩藻聚糖的降脂效应可能依赖于其对 mTOR 通路及钙调磷酸酶通路的调控。

2.5　岩藻聚糖改善溶酶体功能促进泡沫细胞脂质分解

为进一步明确岩藻聚糖对溶酶体功能的影响，采用 Lyso-Tracker Red 荧光探针检测溶酶体活性。结果显示，巴佛洛霉素 A1 处理后，溶酶体活性受到抑制，且功能随时间延长逐渐丧失；而岩藻聚糖处理后，最初约 2 h 内溶酶体功能出现轻微下降，但随作用时间延长，溶酶体功能显著增强。推测溶酶体

功能先降后升，是因为岩藻聚糖内吞初期会造成一过性应激，随后 TFEB 入核激活溶酶体生物发生[15]，形成适应性代偿，最终使溶酶体功能回升并超过基线水平（图 6）。

上述结果表明，岩藻聚糖在短期作用下可能引发溶酶体应激，导致溶酶体活性暂时降低；而长期作用则可显著改善溶酶体功能，进而促进泡沫细胞内的脂质分解。

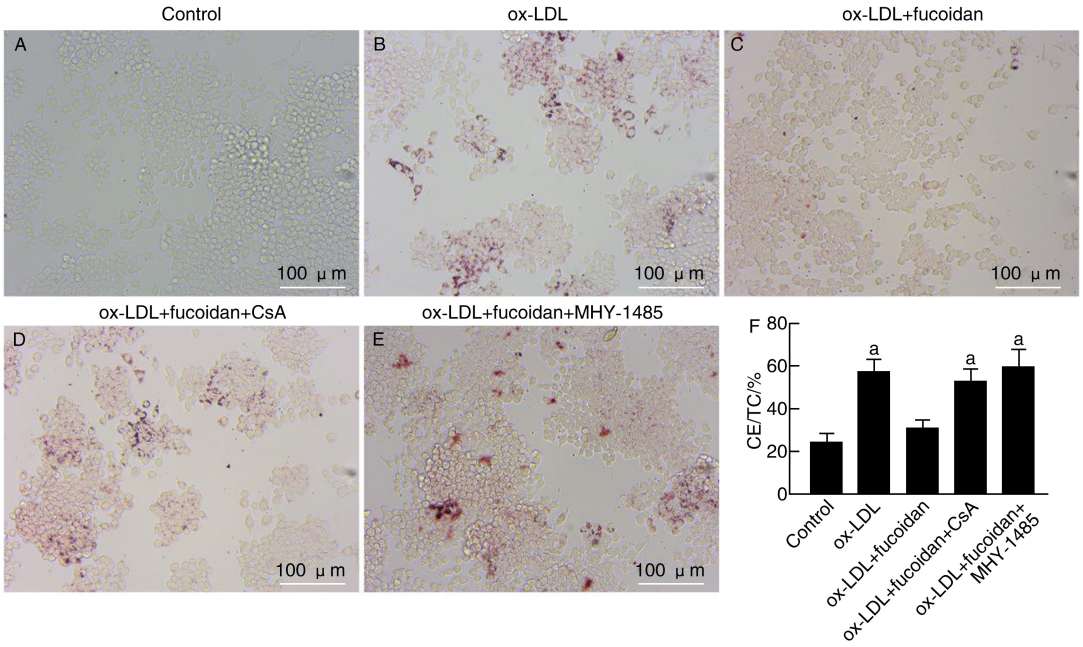


图 5. TFEB 磷酸化对岩藻聚糖降脂效果的影响（$n=3$）

A-E：油红 O 染色结果；F：胆固醇酯含量测定结果。a 为 $P<0.001$，与岩藻聚糖组（ox-LDL+fucoidan 组）比较。

Figure 5. Effects of TFEB phosphorylation on the lipid-lowering effect of fucoidan（$n=3$）

