



# Fsp27 通过抑制 HSL 的脂滴定位调控脂肪水解

李聪, 周林康, 李蓬\*

清华大学生命科学学院, 蛋白质科学教育部重点实验室, 北京 100084

\* 联系人, li-peng@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2014-04-07; 接受日期: 2014-04-23

国家自然科学基金(批准号: 90913024)、国家重点基础研究发展计划(批准号: 2013CB530602, 2011CB910801)和中国博士后科学基金(批准号: 2012M520249, 2013T60103)资助项目

doi: 10.1360/052014-65

**摘要** Fsp27 是 CIDE 蛋白家族的一员, 其特异性地在脂肪组织中表达并定位于脂滴表面, 促进脂滴融合增大和脂肪积累. Fsp27 敲除小鼠表现出胰岛素敏感性增强, 有较高的能量消耗, 并且可以抵抗高脂食物引起的肥胖, 但 Fsp27 是否直接参与脂肪水解的调控过程并不清楚. 本研究发现在 3T3-L1 脂肪细胞中基因沉默 Fsp27 导致脂肪水解速率上升, 并且这种上升是由激素敏感型脂肪酶(HSL)所介导. 进一步在 3T3-L1 前脂肪细胞中过表达 Fsp27 以及 HSL, 对其定位的观察结果显示, Fsp27 可以显著地抑制 HSL 在脂滴表面的定位. 本研究表明, 在脂肪组织中, Fsp27 能够直接影响 HSL 在脂滴表面的定位, 进而抑制脂肪水解速率, 导致脂类积累.

**关键词**  
肥胖  
脂滴  
脂肪水解  
Fsp27  
HSL

近年来, 随着人们生活水平的提高, 饮食结构中含有高糖、高脂肪、高热量食物的比例逐步上升, 使得肥胖(obesity)成为一种快速上升的趋势. 肥胖不仅给患者造成体型上的困扰, 其并发症更是带来极大的危害. 研究显示, 肥胖能够引发高血脂、糖尿病以及多种心血管疾病如冠心病、动脉粥样硬化, 从而对患者机体造成严重的危害<sup>[1]</sup>. 从能量代谢的角度看, 肥胖的本质是机体摄入的能量远大于消耗的能量从而导致的代谢失衡. 过量的营养物质会在体内转化为脂肪并储存在脂肪组织中, 脂肪组织的不断积累则会产生肥胖的表型, 因此脂肪组织在调节肥胖的发生中起着关键的作用.

脂肪组织可以分为白色脂肪组织与褐色脂肪组织, 褐色脂肪组织只有在婴儿时期才能够被观察到<sup>[2]</sup>, 代谢较活跃且具有产热功能. 人体内的脂肪组织主要是白色脂肪组织, 白色脂肪细胞主要由一个极大

的脂滴(lipid droplet, LD)所占据, 细胞内的线粒体数目比较少且活性通常较低<sup>[3]</sup>. 脂滴中储存着大量的中性脂肪——三酰甘油(triacylglycerol, TAG), 在饥饿或运动等需求能量的情况下, TAG 经过脂肪水解(lipolysis)的过程被分解成为 3 个游离脂肪酸分子(free fatty acids, FFAs)和 1 个甘油分子(glycerol), 经由循环系统为机体的其他组织提供能量<sup>[4]</sup>. 为了进一步认识脂肪组织的代谢规律及肥胖的发生机制, 需要对脂肪水解的过程进行深入的研究.

HSL(hormone sensitive lipase)是首个被报道的介导脂肪水解的关键脂肪水解酶. HSL 在机体各种组织中有较为广泛的分布, 但在脂肪组织中的表达要明显高于其他组织<sup>[5]</sup>. HSL 的底物包括 TAG、二酰甘油(diacylglycerol, DAG)、单酰甘油(monoacylglycerol, MAG)和胆固醇酯等多种脂类, 而其中 DAG 是最有效的底物<sup>[6]</sup>. 在正常生理条件下, 细胞受到 $\beta$ -肾上腺

**引用格式:** 李聪, 周林康, 李蓬. Fsp27 通过抑制 HSL 的脂滴定位调控脂肪水解. 中国科学: 生命科学, 2014, 44: 1073-1081

Li C, Zhou L K, Li P. Fsp27 inhibits lipolysis by excluding HSL from lipid droplet surface. SCIENTIA SINICA Vitae, 2014, 44: 1073-1081, doi: 10.1360/052014-65

