DOI:10.16016/j.2097-0927.202405103

Perilipin 2 在小鼠肝脏 CGI-58 特异性敲除所致肝脏微泡型脂肪变性中的作用

张艺馨[1,2,3],李 杰[1,2],万小勤[1,2],蒋孝清[1,2],陈江慧[1,2],邓 芳[4],李旻典[1,2],张 倩[5],包鑫余[1,2],张志辉[1,2]
400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院:心血管内科代谢生物钟与心血管疾病中心[1],老年心脑血管疾病教育部重点实验室[2],全科医学科[5];400016 重庆,重庆医科大学基础医学院[3];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)高原军事医学系病理生理学教研室[4]

[摘要] **目的** 探究 Perilipin 2(*Plin*2)在肝脏 CGI-58 特异性敲除所致脂肪肝的作用,并比较 *Plin*2 和 *Plin*3 在脂滴生成和脂质蓄积的作用效能。**方法** 将 20 只 7 周龄 CGI-58$^{Flox/Flox}$ 小鼠(雄鼠 10 只,雌鼠 10 只)根据性别采用完全随机分组法分为对照组(NC 组,$n=5$,注射靶向肝脏实现过表达 Cre 蛋白及对照 Micro-RNA 的腺相关病毒)和实验组(Mi-KD 组,$n=5$,注射靶向肝脏实现过表达 Cre 蛋白及靶向 *Plin*2 的 Micro-RNA 的腺相关病毒),记录小鼠体质量变化,检测小鼠代谢相关表型和肝脏病理学的差异,RT-qPCR 检测小鼠肝脏脂质代谢和胆固醇代谢相关基因的改变;以 AML-12 小鼠肝细胞作为细胞模型,构建 SiRNA 实现 AML-12 细胞 *Plin*2/*Plin*3 敲低,Bodipy 染色和酶比色法检测对比正常培养和 OA 诱导下 *Plin*2/*Plin*3 敲低后 AML-12 细胞脂滴生成和脂质蓄积。**结果** Mi-KD 小鼠肝脏中的 PLIN2 蛋白水平降低了 99%以上;Mi-KD 缓解了 CGI-58 特异性敲除雌鼠的肝肿大($P=0.019\ 5$)和肝细胞损伤($P=0.000\ 4$),降低了组织学 NAS 评分($P=0.000\ 2$)和肝脏甘油三酯含量($P=0.016\ 6$),显著改善了肝脏 CGI-58 特异性敲除所致的肝脏微泡型脂肪变性;敲低 *Plin*2 使 AML-12 细胞内甘油三酯含量呈下降趋势,敲低 *Plin*3 显著降低 AML-12 细胞内甘油三酯含量($P=0.001\ 4$);在 OA 诱导下,*Plin*2/*Plin*3 敲低均显著降低 OA 诱导的 AML-12 细胞内甘油三酯的蓄积($P<0.05$)。**结论** 肝脏 *Plin*2 在 CGI-58 敲除所致的微泡型脂肪变性的发展过程中至关重要,*Plin*2 和 *Plin*3 均参与肝细胞脂滴生成与脂质蓄积,且 *Plin*3 的作用强于 *Plin*2。

[关键词] 肝脏微泡型脂肪变性;围脂滴包被蛋白 2;比较鉴定基因-58;钱林-多尔夫曼综合征;脂滴
[中图法分类号] R394.3; R575.5; R589.2 [文献标志码] A

Role of Perilipin 2 in microvesicular hepatic steatosis induced by CGI-58 specific knockout in mice

ZHANG Yixin[1,2,3], LI Jie[1,2], WAN Xiaoqin[1,2], JIANG Xiaoqing[1,2], CHEN Jianghui[1,2], DENG Fang[4], LI Mindian[1,2], ZHANG Qian[5], BAO Xinyu[1,2], ZHANG Zhihui[1,2] [1]Department of Cardiovascular Diseases, Center for Circadian Metabolism and Cardiovascular Diseases, [2]Key Laboratory of Geriatric Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases of Ministry of Education, [5]Department of General Practice, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [3]College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [4]Department of Pathophysiology, Faculty of High Altitude Military Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To explore whether hepatocyte Perilipin-2 (*Plin*2) is involved in the development of fatty liver related to comparative gene identification-58 (CGI-58) deficiency mice and compare the effects of *Plin*2 and *Plin*3 on lipid droplet formation and lipid accumulation. **Methods** Based on

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81873663);重庆市研究生科研创新项目(CYS21515)
[通信作者] 张志辉,E-mail:xyzpj@126.com
包鑫余,E-mail:bxytmmu@126.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

CGI-58$^{Flox/Flox}$ mice as animal model, the adeno-associated viruses targeting mouse liver, CGI-58 knockout and *Plin*2 knockdown were achieved by co-expression Cre protein and micro-RNA targeting *Plin*2 (Mi-KD). Then CGI-58 deficiency mice were used as control (NC) to detect the differences in metabolic phenotype and liver pathology. AML-12 mouse hepatocytes were used as cellular model and interfered with siRNA to achieve *Plin*2/*Plin*3 knockdown in AML-12 cells. Lipid droplet formation and lipid accumulation were compared with Bodipy staining and enzyme colorimetry in basal condition or lipid-overloaded condition (OA inducement) after *Plin*2/*Plin*3 knockdown. **Results** *Plin*2 knockdown (Mi-KD) reduced PLIN2 protein level by >99% in mouse livers. Mi-KD decreased hepatomegaly ($P=0.019\ 5$) and liver injury ($P=0.000\ 4$), while reduced the histological NAS score ($P=0.000\ 2$) and hepatic triglyceride content ($P=0.016\ 6$) in the CGI-58 deficiency female mice. Mi-KD prevented microvesicular hepatic steatosis in the CGI-58 deficient female mice. *Plin*3 knockdown significantly reduced the triglyceride content in basal condition of hepatocytes ($P=0.001\ 4$), and *Plin*2 knockdown just showed a decreased trend. *Plin*2 or *Plin*3 knockdown significantly reduced the triglyceride content separately in lipid-overloaded hepatocytes ($P<0.05$). **Conclusion** Hepatocyte *Plin*2 is essential in the development of microvesicular hepatic steatosis caused by CGI-58 deficiency. Both *Plin*2 and *Plin*3 are involved in lipid droplet formation and lipid accumulation in hepatocytes, and *Plin*3 shows a stronger effect.

[**Key words**] microvesicular hepatic steatosis; Perilipin 2; CGI-58; Chanarin-Dorfman syndrome; lipid droplet

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81873663) and the Scientific Innovation Project of Chongqing Postgraduates (CYS21515). Corresponding author: ZHANG Zhihui, E-mail: xyzpj@126.com; BAO Xinyu, E-mail: bxytmmu@126.com

CGI-58 又称含有 α/β-水解酶结构域的蛋白 5(abhydrolase domain containing 5,ABHD5),在体内各种组织和细胞中广泛表达。CGI-58 是脂肪分解的重要调节因子,能在体外和体内与脂肪甘油三酯脂肪酶(adipose triglyceride lipase,ATGL)相结合,显著增强其甘油三酯水解酶活性[1-2]。人类 CGI-58 基因突变会导致钱林-多尔夫曼综合征(Chanarin-Dorfman syndrome,CDS),这是一种罕见的常染色体隐性遗传疾病。自 1985 年首次发现以来[3],超过 150 例患者被报道[4-6]。约 60%的 CDS 患者集中在地中海沿岸,土耳其占据其中绝大部分[4],在中国[5]和日本[7]也偶有报道。目前对 CDS 尚无有效的治疗方法。

CDS 是一组临床表现具有异质性的遗传疾病,病理特征为脂滴(lipid droplet,LD)在大多数组织的细胞质中异常蓄积,临床表现包括肝肿大(肝脂肪变性和脂肪性肝炎)、鱼鳞病、肌病、听力损失、共济失调、智力低下等[5,8]。据统计,在 122 例 CDS 合并肝脏受累的患者的肝脏活检中,15%的患者肝脏病理切片中发现微泡型脂肪变性,而 CDS 合并肝硬化的患者病理切片均提示小结节性肝硬化的发生[5]。脂肪肝的病理特征包括大泡型脂肪变性和微泡型脂肪变性。肝脏微泡型脂肪变性的出现被认为与基因突变或酗酒引起的线粒体功能障碍或脂质过氧化有关[9],提示更严重的脂肪变性,往往代表更高的非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)活动度评分和更易进展为脂肪性肝炎和肝硬化[10-11]。在肝脏 CGI-58 特异性敲除的小鼠模型中观察到肝脏微泡型脂肪变性的发生[12]。