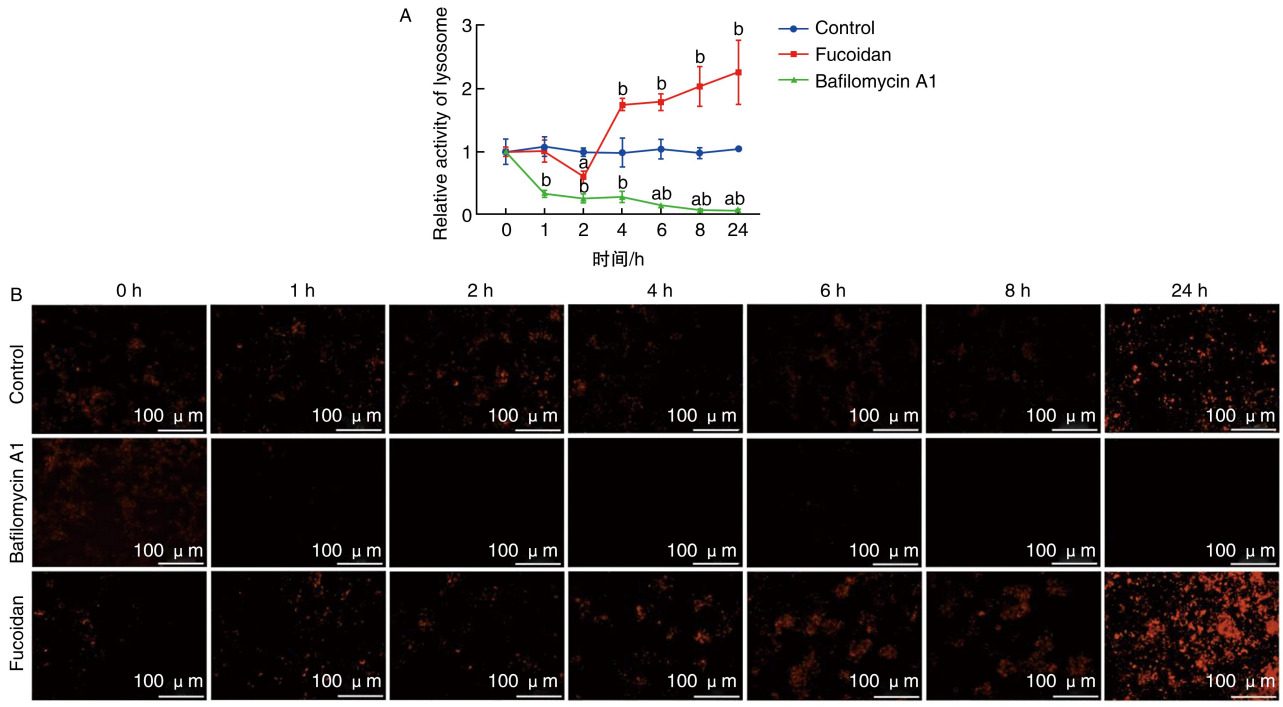


图 6. 岩藻聚糖对溶酶体功能的影响（$n=3$）

a 为 $P<0.05$，b 为 $P<0.01$，与空白组比较。

Figure 6. Effects of fucoidan on lysosomal function（$n=3$）

2.6　岩藻聚糖上调溶酶体通路关键基因增强溶酶体功能促进泡沫细胞自噬

已有研究显示,岩藻聚糖可激活 TFEB 信号通路,恢复细胞自噬流水平[16]。衔接蛋白复合物(adaptor protein,AP)负责将目标蛋白分选并包裹入转运囊泡,其中 AP-3 可将目标蛋白靶向运送至溶酶体,AP-4 则参与溶酶体膜蛋白的分选过程[17]。黏脂蛋白 1(mucolipin 1,MCOLN1)是定位于溶酶体的 Ca^{2+} 通道蛋白,负责维持溶酶体钙库及 pH 稳态[18]。LAMP-2 是调控溶酶体生物发生以及自噬-溶酶体融合过程的关键分子[19]。本研究采用 qRT-PCR 检测溶酶体相关基因 AP-3、AP-4、MCOLN1 及 LAMP-2 的表达水平,结果显示,经岩藻聚糖干预后,上述基因的 mRNA 表达水平显著提升,高剂量组的表达量分别达到空白组的 186.5%、344.6%、107.6% 和 312.0%(均 $P<0.001$;图 7A-D)。Western blot 检测 LAMP-2 蛋白表达水平结果显示,与空白组相比,ox-LDL 诱导的泡沫细胞模型中 LAMP-2 蛋白表达略有下降,但差异无统计学意义;经岩藻聚糖干预后,LAMP-2 蛋白表达显著上调。与模型组相比,低剂量和高剂量岩藻聚糖干预分别使 LAMP-2 蛋白表达提升 34.0% 和 65.6%($P<0.05$ 或 $P<0.01$;图 7E-F),提示岩藻聚糖可显著上调泡沫细胞中 LAMP-2 的表达,进而可能提升溶酶体活性。