素的刺激后, 细胞质中的蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 被激活, 处于激活状态的 PKA 会磷酸化其两个底物——HSL 和围脂滴蛋白 (Perilipin1)<sup>[6]</sup>. 早期的研究显示, HSL 的 2 个丝氨酸残基 (Ser563 和 Ser565) 可以被 PKA 磷酸化, 而近期又有研究陆续发现了其他几个 PKA 磷酸化位点 (Ser659 和 Ser660)<sup>[6]</sup>. 具有多个磷酸化位点的 HSL 在  $\beta$ -肾上腺素刺激下被磷酸化后, 开始由细胞质向脂滴表面转移, 并在 Perilipin1 的辅助下起始脂肪水解<sup>[7]</sup>. Perilipin1 是一类脂滴表面结合蛋白家族——PAT 蛋白家族的成员之一, 该家族还包括 ADRP (adipose differentiation related protein), TIP47 (tail interacting protein 47), S3-12 (plasma membrane associated protein), LSDP5 (lipid storage droplet protein 5) 等 4 个成员. Perilipin1 特异性地表达在脂肪组织中并且定位在脂滴表面, 其蛋白上 6 个丝氨酸残基 (Ser81, Ser222, Ser276, Ser433, Ser492) 可以被 PKA 磷酸化, 并且与 HSL 一同起始脂肪水解<sup>[7]</sup>. HSL 一直被认为是脂肪组织与非脂肪组织中唯一的脂肪水解酶, 但 HSL 敲除的小鼠 (*Mus musculus*) 并没有表现出超重或肥胖的表型, 缺失 HSL 的脂肪细胞仍可以响应  $\beta$ -肾上腺素的刺激并进行脂肪水解<sup>[8]</sup>. 这些现象最终因另一个关键的脂肪水解酶——ATGL (adipose triglycerid lipase) 的发现而得到了解释<sup>[9]</sup>. ATGL 具有和 HSL 几乎一致的蛋白表达分布, 主要表达在脂肪组织中, 在骨骼肌、肝脏、胰腺等其他组织中也有少量的表达. 不同的是, ATGL 对 TAG 的水解活性大于对 DAG, 因此主要负责脂肪水解的第一步, 并且 ATGL 不会被 PKA 磷酸化而是具有 2 个可以被 AMPK (AMP-activated protein kinase) 磷酸化的丝氨酸残基<sup>[10]</sup>. 此外, ATGL 需要在其辅助激活子 CGI-58 (a/b-hydrolase domain-containing protein 5, ABHD5) 的作用下才能达到完全的水解酶活性<sup>[11]</sup>.

CIDE (cell death-inducing DEF45-like effector, CIDE) 家族蛋白是一类在哺乳动物物种间高度保守的蛋白, 包括 Cidea (主要表达在褐色脂肪组织)、Cideb (主要表达在肝脏) 以及 Fsp27 (fat-specific protein 27) (主要表达在白色脂肪组织和褐色脂肪组织)<sup>[12]</sup>. 近期的研究显示, CIDE 家族蛋白在调控脂类合成、储存以及水解方面有着重要的调节作用, 并且与肥胖、II 型糖尿病以及脂肪肝的发生密切相关<sup>[13]</sup>. Fsp27 蛋白的表达受到在脂肪代谢中具有关键作用的 2 个转录因子的直接调控——增强子结合蛋白 C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP) 以及过氧

化酶体增殖子活化受体蛋白 PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferators activated receptor, PPAR $\gamma$ )<sup>[14]</sup>. 本实验室之前的研究显示, 在脂肪细胞中, Fsp27 可以定位在脂滴表面并富集在脂滴与脂滴的接触位点 (LD-LD contact site, LD-CS) 从而促进脂滴之间的融合进而形成巨大脂滴<sup>[15]</sup>. Fsp27 敲除小鼠表现出较强的胰岛素敏感性和血糖利用率, 并且可以抵抗高脂食物摄入所导致的肥胖. 缺失 Fsp27 基因的小鼠血液中的 TAG 和 FFA 的含量都有所下降, 白色脂肪组织中的 TAG 总量也明显下降, 白色脂肪细胞内形成了多而小的脂滴. 在脂肪水解方面, 与野生型小鼠相比, Fsp27 敲除小鼠的脂肪水解能力显著增强, 尤其基础脂肪水解速率有显著的上升. 其他研究也显示, 在体外诱导分化的脂肪细胞中, 敲除或敲低 Fsp27 都会产生明显上升的基础脂肪水解速率<sup>[3]</sup>. 由于 Fsp27 在脂肪代谢中有着重要的调节作用, 其研究成为该领域的热点之一, 但 Fsp27 调控脂肪水解的机制仍不清楚, 亟需深入的研究.