本课题组前期通过基于腺相关病毒(adeno-associated virus,AAV)载体的 microRNA 递送系统,发现靶向肝细胞 *Plin*3 可减轻肝脏 CGI-58 特异性敲除所致雌鼠肝脏的脂肪变性和脂肪性肝炎,表明脂肪分解和脂质蓄积之间的平衡在肝脏 CGI-58 特异性敲除所致肝脏病变发生发展中至关重要,并为 CDS 提供了潜在的治疗方法[13]。这种作用仅限于 *Plin*3 还是与脂滴的生成有关,干预脂滴的生成是否能缓解 CDS 仍有待进一步探讨。*Plin*2 和 *Plin*3 是肝细胞中主要的脂滴包被蛋白,在脂滴的生成中具有不同的功能。前期研究表明,在肝脏 CGI-58 特异性敲除的小鼠中,*Plin*2 和 *Plin*3 的表达均显著上调[14],干预 *Plin*2 是否也可以缓解 CDS 有待进一步探究。

*Plin*2 是 *Plin*3 的一个同源基因,在肝细胞中大量表达,受细胞内脂肪酸信号的调节,*Plin*2 随着脂滴的生成而堆积[15],在脂肪分解过程中被伴侣介导的自噬作用降解[16]。*Plin*3 在脂滴生成的早期过程中至关重要,当脂滴体积逐渐增大时,包被脂滴的 *Plin*3 被 *Plin*2 取代[17-19]。虽然 *Plin*2 和 *Plin*3 都能参与肝细胞脂滴的生成[20],但对脂滴生成及脂质代谢的调节效应仍未明确。本研究试图探讨 *Plin*2 在肝脏 CGI-58 特异性敲

除的小鼠肝脂肪变性中的作用,并比较 *Plin*2 和 *Plin*3 对肝细胞脂滴生成和脂质蓄积的作用。

1 材料与方法

1.1 动物实验

动物实验均通过陆军军医大学实验动物福利与伦理委员会批准(批准文号:AMUWEC2019474)。CGI-58$^{Flox/Flox}$ 基因小鼠的构建如前文所述,其 CGI-58 基因第 3 号外显子两侧插入 loxP 位点[21]。小鼠在陆军军医大学的无特定病原体动物房中适应 1 周,动物房开关灯时间为 8:00 至 20:00,12 h 光/暗循环。相同性别的小鼠被分成 2 组,分别用同时表达 Cre 重组酶和靶向 *Plin*2 的 microRNA(Mi-KD)或表达 Cre 重组酶和对照序列(NC)的不同腺相关病毒载体进行转染。在小鼠(区分雄鼠和雌鼠)7 周龄时通过尾静脉注射 1×10^{12} V.G. 的 AAV,病毒注射给予 60%的高脂饮食喂养(HFD,Research Diets #D12492)($n=5$)。每周记录 1 次体质量,禁食 6 h(3:00 至 9:00)后,小鼠被安乐死,随后收集肝脏、脂肪组织和血清样本,液氮快速冷冻后保存在-80 ℃冰箱中。

1.2 腺相关病毒载体

将预先筛选的靶向 *Plin*2 的 Pre-miRNA 序列(ACCGATGAGTCCCACTGTGTT)或阴性对照(NC)序列(GTCTCCACGCGCAGTACATTT)连接到载体 pAAV2-hTBG-MasterRNAi155(MCS)-Cre-eGFP-WPRE-pA(中国泰儿图生物科技有限公司)中。用 AAV8 载体包装并纯化,病毒滴度≥1.3×10^{13} V.G./mL。

1.3 代谢表型

葡萄糖耐量试验(glucose tolerance test,GTT):小鼠高脂饮食喂养 3 周后,禁食 8 h(9:00 至 17:00),测量 0 点血糖,随后按 2 g/kg 的剂量腹腔注射 20%葡萄糖(MACKLIN#G6172),在注射后的 15、30、45、60、90 和 120 min 用血糖仪(Contour TS#1816)测量血糖。胰岛素耐受试验(insulin tolerance test,ITT):小鼠在高脂饮食喂养 4 周后,禁食 6 h(9:00 至 15:00),测量 0 点血糖,随后按雄鼠 0.5 U/kg、雌鼠 0.4 U/kg 的剂量腹腔注射重组人胰岛素溶液(Procell#PB180432),在注射胰岛素后的 15、30、45、60、90 和 120 min 测量血糖。

1.4 组织学和血液化学测试

小鼠肝脏组织用多聚甲醛(Boster#AR1068)固定,完成肝脏苏木精-伊红染色(HE)后,通过正置光学显微镜获得图像。应用 NAFLD 活动度评分(NAFLD activity score,NAS)分析肝脏病理,该系统的描述略有改动[22-23]:肝脏脂肪变性(脂肪变性面积<5%,0 分;5%~33%,1 分;>33%~66%,2 分;>66%,3 分;微泡型脂肪变性,1 分),小叶内/门静脉炎症(无,0 分;<2 个点,1 分;2~4 个点,2 分;>4 个点,3 分),肝细胞气球样变性(无,0 分;少量气球样细胞,1 分;大量细胞/明显气球样变,2 分),每个 HE 切片分析 5 张图像。按照油红试剂(Sigma O0625)的说明,10 μm 的肝脏冷冻切片完成油红 O 染色。心脏穿刺取血,室温放置 20 min 后,4 ℃、3 000 r/min 离心 5 min,分离血清。小鼠血清用 0.9%的预冷生理盐水稀释 5 倍,按 500 μL 体积血清稀释液送至陆军军医大学第一附属医院检验科进行血液生化检验。血液生化结果数据见表 1。

1.5 肝脏甘油三酯和胆固醇定量

室温条件 50 mg 肝脏用 5 mL 氯仿/甲醇体积比为 2:1 的混合溶剂萃取过夜。将溶剂在真空干燥器(HENGZWELL HZK-55)中 65 ℃干燥后,用 3 mL 氯仿/甲醇体积比为 2:1重新溶解。将未溶解的固体物离心分离,1N 的 NaOH 溶解后 BCA 法进行蛋白定量。重新溶解的提取液加入 600 μL H_2SO_4 溶液,涡旋后离心。取出 100 μL 的底相,真空干燥器中干燥后加入含 1% TritonX-100 的氯仿,蒸发溶剂。加入 0.9% NaCl 并涡旋至溶液变清。分别使用甘油三酯检测试剂盒(Abcam#ab65336)和胆固醇检测试剂盒(Abcam #ab65390)对甘油三酯和胆固醇含量进行检测,测量结束后使用蛋白质的含量进行量化(mg/g)。

1.6 细胞培养和 Bodipy 染色

AML-12 细胞在含有 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 培养液中培养,加入适量的胰岛素、转铁蛋白、硒、地塞米松和青霉素/链霉素(Procell#CM-0602),在含 5%CO_2 的 37 ℃培养箱中培养。细胞在 12 孔板上生长,并以 5×10^4 个细胞接种到每个孔中。接种 12 h 后,50 nmol/L *Plin*2 siRNA 用 Lipofectamine 3000(Invitrogen #L3000008)混合后转染细胞[中国擎科生物技术有限公司;靶向序列:GGAAGGATTTGATAT;正义链(5′→3′):GGAAGGATTTGATGATGGTT,反义链(3′→5′):GGAAGGAUUUGAUAUGGUU];对照 siRNA 正义链(5′→3′):UUCUCCGAACGUGUCACGUTT;反义链(3′→5′):ACGUGACACGUUCGGAGAATT。转染 36 h 后,200 μmol/L 油酸(Sigma#O1008)和 DMSO 载体(Boster#PYG0040)处理细胞 12 h,然后收集细胞分别进行 RNA、蛋白质和 Bodipy 染色(所有实验:$n=3$,重复 2 次)。在进行 Bodipy 染色时,用 4%多聚甲醛固定细胞 15 min,10 nmol/L Bodipy 493/503 溶液(Invitrogen #D3922)染色 10 min,DAPI(Beyotime #C1005)染色 5 min。用荧光显微镜(尼康 Ni-U)观察细胞并拍照。

1.7 细胞甘油三酯定量

PBS 冲洗细胞后,含用除垢剂 CA-630(Sigma #MKCL4156)的 PBS 溶解。然后进行脂肪酶孵育,将甘油三酯分解为脂肪酸和甘油。甘油三酯检测试剂盒(Abcam#ab65336)用于测量细胞内甘油三酯含量,以 10^{-3} μmol/百万细胞为单位。

1.8 实时定量 PCR

使用 TRIzol 试剂(Invitrogen#CA92008)或 Eastep Super Total RNA Extraction 试剂盒(Promega#LS1040)提取约 40 mg 肝组织或 AML-12 细胞的 RNA。使用 GoScript 逆转录试剂和引物(Promega)从 1 000 ng RNA 样品中转录出互补 DNA(cDNA)。使用 iTaq Universal SYBR Green Supermix(Bio-Rad #1725124)和 PCR 热循环仪(Bio-Rad C1000)在 10 μL 体积(10 ng 总 RNA)的反应体系中反应。程序为 95 ℃ 3 min,然后进行 40 个循环:95 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s。使用 u36b4 基因作为内参或标准曲线法对数据进行定量[24]。引物序列见表 1。