上述结果表明,岩藻聚糖可通过上调 LAMP-2 等溶酶体通路相关基因的表达,增强溶酶体功能,进而促进泡沫细胞的自噬过程。

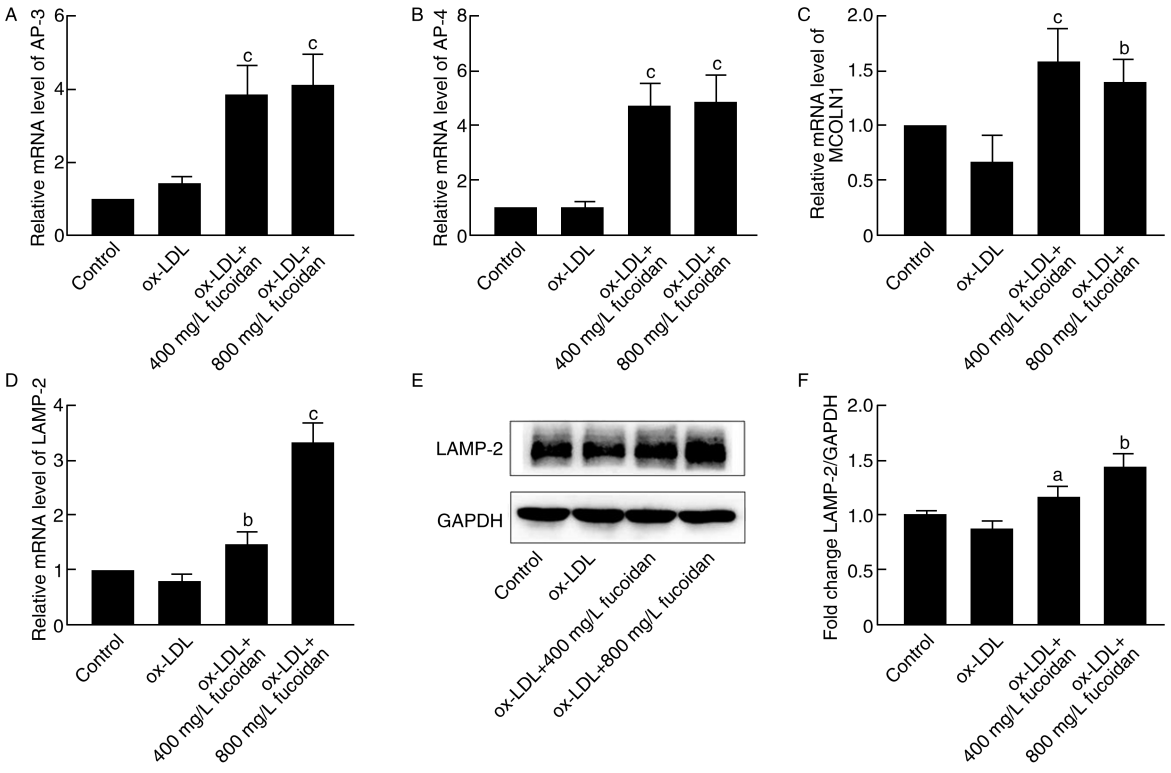


图 7. 岩藻聚糖对溶酶体相关基因和蛋白的影响($n=3$)

a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,c 为 $P<0.001$,与模型组(ox-LDL 组)比较。

Figure 7. Effects of fucoidan on lysosome-associated genes and proteins ($n=3$)

3　讨　论

TFEB 属于 MiTF/TFE 转录因子家族,是一类含有 bHLH-Zip 结构域的转录因子,可调控溶酶体生物发生及功能相关基因的表达[13]。溶酶体相关基因的启动子区域普遍存在保守的协调溶酶体表达与调控元件,激活后的 TFEB 可结合该元件及 E-box 位点,协同调控溶酶体基因表达与细胞自噬过程[19]。营养充足时,TFEB 的 Ser142/Ser211 会被 mTORC1 磷酸化,从而滞留在细胞质中;饥饿或应激状态下,TFEB 发生去磷酸化并转移进入细胞核,激活溶酶体相关基因的转录,提升细胞自噬通量[13]。