为了研究 Fsp27 参与调控脂肪水解的具体机制, 本研究将前脂肪细胞 (3T3-L1 preadipocyte) 培养分化成为成熟的脂肪细胞, 并以此为细胞模型分别检测了在敲低 Fsp27、敲低 HSL 以及同时敲低 Fsp27 和 HSL 的条件下脂肪细胞的脂肪水解速率, 发现敲低 Fsp27 基因产生的基础脂肪水解速率上升是由 HSL 所介导的. 进一步在前脂肪细胞中, 利用高分辨率的荧光显微镜观察了 HSL 蛋白在单独表达以及 Fsp27 共同表达的情况下的定位, 发现 HSL 在脂滴表面的定位受到 Fsp27 的明显抑制.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

本研究所使用的感受态细胞菌株 Trans-Blue、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  均从 TransGen 公司 (北京) 购买. 真核表达载体 pCherry 及 pEGFP 从 Addgene 公司 (美国) 购买. 真核细胞系为鼠源的 3T3-L1 成纤维细胞 (前脂肪细胞), 从 ATCC 公司 (美国) 购买. 真核细胞培养基 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 及胎牛血清 (fetal bovine serum) 从 Gibco 公司购买 (美国). 抗 ATGL 单克隆抗体 (兔源) 与抗 HSL 多克隆抗体 (兔源) 从 Cell Signaling Technology 公司 (美国) 购买, 抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体 (鼠源) 从 Sigma 公司 (美国) 购买,

抗 Fsp27 多克隆抗体(兔源)由本实验室自行制备. 用于诱导分化前脂肪细胞成为脂肪细胞的试剂包括胰岛素(insulin)、异丁基甲基黄嘌呤(iso-butylmethylxanthine, IBMX)、地塞米松(dexamethasone, DEX)均从 Sigma 公司(美国)购买.

## 1.2 真核表达载体构建

使用 TRIzol reagent 试剂盒(Invitrogen 公司, 美国)抽提小鼠白色脂肪组织总 RNA, 然后使用 Superscript III RT 试剂盒(Invitrogen)将 2  $\mu\text{g}$  总 RNA 反转录为 cDNA. 以此 cDNA 为模板, 根据不同限制性酶切位点设计的 PCR 引物, 将 *Fsp27*, *HSL*, *CGI-58*, *Perilipin1* 等基因的全长序列扩增出来, 并插入相应的 pCherry 或 pEGFP 真核表达载体中. *Fsp27* 的不同截断由本实验室徐文艺提供, 所有质粒均经过测序验证序列无误.

## 1.3 前脂肪细胞的诱导及分化

3T3-L1 前脂肪细胞在含有 10% 的胎牛血清的 DMEM 完全培养基中进行培养, 二氧化碳浓度为 5%, 温度为恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ . 在前脂肪细胞铺满培养皿并发生接触抑制后, 更换培养基并继续培养 48 h, 此后更换培养基为诱导培养基(含有 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 insulin, 0.5 mmol/L 的 IBMX 及 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的 DEX). 在诱导培养基中培养 48 h 后, 更换培养基为只含有 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin 的维持培养基, 每隔 2 天左右更换 1 次维持培养基直至细胞分化为成熟的脂肪细胞, 即可用于脂肪水解检测实验.