1.9 SDS-PAGE 和 Western blot

在含有蛋白酶抑制剂(Roche#COUEDTAF-RO)和蛋白磷酸酶抑制剂(Roche#PHOSS-RO)的 RIPA 缓冲液中制备肝组织匀浆或 AML-12 细胞裂解液。总共 30 μg 组织匀浆蛋白或 20 μg 细胞裂解蛋白在 80 V 电压下进行 SDS-PAGE 分离,然后湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜(Bio-Rad#1620177)上。用 5%脱脂牛奶封闭 1 h 后,一抗 4 ℃孵育过夜,二抗室温下孵育 1 h 后用含 0.05% Tween20 的 Tris-HCl 缓冲盐水洗涤 3 次,在 Azure C500 成像系统中使用 ECL 化学发光底物(Bio-Rad#1705062)进行显影。洗膜:使用抗体去除液(Beyotime#P0025B)清洗 PVDF 膜 20 min,用含 0.05% Tween20 的 Tris-HCl 缓冲盐水洗涤 3 次,重新开始封闭和孵育一抗、二抗并显影。Western blot 实验至少重复 2 次。

表 1 RT-qPCR 使用的引物序列

基因	序列	基因	序列
*Plin*2	正义链:5′-GGAGGAAAGACTGCCTATTCTGA-3′ 反义链:3′-CATCCTTCGCCCCAGTTACG-5′	*Srebp*2	正义链:5′-GCAGCAACGGGACCATTCT-3′ 反义链:3′-CCCCATGACTAAGTCCTTCAACT-5′
*Plin*3	正义链:5′-ATGTCTAGCAATGGTACAGATGC-3′ 反义链:3′-CGTGGAACTGATAAGAGGCAGG-5′	*Insig*2	正义链:5′-GGAGTCACCTCGGCCTAAAAA-3′ 反义链:3′-CAAGTTCAACACTAATGCCAGGA-5′
*Plin*5	正义链:5′-TGTCCAGTGCTTACAACTCGG-3′ 反义链:3′-CAGGGCACAGGTAGTCACAC-5′	*Hmgcr*	正义链:5′-TGTTCACCGGCAACAACAAGA-3′ 反义链:3′-CCGCGTTATCGTCAGGATGA-5′
Cgi-58	正义链:5′-TGGTGTCCCACATCTACATCA-3′ 反义链:3′-CAGCGTCCATATTCTGTTTCCA-5′	*Pnpla*7	正义链:5′-TGGAGGCTGCATTTCATGGAG-3′ 反义链:3′-ACCAACGAAGGCTAGGGTAAG-5′
*Srebp*1	正义链:5′-AACGTCACTTCCAGCTAGAC-3′ 反义链:3′-CCACTAAGGTGCCTACAGAGC-5′	*ApoB*	正义链:5′-CCAGAGTGTGGAGCTGAATGT-3′ 反义链:3′-TTGCTTTTTAGGGAGCCTAGC-5′
Chrebp	正义链:5′-CTGGGGACCTAAACAGGAGC-3′ 反义链:3′-GAAGCCACCCTATAGCTCCC-5′	*Mttp*	正义链:5′-CTCCACAGTGCAGTTCTCACA-3′ 反义链:3′-AGAGACATATCCCCTGCCTGT-5′
Fasn	正义链:5′-TTGACGGCTCACACACCTAC-3′ 反义链:3′-CGATCTTCCAGGCTCTTCAG-5′	*Tmem*41*b*	正义链:5′-GATATGGATGACGCCAAGGCT-3′ 反义链:3′-CAAACAAACAAGGAATAAGGCAAG-5′
*Scd*1	正义链:5′-AGGTGCCTCTTAGCCACTGA-3′ 反义链:3′-CCAGGAGTTTCTTGGGTTGA-5′	*Sar*1*b*	正义链:5′-TTCCTTGGATTGGATAATGCCG-3′ 反义链:3′-GCCAGCAATAGTAAGCTCTTCTG-5′
*Dgat*1	正义链:5′-CGTGGTATCCTGAATTGGTG-3′ 反义链:3′-GGCGCTTCTCAATCTGAAAT-5′	*Surf*4	正义链:5′-GAGTCACCAAGCAGTACCTG-3′ 反义链:3′-GGTTGAGGAACACGAAGG-5′
*Cd*36	正义链:5′-ATGGGCTGTGATCGGAACTG-3′ 反义链:3′-GTCTTCCCAATAAGCATGTCTCC-5′	*Abcg*5	正义链:5′-AGGGCCTCACATCAACAGAG-3′ 反义链:3′-GCTGACGCTGTAGGACACAT-5′
*Fatp*1	正义链:5′-GCTTCAACAGCCGTATCCTC-3′ 反义链:3′-TCTTCTTGTTGGTGGCACTG-5′	*Abcg*8	正义链:5′-CTGTGGAATGGGACTGTACTTC-3′ 反义链:3′-GTTGGACTGACCACTGTAGGT-5′
*Pnpla*2	正义链:5′-TCCGTGGCTGTCTACTAAAGA-3′ 反义链:3′-TGGGATATGATGACGTTCTCTCC-5′	*Ldlr*	正义链:5′-CCATATGCATCCCCAGTCTT-3′ 反义链:3′-GCGATGGATACACTCACTGC-5′
*Pnpla*3	正义链:5′-AGGTCATTTCTGGCAAGGTTC-3′ 反义链:3′-TCCACGACTTCGTCTTTGGAA-5′	*u36b*4	正义链:5′-AGATGCAGCAGATCCGCAT-3′ 反义链:3′-GTTCTTGCCCATCAGCACC-5′
Ppara	正义链:5′-TACTGCCGTTTTCACAAGTGC-3′ 反义链:3′-AGGTCGTGTTCACAGGTAAGA-5′		

1.10 抗体

PLIN2 抗体(#15294-1-AP)、PLIN3 抗体(#10694-1-AP)和 PLIN5 抗体(#26951-1-AP)购自 ProteinTech 公司;CGI-58 抗体(#H00051099-M01)购自 Novus 公司;β-actin 抗体(#AC026)购自 Abclonal 公司;HSP90 抗体(#E20-53596)购自 EnoGene 公司;HSP60 抗体(#12165)、HSP70 抗体(#46477)、HRP 结合物抗兔 IgG(#7074)和 HRP 结合物抗鼠 IgG(#7076)抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。