溶酶体的正常功能依赖于其膜蛋白及目标蛋白转运相关分子的协同作用。AP 可对目标蛋白进

行分选,并将其包裹进入转运囊泡,其中 AP-3 负责将目标蛋白靶向运输至溶酶体,AP-4 参与溶酶体膜蛋白的分选过程[17]。MCOLN1 作为溶酶体 Ca^{2+} 通道蛋白,维持着溶酶体钙库及 pH 稳态[20]。LAMP-2 是参与溶酶体生物发生以及自噬-溶酶体融合过程的关键分子,可维持溶酶体膜稳定、调控溶酶体-吞噬体融合、介导自噬并促进胆固醇外排,其缺失会导致自噬体与溶酶体融合受阻,造成自噬底物大量堆积[21]。上述溶酶体相关基因均由 TFEB 通过 CLEAR 元件进行转录调控,TFEB 入核后可上调 LAMP-2 等基因的表达,促进溶酶体生物发生,保障自噬-溶酶体途径正常发挥功能[13]。

岩藻聚糖是一种来源于海洋的硫酸多糖,主要由岩藻糖聚合而成,具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化等多种生物活性[4]。研究显示,岩藻聚糖可改善 $ApoE^{-/-}$ 小鼠高脂饮食诱导的高脂血症与 As 病变,一方面可通过抑制胆固醇合成、促进胆固醇逆向转运、加快 β-氧化改善脂代谢异常,另一方面可增强 SQSTM1 依赖的选择性自噬、抑制 NLRP3 炎症小体活化,从而缓解 As 进展[3]。

本课题组前期研究发现,巨胞饮途径、网格蛋白和小窝蛋白介导的内吞作用参与了岩藻聚糖的细胞吸收与转运过程[7-9],且岩藻聚糖可通过上调 TFEB 表达激活自噬,减轻泡沫细胞脂质蓄积[5,13]。但岩藻聚糖具体通过何种途径调控 TFEB,进而影响自噬-溶酶体途径介导的脂质降解,仍有待进一步探究。本研究以 ox-LDL 诱导 RAW264.7 巨噬细胞建立泡沫细胞模型,旨在明确岩藻聚糖进入细胞的途径,以及其对 TFEB 的调控机制。

首先,本研究探讨岩藻聚糖的降脂作用是否依赖内吞途径:使用 CPZ、mβCD、EIPA 和秋水仙碱分别抑制网格蛋白介导的内吞、小窝蛋白途径、巨胞饮及微管功能。结果显示,除 mβCD 外,其余 3 种抑制剂均可削弱岩藻聚糖的降脂作用,表明岩藻聚糖主要经网格蛋白和巨胞饮途径内吞进入细胞,并通过微管转运至溶酶体发挥生物学功能。内吞与 TFEB 激活之间可能存在信号耦联。在氨基酸刺激下,Ragulator-Rag 复合物将 mTORC1 招募至溶酶体膜,溶酶体腔内的氨基酸水平通过“v-ATPase-Ragulator”调控 mTORC1 活化[22]。巨胞饮体可将胞外氨基酸递送至内吞溶酶体,进而激活 mTORC1[23]。因此推测,岩藻聚糖经上述途径内吞后汇集于溶酶体,可能会减弱 mTORC1 在溶酶体膜上的活化,从而促进 TFEB 去磷酸化与核转位;CPZ 与 EIPA 可部分阻断 TFEB 核转位,这与该模型吻合,但二者的直接联系仍需进一步研究证实。其次,本研究探讨岩藻聚糖促进 TFEB 入核的作用机制。MHY-1485 可激活 mTORC1 促进 TFEB 磷酸化,CsA 可抑制钙调磷酸酶活性阻断 TFEB 去磷酸化。两种调节剂处理后,岩藻聚糖处理组核内 TFEB 含量均显著降低,细胞脂质蓄积程度加重,表明岩藻聚糖促进 TFEB 入核的作用依赖于对 mTORC1 和钙调磷酸酶的调控。目前尚无直接证据表明岩藻聚糖可直接结合 mTOR 和钙调磷酸酶发挥调控作用,推测该调控作用经间接信号介导:一方面,岩藻聚糖可激活 AMPK,AMPK 通过磷酸化 TSC2 和 Raptor 抑制 mTORC1,进而促进 TFEB 核转位、增强细胞自噬,构成了“AMPK-mTORC1 抑制-TFEB 激活”的上游调控机制[24-25]。另一方面,岩藻聚糖汇集于溶酶体后,可能通过 MCOLN1 介导 Ca^{2+} 释放,进而激活钙调磷酸酶催化 TFEB 去磷酸化,这与本研究中 CsA 的阻断效应相吻合。不过,阻断任意一条通路虽可逆转岩藻聚糖的作用,但不足以证明单一通路激活即可重现该效应,仍需开展正向验证,并借助 CETSA、SPR 及体外激酶活性检测等手段明确其直接靶点。最后,Lyso-Tracker Red 检测显示岩藻聚糖可显著改善溶酶体功能,其中与溶酶体功能相关的 MCOLN1、AP-3、AP-4 及 LAMP-2 等基因和蛋白表达显著上调。