## 1.4 siRNA 基因沉默实验

化学合成了针对脂肪细胞内源 *Fsp27* 及 *HSL* 的特异性 siRNAs(Genepharma 公司, 上海)其序列分别为 *Fsp27*: 5'-AATCGTGGAGACAGAAGAATA-3', *HSL*: 5'-GCAAGAGTATGTCACGCTA-3'. 并使用电穿孔法将 siRNA 导入脂肪细胞. 在 3T3-L1 前脂肪细胞分化至第 6 天时, 使用胰蛋白酶(trypsin)将贴壁细胞从培养皿消化洗脱, 收集细胞并使用电穿孔缓冲液 Buffer L(Amaxa 公司, 德国)重悬, 与 siRNA 混合后, 转移到电转杯中, 并使用电转仪 Amaxa Nucleofector (Amaxa 公司)进行电穿孔, 最后用完全培养基将细胞重悬并转移到培养皿中继续贴壁培养. 培养 72 h 后, 脂肪细胞可用于检测脂肪水解速率, 并将细胞样品收集进行蛋白免疫印迹检测 siRNA 基因沉默效率.

## 1.5 基础脂肪水解速率检测

通过检测甘油分子的释放速率来显示脂肪水解速率. 分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞经由 siRNA 转染处理 3 天后, 用 37 $^{\circ}\text{C}$  预热好的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)轻轻洗 3 遍, 然后培养在不含血清的 Opti-MEM 培养基中(Gibco 公司), 分别在第 0, 1, 2, 3 h 吸取培养基样品. 并使用游离甘油分子检测试剂盒(Free Glycerol determination kit, Sigma 公司), 根据使用说明书测量培养基样品中的甘油分子的含量. 脂肪细胞经超声破碎后取样, 使用蛋白检测试剂盒(BioRad protein assay, BioRad 公司, 美国)进行蛋白含量的检测, 作为参照标准.

## 1.6 蛋白免疫印迹实验(Western blot)

用 2 $\times$ 十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfonate, SDS)上样缓冲液收获培养皿中的细胞样品, 并在 95 $^{\circ}\text{C}$  条件下煮沸 5 min. 将相同体积的不同实验组的样品上样于 SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis)胶中, 用 100 V 电压分离总蛋白, 然后在 300 mA, 4 $^{\circ}\text{C}$  条件下, 经过 1 h 将 SDS-PAGE 胶中蛋白转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上(Millipore 公司, 美国), 再将该 PVDF 膜置于含 5% 脱脂奶粉的 PBST 缓冲液(PBS+Tween20)中进行封闭 1 h. 然后加入一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 次日使用相应的兔源或鼠源的二抗(GE healthcare 公司, 美国)常温孵育 1 h 后即可曝光显色.

## 1.7 3T3-L1 前脂肪细胞转染及脂肪酸处理

3T3-L1 前脂肪细胞贴壁好, 细胞较为伸展, 脂滴形态明显, 因此本研究采用 3T3-L1 前脂肪细胞系来研究蛋白在细胞内以及脂滴表面的定位. 转染使用商业化 Lipofectamine2000 试剂盒转染(Invitrogen 公司), 第 1 天将较低密度的 3T3-L1 细胞接种在培养皿上, 第 2 天即可达到 50% 左右的密度, 按照使用说明进行转染, 质粒用量约为每个六孔板中的每 1 孔使用 2  $\mu\text{g}$ . 收获或固定细胞前 15 h 使用浓度为 200  $\mu\text{mol}/\text{L}$  油酸处理, 并按照使用说明添加 BODIPY558/568 标记的长链脂肪酸(Invitrogen 公司)用来标记脂滴.

## 1.8 荧光免疫染色

用 37 $^{\circ}\text{C}$  预热的 PBS 漂洗细胞后用 4% 的多聚甲

醛固定细胞 1 h, 然后使用含有 0.4% 的 Triton-X100 的 PBS 孵育 20 min, 对细胞进行通透. 接着使用含 10% 山羊血清的 PBS 对细胞进行封闭 1 h. 在一抗稀释液中室温孵育 2 h, 然后缓慢清洗 3 次, 每次 10 min. 然后在荧光二抗稀释液中常温孵育 1 h, 之后再清洗 3 次, 每次 10 min, 最后封片保存.

### 1.9 图片采集与处理

使用 Zeiss 激光共聚焦显微镜 LSM710META (Zeiss 公司, 德国), 物镜为 63×油镜, 激发光波长为 488 及 543 nm. 图片由 Zen(Carl Zeiss)软件进行拍摄采集, 最后经 Photoshop 图像软件对图片大小比例进行适当调整.