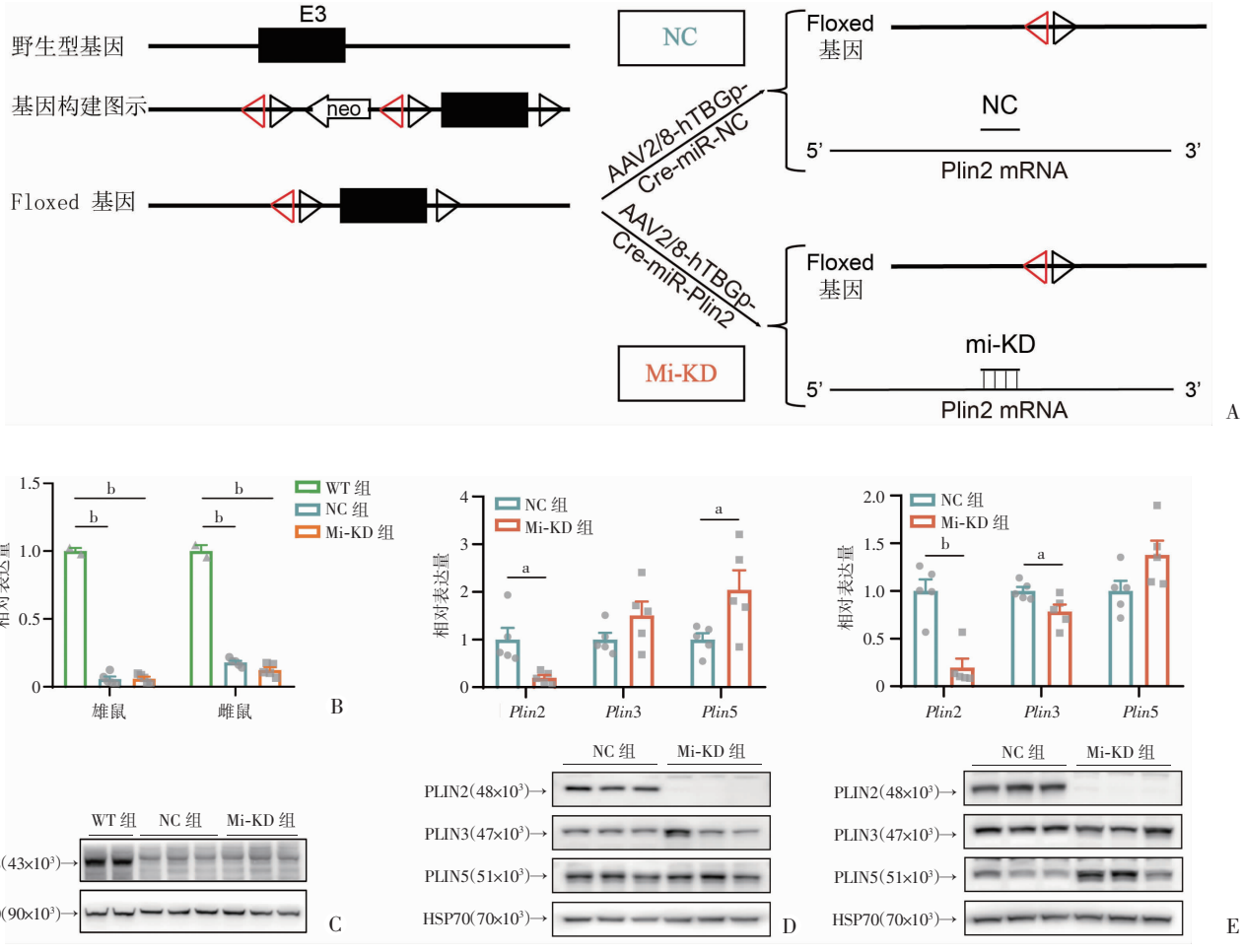
1.11 统计学分析

以 $\bar{x}\pm s$ 表示正态分布且方差齐的定量资料;多组间比较采用单因素方差分析,采用 Bonferrinoi 校正进行组间两两比较;两组间重复测量数据及不同干预数据采用双因素方差分析,采用 Bonferrinoi 校正进行多重比较,两组间数据比较采用 Student-t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。所有数据的统计分析由 Prism(GraphPad,V8.0.1)完成。

2 结果

2.1 肝脏 CGI-58 特异性敲除和 *Plin2* 敲低小鼠模型的构建

为了研究 *Plin2* 在肝脏 CGI-58 特异性敲除小鼠肝脏脂肪变性中的作用,构建肝脏 CGI-58 特异性敲除和肝脏 *Plin2* 敲低的双敲小鼠模型。1×10^{12} V.G. 的 AAV 转染 7 周龄大的 CGI-58$^{Flox/Flox}$ 小鼠,该病毒在源自人甲状腺素结合球蛋白(human thyroxine-binding globulin,hTBG,肝细胞特异性启动子)基因的作用下表达 Cre 重组酶和靶向 *Plin2* 的 microRNA(Mi-KD)或 Cre 重组酶和对照 microRNA 序列(NC)(图 1A)。选择 AAV2/8 的血清型和 hTBG 启动子分别是为了实现靶向肝细胞和肝细胞特异性基因表达。上述小鼠用高脂肪饮食(high fat diet,HFD)饲养 5 周。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:肝脏 CGI-58 敲除和/或 *Plin2* 敲低小鼠模型构建的模式图;B:CGI-58 在小鼠肝脏中的转录水平($n=5$);C:小鼠肝脏中 CGI-58 蛋白水平;D:雄鼠肝脏中主要 PAT 家族基因的表达($n=5$)和蛋白水平($n=3$);E:雌鼠肝脏中主要 PAT 家族基因的表达($n=5$)和蛋白水平($n=3$)

图 1 肝脏 CGI-58 特异性敲除和 *Plin2* 敲低小鼠模型的构建

为了验证 CGI-58 的敲除,比较野生型(WT)和 AAV-Cre 转导组(Mi-KD 和 NC)肝脏样本中 CGI-58 的转录水平。小鼠肝脏实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)结果表明,CGI-58 在 WT 组和 AAV-Cre 转导组之间显著下降($P<0.01$,图 1B)。免疫印迹结果显示,AAV-Cre 转导组小鼠肝脏中 CGI-58 蛋白含量低于野生型小鼠(图 1C)。

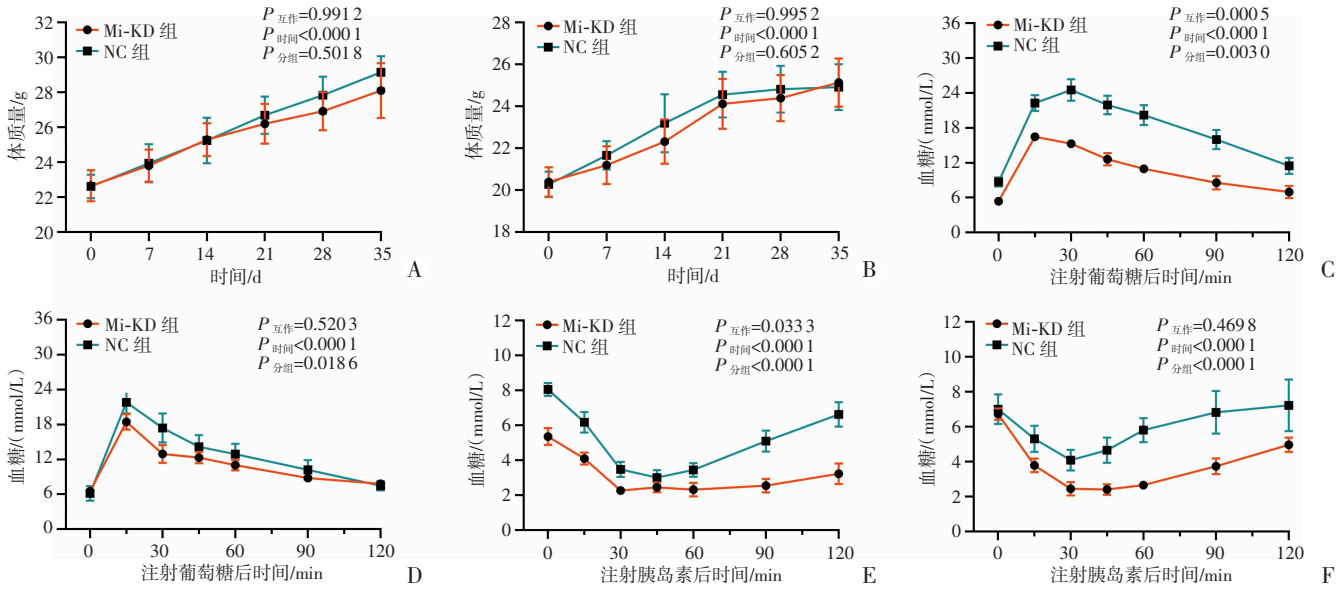
为了验证 *Plin*2 基因的敲低效率,分别检测 NC 小鼠和 Mi-KD 小鼠肝脏中 PAT 家族蛋白 *Plin*2 的转录水平和蛋白水平。与 NC 相比,雄鼠的 *Plin*2 转录水平下降了 80% 以上($P=0.012\ 9$)。与此同时,*Plin*3 和 *Plin*5 转录水平呈上升趋势,且 *Plin*5 转录显著增加($P=0.041\ 9$)。Western blot 分析表明,Mi-KD 使雄鼠的 PLIN2 蛋白减少了 99%($P<0.01$),但未改变 PLIN3 和 PLIN5 的水平(图 1D)。与 NC 相比,雌鼠的 *Plin*2 转录水平下降了 80%($P=0.000\ 7$),*Plin*3 转录水平也显著降低($P=0.032\ 1$),但 *Plin*5 转录水平呈上升趋势。Western blot 分析表明,Mi-KD 使雌鼠 PLIN2 蛋白减少了 99%($P<0.01$),未改变 PLIN3 的水平,但 PLIN5 蛋白水平呈上升趋势(图 1E)。

2.2 肝脏 *Plin*2 敲低可改善 CGI-58 特异性敲除小鼠的葡萄糖耐量和胰岛素敏感性

注射 AAV 后,对小鼠进行了为期 5 周的高脂饮食喂养,每周监测小鼠的体质量变化。发现 Mi-KD 组小鼠和 NC 组小鼠在体质量上未出现显著差异(图 2A、B)。在高脂饮食的第 3 周和第 4 周,分别对小鼠进行葡萄糖耐量试验和胰岛素耐量试验,使用双因素方差分析分别比较了雌鼠和雄鼠的 Mi-KD 组和 NC 组注射葡萄糖或胰岛素后小鼠血糖水平,发现相同性别的两组小鼠均出现显著差异,表明 Mi-KD 组小鼠具有更好的葡萄糖耐量($P<0.01$,图 2C、D)和胰岛素敏感性($P<0.01$,图 2E、F)。