岩藻聚糖处理后,溶酶体相关蛋白和基因表达上调,进一步印证了岩藻聚糖可改善溶酶体功能。本研究观察到溶酶体功能呈现先降低后升高的变化规律,推测这反映了“溶酶体应激-TFEB 激活-溶酶体生物发生”的负反馈调节过程:岩藻聚糖内吞进入细胞后,短期内会增加溶酶体底物负荷、干扰腔内稳态,引发一过性应激反应;该应激经“溶酶体-细胞核”信号通路抑制 mTORC1 活性,促进 TFEB 去磷酸化入核,进而上调溶酶体与自噬相关基因的表达[15]。此外,TFEB 入核后可转录上调 MCOLN1,MCOLN1 介导的 Ca^{2+} 释放可通过钙调磷酸酶进一步增强 TFEB 活性,从而形成正反馈调控[18]。因此,处理 2 h 后溶酶体功能回升并超过基线水平,这是 TFEB 驱动溶酶体生物发生,对初期应激产生的适应性代偿结果。

基于上述研究与讨论,图 8 总结概括了岩藻聚糖调控泡沫细胞脂质代谢的工作模型:岩藻聚糖(橙色)经网格蛋白介导的内吞及巨胞饮被泡沫细胞摄取,以内吞体形式沿微管与溶酶体融合;因此推测,进入溶酶体后,岩藻聚糖会在短期内增加底物负荷、诱发一过性应激,继而通过“溶酶体-细胞核”反馈通路抑制 mTORC1 活性,并协同钙调磷酸酶促进 TFEB 去磷酸化入核;入核后的 TFEB 可结合 CLEAR 元件上调 LAMP、ATG 等基因表达,促进

溶酶体生物发生与自噬流，加速脂质分解、减少胆固醇蓄积，最终发挥抗 As 作用。

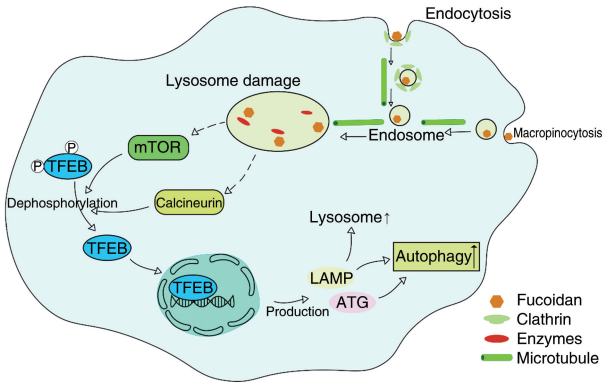


图 8. 岩藻聚糖降低动脉粥样硬化中泡沫细胞脂质蓄积机制

Figure 8. Mechanism of fucoidan in reducing lipid accumulation in foam cells during atherosclerosis

综上所述，本研究阐明了岩藻聚糖通过 TFEB-溶酶体-自噬通路减轻泡沫细胞脂质蓄积的作用机制，为将岩藻聚糖开发为延缓 As 进展的潜在膳食干预或辅助治疗策略提供了理论依据。目前溶酶体应激及其上游信号调控环节仍属于推测范畴，其分子作用细节与体内效应将作为后续研究方向开展探索。

[参考文献]

[1] Libby P, Buring J E, Badimon L, et al. Atherosclerosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 56.

[2] Iavazzo M, Cinque L, Levantovsky S, et al. TFEB coordinates autophagosome biogenesis and ribophagy during starvation via SQSTM1 [J]. Sci Adv, 2026, 12(1): eaea9302.

[3] 刘惠美, 彭国龙, 欧阳雪倩, 等. 选择性自噬和动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(9): 737-745.
Liu H M, Peng G L, Ouyang X Q, et al. Advances in selective autophagy and atherosclerosis[J]. Chin J Atherosclerosis, 2023, 31(9): 737-745.

[4] Zhao J R, Cao Q, Xing M C. Advances in the study of marine products with lipid-lowering properties[J]. Mar Drugs, 2020, 18(8): 390.

[5] Zhao J R, Hu B, Xiao H. Fucoidan reduces lipid accumulation by promoting foam cell autophagy via TFEB[J]. Carbohydrate Polymers, 2021, 268: 118247.