### 1.10 数据统计

所有数据均来自于 3 次以上的重复实验结果, 并使用 Graphpad Prism5.0 作图, 数据的表示方式为  $\bar{x} \pm SD$ , 不同组数据间的比较使用 *t* 测验, *P* 值小于 0.05 表示有明显差异, *P*<0.05 用\*表示, *P*<0.01 用\*\*表示, *P*<0.001 用\*\*\*表示.

## 2 结果与分析

### 2.1 沉默 Fsp27 基因导致基础脂肪水解速率上升由 HSL 所介导

为了研究 Fsp27 与脂肪水解的关系, 本研究将特异性沉默 Fsp27 基因的 siRNA 与非特异性的对照

siRNA 通过电穿孔转染的方法转入 3T3-L1 脂肪细胞中. 蛋白免疫印迹结果显示, 实验组中的 Fsp27 的表达水平明显降低(图 1A), 说明针对 Fsp27 基因的 siRNA 具有较高的沉默效率. 脂肪水解速率检测结果显示, 实验组的甘油分子释放速率从 0 h 开始即比对照组要高(图 1B), 在 3 h 达到了对照组的 2.5 倍(图 1C), 说明在基因沉默 Fsp27 蛋白的脂肪细胞中, 基础脂肪水解速率有明显的上升.

进一步研究了脂肪细胞在 HSL 基因被沉默时的脂肪水解速率, 蛋白免疫印迹结果显示, 特异性针对 HSL 的 siRNA 的基因沉默效率较高(图 1A). 结果符合预期<sup>[16]</sup>, 脂肪细胞在缺失了 HSL 之后, 释放甘油分子的速率有较为明显的下降(图 1B 和 C).

为了研究沉默 Fsp27 基因导致的基础脂肪水解速率上升是否由 HSL 介导, 在 3T3-L1 脂肪细胞中同时转入了针对 Fsp27 的 siRNA 以及针对 HSL 的 siRNA, 蛋白免疫印迹结果显示, 同时转入 2 种 siRNA 后, Fsp27 和 HSL 基因都被有效地沉默, 蛋白水平明显下降. 值得注意的是, 在转入 2 种 siRNA 的实验组中, 甘油分子的释放速率处在与空白对照组较为一致的水平, 该结果显示, 在沉默 HSL 基因的脂肪细胞中再沉默 Fsp27 无法使甘油分子释放速率上升, 说明沉默 Fsp27 基因导致的脂肪水解速率上升确实由 HSL 介导.

### 2.2 Fsp27 特异性抑制 HSL 在脂滴表面的定位

在脂肪细胞中, HSL 能否定位在脂滴表面是决定

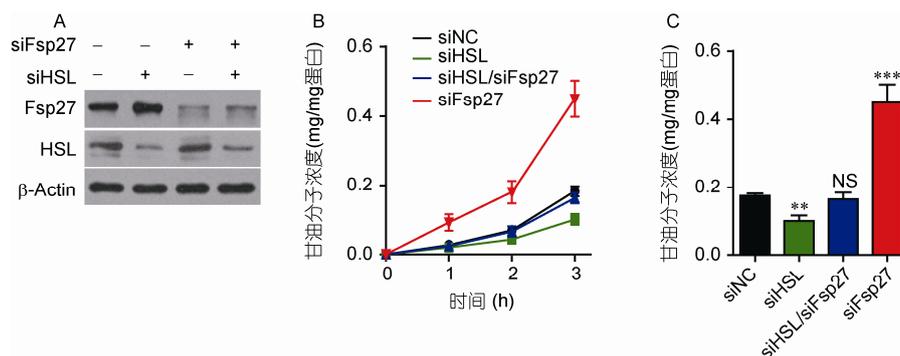


图 1 Fsp27 基因沉默引起的脂肪水解速率上升由 HSL 所介导(网络版彩图)

A: 在分化第 6 天的 3T3-L1 脂肪细胞中通过电穿孔转染的方法分别转入 siNC, siFsp27, siHSL 以及 siFsp27 和 siHSL 的混合物. 72 h 后收获细胞并使用蛋白免疫印迹检测相应基因的沉默效率; B: 转染 72 h 后, 更换培养基为无血清的 Opti-MEM, 每隔 1 h 吸取 100  $\mu$ L 培养基样品并检测其中甘油分子的浓度, 细胞经超声破碎后检测蛋白浓度作为参照标准; C: 第 3 h 不同实验组培养基中所含甘油分子的浓度. 沉默 Fsp27 基因后浓度明显上升, 沉默 HSL 基因后浓度明显下降, 同时沉默 Fsp27 基因与 HSL 基因甘油分子释放无明显变化. NS: 无显著性差异;