2.3 肝脏 *Plin*2 敲低可以缓解高脂饮食喂养的小鼠肝脏 CGI-58 特异性敲除小鼠的肝肿大和肝细胞损伤

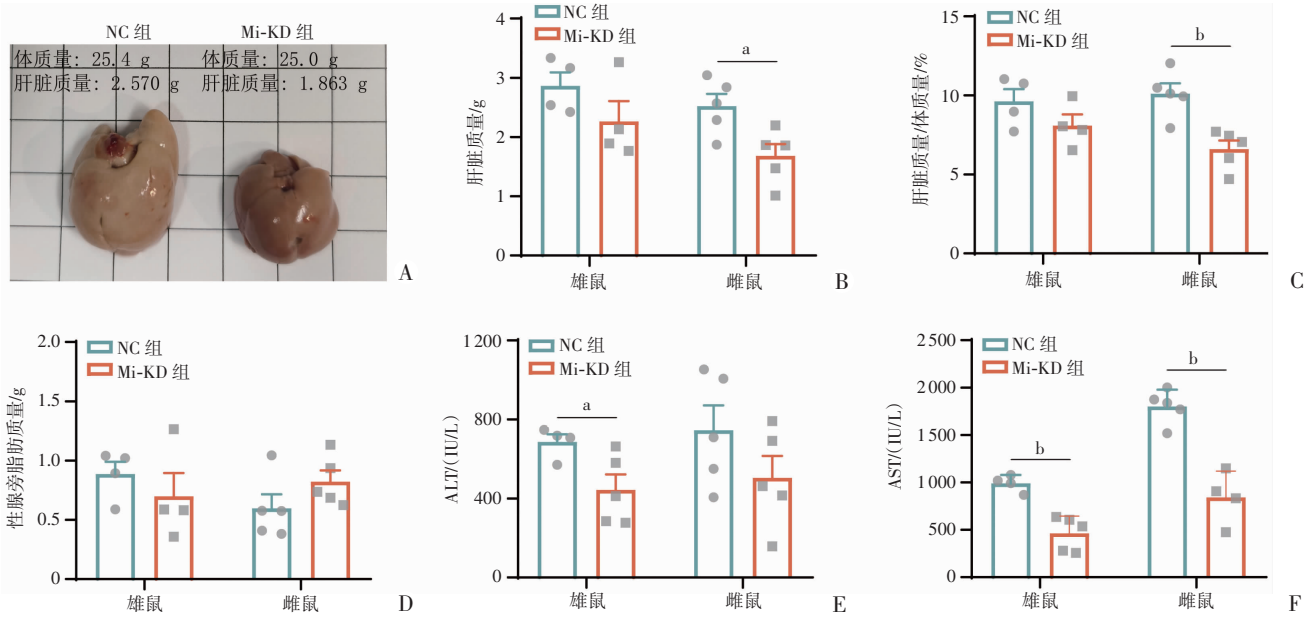
从肝脏大体形态学上看,Mi-KD 可减少肝脏 CGI-58 特异性敲除雌鼠的肝脏肥大(肝肿大)(图 3A),Mi-KD 使雌鼠的肝脏湿质量减少了 33.4%(图 3B),并使雌鼠肝脏质量/体质量(肝体比)降低了 34.7%($P=0.003\ 4$,图 3C),在雄鼠上仅发现肝脏湿质量和肝体比下降的趋势。Mi-KD 未能改变肝脏 CGI-58 特异性敲除小鼠性腺周围白色脂肪组织(pgWAT)的质量(图 3D)。血清生化分析表明,Mi-KD 使雄鼠和雌鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平分别降低了 35.3%($P=0.037\ 5$)和 32.4%(图 3D),并使雄鼠和雌鼠血清天门冬氨酸转氨酶(AST)血清水平分别降低了 53.2%($P=0.001\ 2$)和 53.3%($P=0.000\ 4$)(图 3E)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:雄性小鼠体质量($n=5$);B:雌性小鼠体质量($n=5$);C:雄性小鼠葡萄糖耐量试验($n=4$);D:雌性小鼠葡萄糖耐量试验($n=4$);E:雌性小鼠胰岛素耐受测试($n=4$);F:雌性小鼠胰岛素耐受测试($n=5$)

图 2 肝脏 *Plin*2 敲低可改善 CGI-58 特异性敲除小鼠的葡萄糖耐量和胰岛素敏感性



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A: 肝脏大体解剖;B: 肝脏质量;C: 肝体比值;D:性腺旁脂肪组织质量;E: 血清丙氨酸氨基转移酶;F:天门冬氨酸转氨酶

图 3 肝脏 *Plin2* 敲低可以缓解高脂饮食喂养的肝脏 CGI-58 特异性敲除小鼠的肝肿大和肝细胞损伤

2.4 肝脏 *Plin2* 敲低可以改善高脂饮食喂养的肝脏 CGI-58 特异性敲除小鼠的肝脏微泡型脂肪变性

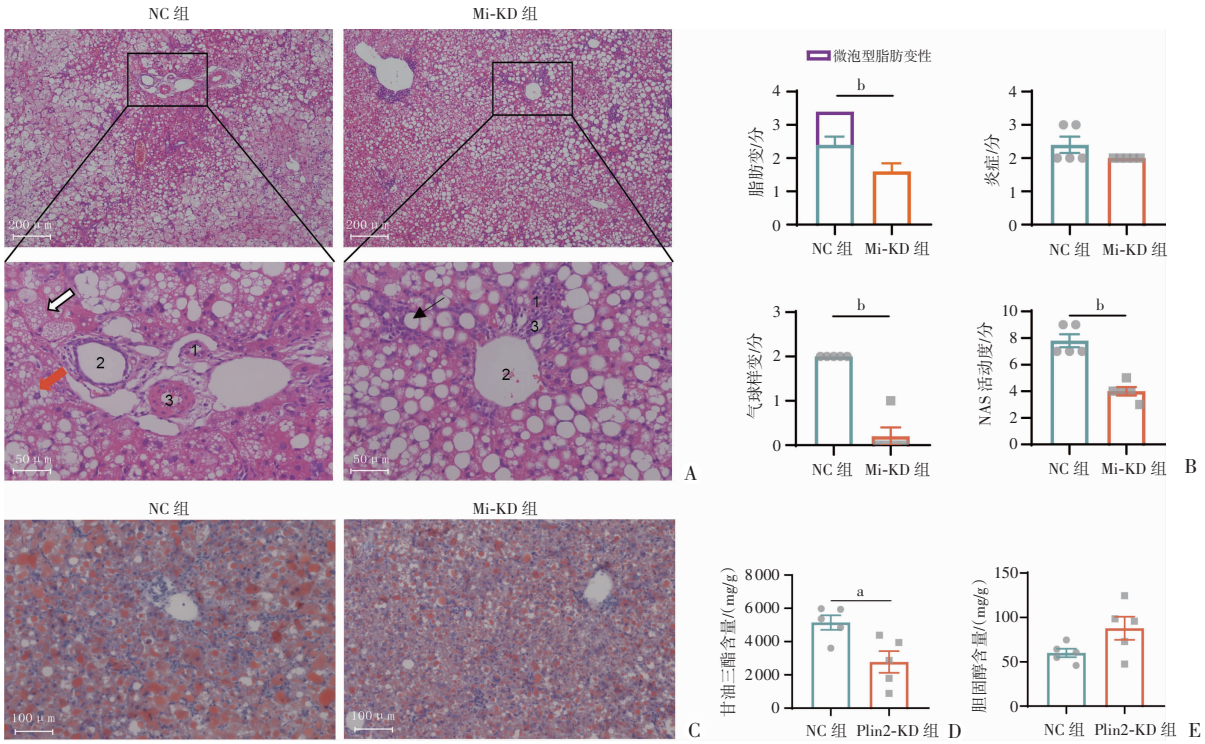
考虑雌鼠肝脏 *Plin2* 敲低相较于雄鼠更能够显著减轻肝脏 CGI-58 特异性敲除所致的肝肿大和肝细胞损伤,重点对雌鼠的肝脏进行深入研究。肝脏组织病理学显示,Mi-KD 几乎使肝脏 CGI-58 特异性敲除小鼠肝细胞中存在的小而多的脂滴(微泡型脂肪变性)消失(图 4A)。采用非酒精性脂肪肝活动评分(NAS)对肝脏病理进行了半定量分析(微泡型脂肪变性的样本在脂肪变性类别中得 1 分),在 Mi-KD 小鼠的 NAS 评分中,脂肪变性和肝细胞气球样变 2 种病理特征评分显著降低($P<0.01$),而炎症评分在两组间无显著差异,Mi-KD 组的 NAS 总分比 NC 组降低了 3.8 分($P=0.000\ 2$,图 4B)。肝脏冰冻切片的油红 O 染色表明 Mi-KD 减少了肝脏 CGI-58 特异性敲除所致的肝脏脂质蓄积(图 4C),用酶比色法检测小鼠肝脏甘油三酯的结果显示,Mi-KD 使肝脏 CGI-58 特异性敲除小鼠肝脏中的甘油三酯含量下降了 46%($P=0.016\ 6$,图 4D),但肝脏胆固醇含量呈现上升的趋势($P=0.080\ 0$,图 4E),这可能与血清中低密度脂蛋白胆固醇水平显著降低有关($P=0.031\ 1$,表 2)。