[6] Cheng Y F, Pan X D, Wang J. Fucoidan inhibits NLRP3 inflammasome activation by enhancing p62/SQSTM1-dependent selective autophagy to alleviate atherosclerosis[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 3186306.

[7] Bai X, Zhang E, Hu B, et al. Study on absorption mechanism and tissue distribution of fucoidan[J]. Molecules, 2020, 25(5): 1087.

[8] Wang Y, Bai X, Hu B, et al. Transport mechanisms of polymannuronic acid and polyguluronic acid across Caco-2 cell monolayers[J]. Pharmaceutics, 2020, 12(2): 167.

[9] Yang Q, Xing M, Wang K, et al. Application of fucoidan in Caco-2 model establishment[J]. Pharmaceuticals, 2022, 15(4): 418.

[10] 胡 波. 岩藻聚糖硫酸酯促进泡沫细胞自噬分解脂质的作用机制研究[D]. 山东大学, 2020.
Hu B. Research on the mechanism of fucoidan sulfate in promoting autophagic lipid breakdown in foam cells[D]. Shandong University, 2020.

[11] Song S, Wang Y, Wang H, et al. Fucoidan-induced reduction of lipid accumulation in foam cells through overexpression of lysosome genes[J]. Int J Biol Macromol, 2024, 263(Pt 2): 130451.

[12] Srivastava L, Tundup S, Choi B S, et al. Immunomodulatory glycan lacto-N-fucopentaose Ⅲ requires clathrin-mediated endocytosis to induce alternative activation of antigen-presenting cells [J]. Infection and immunity, 2014, 82(5): 1891-903.

[13] 李慧娟, 王 云, 邝彤东, 等. 转录因子 EB 在调控脂质代谢中的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(5): 378-384.
Li H J, Wang Y, Kuang T D, et al. Research progress on transcription factor EB in regulating lipid metabolism[J]. Chin J Arterioscler, 2025, 33(5): 378-384.

[14] Franco-Juárez B, Coronel-Cruz C, Hernández-Ochoa B, et al. TFEB: beyond its role as an autophagy and lysosomes regulator [J]. Cells, 2022, 11(19): 3153.

[15] Settembre C, Zoncu R, Medina D L, et al. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB[J]. EMBO J, 2012, 31(5): 1095-1108.

[16] Qu H, Zhao X, Wang Y, et al. Fucoidan protects against cadmium-induced cytotoxicity in PK-15 cells by restoring autophagic flux: involvement of the TFEB signaling pathway [J]. Toxics, 2026, 14(5): 430.

[17] Mattera R, De Pace R, Bonifacino J S. The role of AP-4 in cargo export from the trans-Golgi network and hereditary spastic paraplegia [J]. Biochem Soc T, 2020, 48(5): 1877-1888.

[18] Nan S, Peng C, Meng X, et al. Targeting lipophagy in atherosclerosis: molecular mechanisms, pathogenesis and therapeutic interventions (Review)[J]. 2026, 34(1): 208.

[19] Lee J J, Ishihara K, Notomi S. Lysosome-associated membrane protein-2 deficiency increases the risk of reactive oxygen species-induced ferroptosis in retinal pigment epithelial cells[J]. Biochem Bioph Res Commun, 2020, 521(2): 414-419.

[20] Sterea A M, Almasi S, El Hiani Y. The hidden potential of lysosomal ion channels: a new era of oncogenes[J]. Cell Calcium, 2018, 72: 91-103.

[21] Alessandrini F, Pezze L, Ciribilli Y. LAMPs: shedding light on cancer biology[J]. Semin Oncol, 2017, 44(4): 239-253.

[22] Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids[J]. Cell, 2010, 141(2): 290-303.

[23] Yoshida S, Pacitto R, Yao Y, et al. Growth factor signaling to mTORC1 by amino acid-laden macropinosomes [J]. J Cell Biol, 2015, 211(1): 159-172.

[24] Gao H, Zhou Y, Yu C, et al. Fucoidan alleviated autoimmune diabetes in NOD mice by regulating pancreatic autophagy through the AMPK/mTOR1/TFEB pathway[J]. Iran J Basic Med Sci, 2024, 27(1): 31-38.

[25] Chen M, Wang J, Zhang P, et al. Low molecular weight fucoidan induces M2 macrophage polarization to attenuate inflammation through activation of the AMPK/mTOR autophagy pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2025, 986: 177134.

（此文编辑　文玉珊）