\*\**P*<0.01; \*\*\**P*<0.001

其能否发挥功能的重要前提. 为了进一步研究 Fsp27 是如何通过 HSL 影响脂肪水解, 本研究观察了 Fsp27 对 HSL 在脂滴表面的定位是否有影响. 在 3T3-L1 前脂肪细胞中单独表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标签的 HSL, 并用红色 BODIPY558/568 染料标记脂滴, 发现 HSL 不仅可以分布在细胞质中, 也可以定位在脂滴表面. HSL 可围绕脂滴形成一圈绿色荧光信号(图 2A), 且脂滴定位强度要略强于细胞质定位, 说明 HSL 可以部分定位在脂滴表面. 同时表达了带有 GFP 标签的 HSL 及带有 Cherry 红色荧光蛋白标签的 Fsp27. Fsp27 是报道过可以定位在脂滴表面的蛋白<sup>[15]</sup>. 图 2A 显示, Fsp27 可以定位且绝大多数都富集在脂滴表面并形成一圈红色荧光信号, 但在此时却观察不到任何绿色荧光信号富集在脂滴表面(图 2A), 说明受到 Fsp27 的影响, HSL 无法定位在脂滴表面. 为了验证 HSL 无法定位在脂滴表面是否由于其蛋白表达受到了 Fsp27 的影响, 对同时转染 HSL 与 Fsp27 的细胞样品进行蛋白免疫印迹实验, 结果显示, HSL 与 Fsp27 蛋白均表达良好(数据未显示).

作为参照实验, 将 HSL 与 Perilipin1 共同转染进入 3T3-L1 前脂肪细胞内, 发现 HSL 在脂滴表面的定位变得更加明显(图 2A), 这一结果与之前的报道 Perilipin1 能促进 HSL 在脂滴上的定位相一致<sup>[17]</sup>. 通过统计每 100 个细胞中有 HSL 在脂滴表面定位的细胞数目(图 2B), 可以发现 Fsp27 能明显抑制 HSL 在脂滴上的定位, 几乎没有细胞中的 HSL 可以在 Fsp27 蛋白存在的条件下定位到脂滴上. 此外, 通过观察另外一个脂滴表面蛋白 CGI-58 在 3T3-L1 前脂肪细胞中单独表达以及同时与 Fsp27 共同表达的情况下在脂滴表面定位的能力, 发现 Fsp27 并不能抑制 CGI-58 在脂滴表面的定位(图 2A 和 C), 进一步说明 Fsp27 对 HSL 在脂滴表面上定位的抑制是特异性的.

### 2.3 Fsp27 对 HSL 脂滴表面定位的抑制主要由其 C 端介导

为了进一步确认 Fsp27 蛋白的哪一段区域介导了其 HSL 脂滴表面定位的抑制作用, 本研究构建了 Flag 标签的 Fsp27 的不同区段的质粒, 并将它们与带 GFP 标签的 HSL 共同表达在 3T3-L1 前脂肪细胞中, 经过免疫染色后, 即可以观察 Fsp27 不同区段的自身定位以及对 HSL 脂滴定位的影响. Fsp27 的 N 端区域 1~135(含有 CIDE 蛋白家族中保守的 CIDE-N 结构域)不能定位在脂滴上, 且不能抑制 HSL 在脂滴表