2.5 肝脏 *Plin2* 敲低后高脂饮食喂养的肝脏 CGI-58 特异性敲除小鼠脂肪代谢相关的基因表达

RT-qPCR 检测显示,Mi-KD 没有改变小鼠肝脏中 *Cd36* 或 *Fatp1* 的转录水平(图 5A),但是使脂质合成相关基因包括 *Chrebp* 和 *Scd1*($P<0.05$)、*Fasn* 和 *Dgat1*($P<0.01$)基因表达显著上调。考虑到 Mi-KD 肝脏胆固醇含量的增加,通过 RT-qPCR 分析测定部分参与胆固醇代谢基因的表达,结果发现 Mi-KD 增加了小鼠肝脏中胆固醇从头合成相关基因包括 *Srebp2* 和 *Insig2*($P<0.05$)和脂蛋白分泌相关的关键基因 *Pnpla7*($P<0.05$)、*Mttp* 和 *Sar1b*($P<0.01$)的表达(图 5B)。

表 2 肝脏 CGI-58 特异性敲除小鼠(NC)和肝脏 CGI-58 特异性敲除合并 *Plin2* 敲低小鼠(Mi-KD)血清生化指标比较($\bar{x}\pm s$)

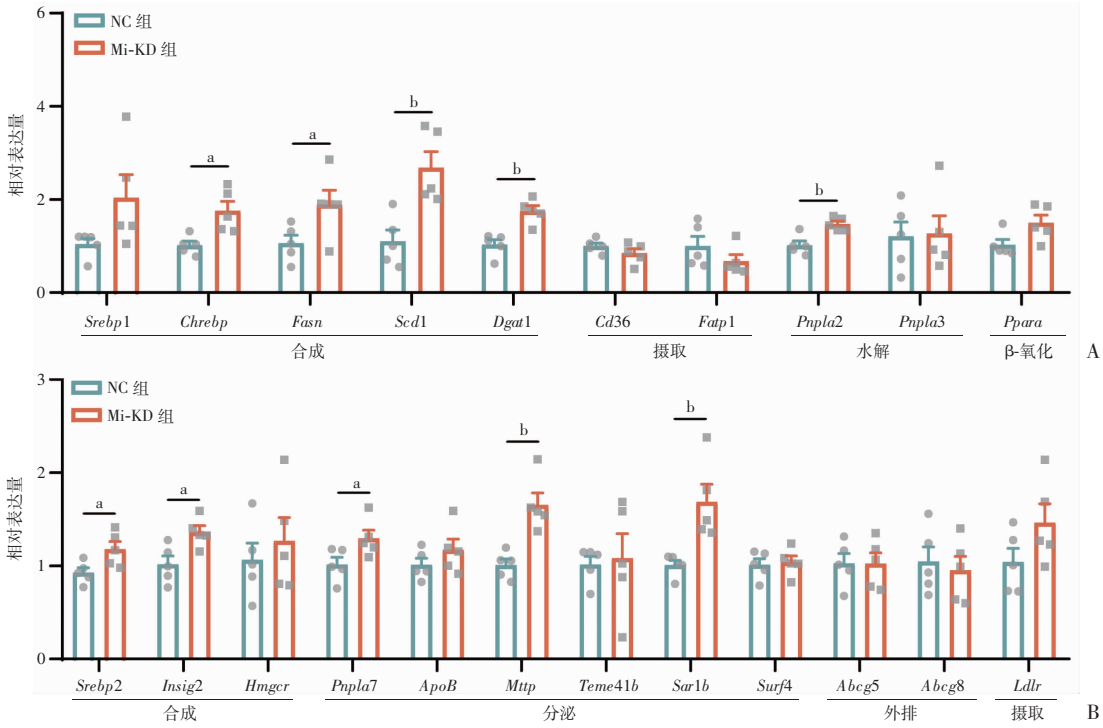
组别	总胆红素/(μmol/L)	直接胆红素/(μmol/L)	间接胆红素/(μmol/L)	总蛋白/(g/L)	白蛋白/(g/L)
NC 组	4.50±1.67	3.05±1.05	2.75±0.91	61.20±1.24	28.30±0.41
Mi-KD 组	3.63±0.80	1.85±0.84	1.78±0.11	58.40±2.31	30.20±0.98
P	0.657 2	0.407 0	0.329 9	0.316 7	0.111 7
组别	球蛋白/(g/L)	总胆固醇/(mmol/L)	甘油三酯/(mmol/L)	低密度脂蛋白胆固醇/(mmol/L)	血糖/(mmol/L)
NC 组	32.90±0.91	3.23±0.51	0.92±0.08	1.01±0.07	8.24±1.06
Mi-KD 组	28.20±1.91	3.04±0.46	0.84±0.07	0.71±0.09	8.70±0.59
P	0.057 6	0.789 0	0.477 0	0.031 1	0.714 5



a:P<0.05,b:P<0.01

A: 肝脏病理 HE 染色　黑色箭头:大泡型脂肪变性;白色箭头:微泡型脂肪变性;红色箭头:气球样变;B: 肝脏病理 NAS 评分(脂肪变、炎症、气球样变和 NAS 评分的单个和整体分数,n=5);C: 肝脏油红 O 染色;D:甘油三酯含量(n=5);E: 胆固醇含量(n=5)

图 4　肝脏 *Plin2* 敲低可以改善高脂饮食喂养的肝脏 CGI-58 特异性敲除小鼠的肝脏微泡型脂肪变性



a:P<0.05,b:P<0.01

A: 小鼠肝脏脂质代谢相关基因的 RT-qPCR 分析;B: 小鼠肝脏中胆固醇代谢相关基因的 RT-qPCR 分析

图 5　肝脏 *Plin2* 敲低后高脂饮食喂养的肝脏 CGI-58 特异性敲除小鼠脂肪代谢相关基因的表达(n=5)

2.6 肝细胞 *Plin2* 的敲低减少了 AML-12 细胞脂滴的生成

油酸(Oil Acid,OA)处理使 AML-12 细胞 *Plin2* 的转录水平提高了 42%,但没有改变 AML-12 肝细胞中 *Plin3* 和 *Plin5* 的水平(图 6A)。用小干扰 RNA(siRNA)靶向敲低 *Plin2*,使 *Plin2* 的 mRNA 水平降低 85%以上($P<0.01$),不改变 *Plin3* 的转录水平,但使 *Plin5* 的 mRNA 水平升高 50%(图 6A)。Western blot 结果显示,OA 处理使 PLIN2 的蛋白水平增加了 6.6 倍($P<0.01$),而对照干预和 OA 干预分别对比转染 *Plin2* siRNA 后 PLIN2 的蛋白水平,发现其分别降低了 82%和 86%($P<0.01$,图 6B)。鉴于之前关于 *Plin3* 敲低后 AML-12 细胞中脂滴生成的研究,分别敲低 *Plin2* 或 *Plin3* 以评估 *Plin2* 对脂滴生成和脂质蓄积的影响,并比较 *Plin2* 和 *Plin3* 的效应。Bodipy 染色和细胞甘油三酯的定量分析显示,与基础状态(NC)和 *Plin2* 敲低相比,*Plin3* 敲低分别显著降低了甘油三酯的含量,而 *Plin2* 敲低与 NC 相比只是呈下降趋势($P=0.137\ 9$,图 6C)。然后用 OA 处理 AML-12 细胞,*Plin2* 或 *Plin3* 敲低可减少 OA 在 AML-12 肝细胞中的脂滴沉积,甘油三酯的定量分析显示,*Plin2*($P=0.042\ 8$)或 *Plin3*($P=0.013\ 3$)敲低均显著降低了甘油三酯的含量。发现 OA 诱导下相较于 *Plin2* 的敲低,*Plin3* 敲低后肝细胞的甘油三酯含量呈下降趋势(图 6D)。这些发现证实,*Plin2* 是肝细胞中脂滴生成的重要因子,*Plin3* 在调节肝细胞脂滴生成和脂质代谢中的作用比 *Plin2* 更强。

3 讨论

本研究表明脂滴包被蛋白 PLIN2 可改善高脂饮食喂养的肝脏 CGI-58 特异性敲除小鼠的肝脏脂肪变性、葡萄糖耐量降低和胰岛素抵抗,研究还观察到肝脏 *Plin2* 敲低显著改善肝脏 CGI-58 敲除引起的肝脏微泡型脂肪变性。在 AML-12 细胞模型中,通过 siRNA 靶向敲除 *Plin2*/*Plin3* 表明 *Plin2* 和 *Plin3* 都参与了 AML-12 细胞的脂质积累,而且 *Plin3* 在脂滴生成和脂质蓄积的作用强于 *Plin2*。这可能与脂滴的生物发生过程中脂滴包被蛋白家族包被脂滴的顺序有关[25]。

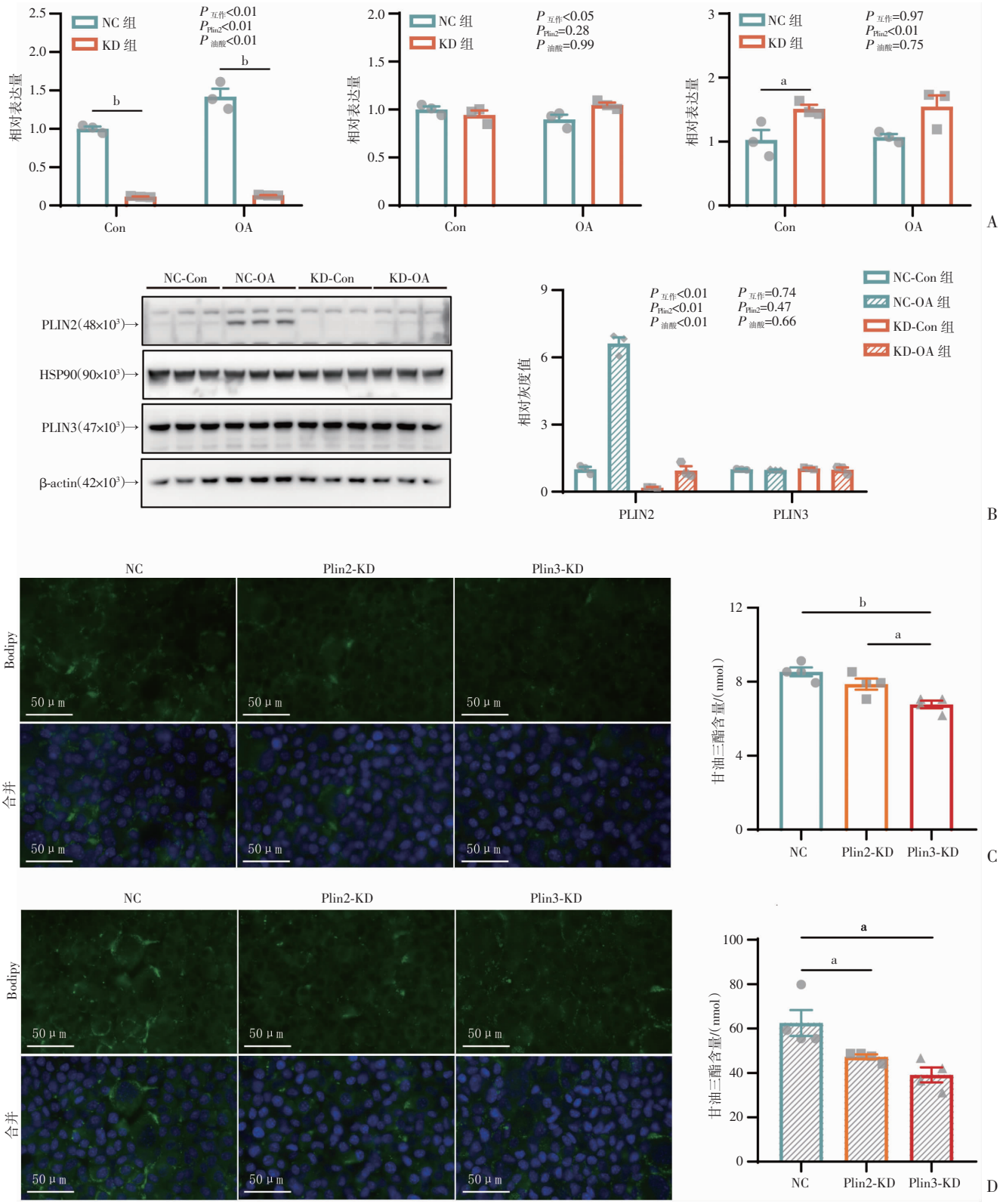
人类 CGI-58 基因突变引起的 CDS 伴随着严重的肝脏脂肪变性并伴有微泡型脂肪变性[4],在肝脏 CGI-58 基因特异性敲除的小鼠脂肪肝模型中也观察到了这种情况[14,21]。本研究结果表明,PLIN2 参与了肝脏微泡型脂肪变性的形成,靶向 *Plin2* 可以显著改善肝脏微泡型脂肪变性,与前期国外研究结果相一致[26]。本研究进一步将该结果在肝脏 CGI-58 特异性敲除所致的肝脏微泡型脂肪变性这一动物模型上加以验证,为肝脏微泡型脂肪变性的预防和治疗提供了验证,并为 CDS 的治疗提供 *Plin3*[13] 之外的另一个可能的治疗靶点。

前期研究中探究了肝脏 *Plin3* 在肝脏 CGI-58 特异性敲除所致小鼠肝脂肪变性和脂肪性肝炎中的发生发展的作用及机制,表明靶向肝脏 *Plin3* 可以降低肝脏甘油三酯含量,改善肝脏脂肪变性和脂肪性肝炎的发展,缓解肝脏 CGI-58 特异性敲除所致的坏死性凋亡[13]。在 *Plin2* 和 *Plin3* 敲低两者的改善效果方面,靶向 *Plin3* 可使肝脏质量减轻 38.6%,而 *Plin2* 则减轻 33.4%;*Plin3* 可使血清 ALT 和 AST 分别降低 62.0%和 47.3%,而 *Plin2* 则分别降低 32.4%和 53.3%[13]。综合对比评估发现,靶向 *Plin3* 在缓解肝脏 CGI-58 特异性敲除所致肝脏病变的效果略强于 *Plin2*,在 AML-12 细胞中敲低 *Plin2*/*Plin3* 对 AML-12 细胞脂滴生成和脂质蓄积的研究结果也证实,*Plin3* 在调节脂滴生成和脂质代谢方面的效果强于 *Plin2*。结合在脂滴的生成过程中,*Plin3* 先于 *Plin2* 包被脂滴,因此认为在脂滴的生成过程中,包被蛋白出现在脂滴表面的顺序可能与脂滴的调控作用大小相关。这一猜想还需要进一步的实验验证。

既往对 *Plin2* 的研究集中其对肝脏脂肪变性和肥胖的调节,肝脏中 *Plin2* 的量与肝细胞甘油三酯的含量呈正相关[27-28]。进一步研究表明 *Plin2* 参与肝脏自噬的调节[29],且其通过调节自噬及其自身的泛素化修饰参与了多种疾病的发生发展[30-31]。近年来更多研究关注 *Plin2* 作为生物标记物指示相关疾病尤其是癌症的进展[32-33]。最新在牛脂肪细胞研究中发现 PLIN2 与 CGI-58 存在直接相互作用,且 *Plin2* 中第 315 位的精氨酸是 *Plin2*-CGI-58 直接作用的调节位点,参与体内脂质代谢的调节[34]。这一研究为我们探寻改善肝脏 CGI-58 特异性敲除所致的肝脏脂肪变性和微泡型脂肪变性提供了新的潜在靶点。

总之,本研究发现肝脏 *Plin2* 是肝脏 CGI-58 特异性敲除所致肝脏微泡型脂肪变性的关键蛋白,靶向 *Plin2* 可以显著改善肝脏 CGI-58 特异性敲除所致肝脏肿大和肝细胞损伤,为治疗 CDS 相关脂肪肝提供了潜在的治疗方向,以 *Plin2* 为靶点可能是治疗 CDS 的一种方法。同时本研究表明在肝细胞脂滴生成和脂质蓄积中 *Plin3* 发挥的作用比 *Plin2* 更强。

致谢 AML-12 细胞系由杨永军教授提供;感谢余立清教授提供的技术支持和修改建议



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:在有或没有 OA 的 AML-12 肝细胞中 *Plin2*、*Plin3* 和 *Plin5* 的基因表达($n=3$);B:AML-12 肝细胞的免疫印迹和相对灰度值分析($n=3$);C:对照干预下 Bodipy 染色和甘油三酯含量($n=4$);D:OA 干预下 Bodipy 染色和甘油三酯含量($n=4$)

图 6 肝细胞 *Plin2* 的敲低减少了 AML-12 细胞脂滴的生成

参考文献:

[1] GRABNER G F, XIE H, SCHWEIGER M, *et al*. Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores[J]. Nat Metab, 2021, 3(11): 1445-1465. DOI: 10.1038/s42255-021-00493-6.