面的定位(图 3A 和 B). Fsp27 的 C 端区域 136~239(含有 CIDE 蛋白家族中保守的 CIDE-C 结构域)可以定位

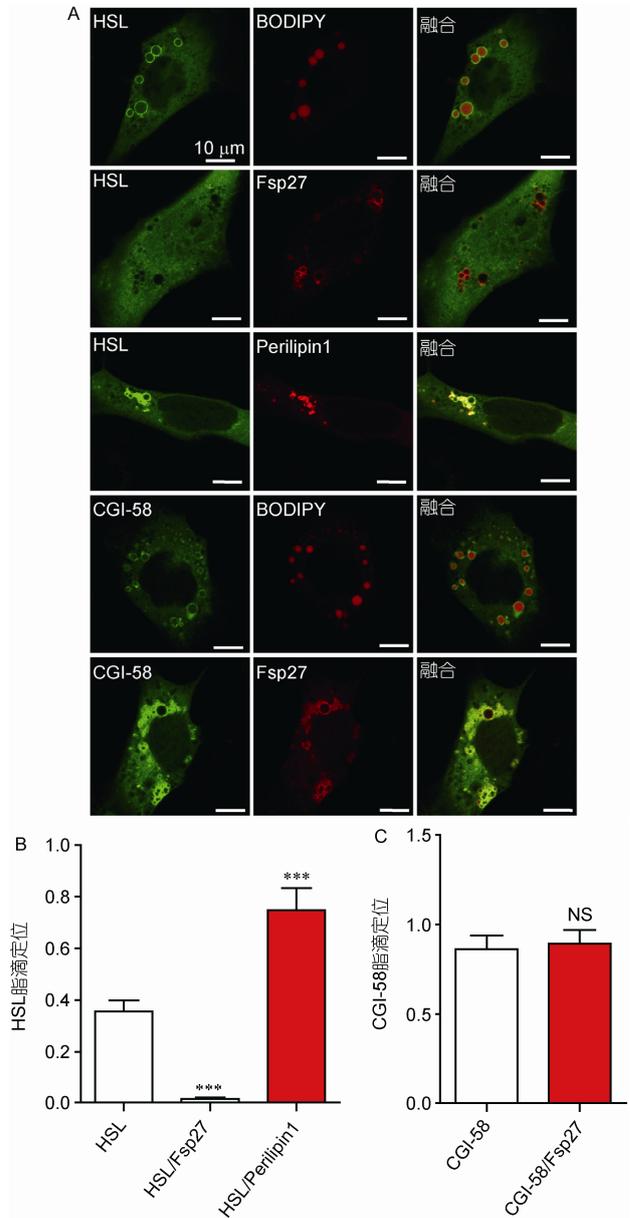


图 2 Fsp27 可特异地抑制 HSL 的脂滴定位.

A: 在 3T3-L1 前脂肪细胞中, GFP-HSL 在单独转染以及与 Perilipin1 共同转染时都可以定位在脂滴上, 但在与 Fsp27 共同转染时则无法定位在脂滴上. GFP-CGI-58 在单独转染或与 Fsp27 共同转染时都可以定位在脂滴上. 脂滴用 BODIPY558/568 标记; B: 每 100 个细胞中能观察到 GFP-HSL 在脂滴上有定位的细胞数所占比例. Fsp27 几乎完全抑制了 HSL 的脂滴定位, Perilipin1 则可以促进 HSL 的脂滴定位; C: 每 100 个细胞中能观察到 GFP-CGI-58 在脂滴上有定位的细胞数所占比例, Fsp27 对 CGI-58 的脂滴定位没有任何影响. NS: 无显著性差异; \*\*\*:  $P < 0.001$