[2] LASS A, ZIMMERMANN R, HAEMMERLE G, *et al*. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman syndrome[J]. Cell Metab, 2006, 3(5): 309-319. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.03.005.

[3] ELIAS P M. Neutral lipid storage disease with ichthyosis. Defective lamellar body contents and intracellular dispersion [J]. Arch Dermatol, 1985, 121(8): 1000-1008. DOI: 10.1001/archderm.121.8.1000.

[4] CAKMAK E, BAGCI G. Chanarin-Dorfman syndrome: a comprehensive review[J]. Liver Int, 2021, 41(5): 905-914. DOI: 10.1111/liv.14794.

[5] LIANG B, HUANG H, ZHANG J X, *et al*. Case report: Chanarin-Dorfman syndrome: a novel homozygous mutation in *ABHD5* gene in a Chinese case and genotype-phenotype correlation analysis[J]. Front Genet, 2022, 13: 847321. DOI: 10.3389/fgene.2022.847321.

[6] RAJASEKARAN V, MCFARLANE J, PURVIS D, *et al*. Chanarin-Dorfman syndrome: a neutral lipid storage disease with ichthyosis and liver cirrhosis[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2023, 76(3): e66. DOI: 10.1097/MPG.0000000000003666.

[7] SUGIURA K, SUGA Y, AKIYAMA M. Dorfman-Chanarin syndrome without mental retardation caused by a homozygous ABHD5 splice site mutation that skips exon 6[J]. J Dermatol Sci, 2014, 75(3): 199-201. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2014.05.009.

[8] REDAELLI C, COLEMAN R A, MORO L, *et al*. Clinical and genetic characterization of Chanarin-Dorfman syndrome patients: first report of large deletions in the *ABHD5* gene [J]. Orphanet J Rare Dis, 2010, 5: 33. DOI: 10.1186/1750-1172-5-33.

[9] FROMENTY B, BERSON A, PESSAYRE D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation[J]. J Hepatol, 1997, 26(Suppl 1): 13-22. DOI: 10.1016/s0168-8278(97)82328-8.

[10] KENNEDY L, MEADOWS V, SYBENGA A, *et al*. Mast cells promote nonalcoholic fatty liver disease phenotypes and microvesicular steatosis in mice fed a Western diet[J]. Hepatology, 2021, 74(1): 164-182. DOI: 10.1002/hep.31713.

[11] TANDRA S, YEH M M, BRUNT E M, *et al*. Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol, 2011, 55(3): 654-659. DOI: 10.1016/j.jhep.2010.11.021.

[12] BROWN J M, BETTERS J L, LORD C, *et al*. CGI-58 knockdown in mice causes hepatic steatosis but prevents diet-induced obesity and glucose intolerance[J]. J Lipid Res, 2010, 51(11): 3306-3315. DOI: 10.1194/jlr.M010256.

[13] BAO X Y, MA X G, HUANG R F, *et al*. Knockdown of hepatocyte Perilipin-3 mitigates hepatic steatosis and steatohepatitis caused by hepatocyte CGI-58 deletion in mice [J]. J Mol Cell Biol, 2022, 14(8): mjac055. DOI: 10.1093/jmcb/mjac055.

[14] YANG P, WANG Y L, TANG W Q, *et al*. Western diet induces severe nonalcoholic steatohepatitis, ductular reaction, and hepatic fibrosis in liver CGI-58 knockout mice [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 4701. DOI: 10.1038/s41598-020-61473-6.

[15] MASHEK D G. Hepatic lipid droplets: a balancing act between energy storage and metabolic dysfunction in NAFLD [J]. Mol Metab, 2021, 50: 101115. DOI: 10.1016/j.molmet.2020.101115.

[16] KAUSHIK S, CUERVO A M. Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis[J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(6): 759-770. DOI: 10.1038/ncb3166.

[17] SOŁTYSIK K, OHSAKI Y, TATEMATSU T, *et al*. Nuclear lipid droplets derive from a lipoprotein precursor and regulate phosphatidylcholine synthesis[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 473. DOI: 10.1038/s41467-019-08411-x.

[18] BRASAEMLE D L, WOLINS N E. Packaging of fat: an evolving model of lipid droplet assembly and expansion[J]. J Biol Chem, 2012, 287(4): 2273-2279. DOI: 10.1074/jbc.R111.309088.

[19] BULANKINA A V, DEGGERICH A, WENZEL D, *et al*. TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets[J]. J Cell Biol, 2009, 185(4): 641-655. DOI: 10.1083/jcb.200812042.

[20] STRAUB B K, STOEFFEL P, HEID H, *et al*. Differential pattern of lipid droplet-associated proteins and *de novo* perilipin expression in hepatocyte steatogenesis [J]. Hepatology, 2008, 47(6): 1936-1946. DOI: 10.1002/hep.22268.

[21] GUO F, MA Y Y, KADEGOWDA A K G, *et al*. Deficiency of liver comparative gene identification-58 causes steatohepatitis and fibrosis in mice[J]. J Lipid Res, 2013,

54(8):2109-2120. DOI:10.1194/jlr.M035519.

[22] KLEINER D E, BRUNT E M, VAN NATTA M, *et al*. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease[J]. Hepatology, 2005, 41(6):1313-1321. DOI:10.1002/hep.20701.

[23] LIANG W, MENKE A L, DRIESSEN A, *et al*. Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology[J]. PLoS One, 2014, 9(12):e115922. DOI:10.1371/journal.pone.0115922.

[24] XIN H R, HUANG R F, ZHOU M Y, *et al*. Protocol for setup and circadian analysis of inverted feeding in mice[J]. STAR Protoc, 2021, 2(3):100701. DOI:10.1016/j.xpro.2021.100701.

[25] 包鑫余.肝脏CGI-58和PAT蛋白协同调节脂滴稳态及脂质代谢的作用机制[D].重庆:陆军军医大学,2023.
BAO X Y. Mechanism of hepatic CGI-58 and PAT proteins regulating lipid droplet homeostasis and lipid metabolism[D]. Chongqing: Army Medical University ,2023.

[26] DONCHEVA A I, LI Y C, KHANAL P, *et al*. Altered hepatic lipid droplet morphology and lipid metabolism in fasted Plin2-null mice[J]. J Lipid Res, 2023, 64(12):100461. DOI:10.1016/j.jlr.2023.100461.

[27] CHANG B H, LI L, PAUL A, *et al*. Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(3):1063-1076. DOI:10.1128/MCB.26.3.1063-1076.2006.

[28] LIBBY A E, BALES E S, MONKS J, *et al*. Perilipin-2 deletion promotes carbohydrate-mediated browning of white adipose tissue at ambient temperature[J]. J Lipid Res, 2018, 59(8):1482-1500. DOI:10.1194/jlr.M086249.

[29] TSAI T H, CHEN E, LI L, *et al*. The constitutive lipid droplet protein PLIN2 regulates autophagy in liver[J]. Autophagy, 2017, 13(7):1130-1144. DOI:10.1080/15548627.2017.1319544.

[30] HAIDAR M, LOIX M, VANHERLE S, *et al*. Targeting lipophagy in macrophages improves repair in multiple sclerosis[J]. Autophagy, 2022, 18(11):2697-2710. DOI:10.1080/15548627.2022.2047343.

[31] ZHANG Y S, LIN S Y, PENG J Y, *et al*. Amelioration of hepatic steatosis by dietary essential amino acid-induced ubiquitination[J]. Mol Cell, 2022, 82(8):1528-1542.e10. DOI:10.1016/j.molcel.2022.01.021.

[32] IPPOLITO L, COMITO G, PARRI M, *et al*. Lactate rewires lipid metabolism and sustains a metabolic-epigenetic axis in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2022, 82(7):1267-1282. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-21-0914.

[33] LI J, ZHANG Q, GUAN Y P, *et al*. TRIB3 promotes the progression of renal cell carcinoma by upregulating the lipid droplet-associated protein PLIN2[J]. Cell Death Dis, 2024, 15(4):240. DOI:10.1038/s41419-024-06627-4.

[34] LI P W, MEI C G, RAZA S H A, *et al*. Arginine(315) is required for the PLIN2-CGI-58 interface and plays a functional role in regulating nascent LDs formation in bovine adipocytes[J]. Genomics, 2024, 116(2):110817. DOI:10.1016/j.ygeno.2024.110817.

(收稿:2024-05-28;修回:2024-06-29)

(编辑 邓强庭)