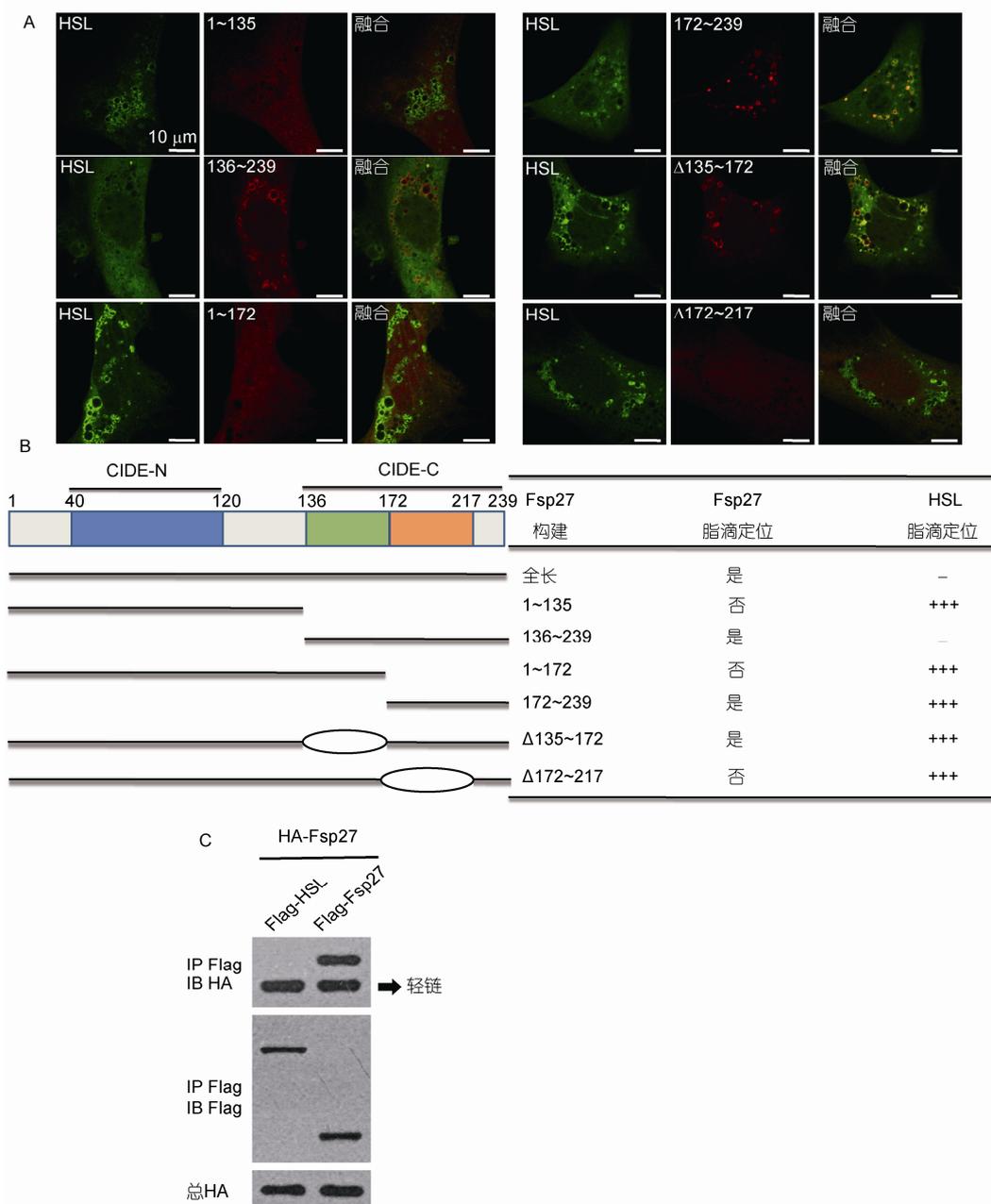


图3 Fsp27 的 C 端是抑制 HSL 脂滴定位的关键区域

A: 将 GFP-HSL 与带有 Flag 标签的 Fsp27 的不同区段共同转染在 3T3-L1 前脂肪细胞中, 通过免疫荧光染色观察定位; B: Fsp27 各个区段自身的定位以及对 HSL 脂滴定位的影响。1~135, 1~172 以及 Δ172~217 不能定位在脂滴上且不能抑制 HSL 的脂滴定位, 172~239 与 Δ135~172 可以定位在脂滴上但也不能抑制 HSL 的脂滴定位, 整个 C 端 136~239 可以定位在脂滴上也可以抑制 HSL 的脂滴定位; C: Fsp27 与 HSL 之间并不存在直接的相互作用

在脂滴上并且可以有效地抑制 HSL 在脂滴表面的定位(图 3A 和 B)。根据本实验室之前的研究, Fsp27 蛋白定位在脂滴表面的结构域是 172~217。这里,

Δ172~217 以及 1~172 都是缺乏这个脂滴定位结构域的区段, 无法定位在脂滴上, 同时也丧失了抑制 HSL 在脂滴表面定位的能力(图 3A 和 B), 说明 Fsp27 的脂

滴定位结构域对其抑制 HSL 在脂滴表面定位的能力是必需的. 但仅拥有 172~217 这个脂滴定位结构域并不足以抑制 HSL 在脂滴上的定位, 因为在与 172~239 及  $\Delta$ 135~172 共同表达的情况下, HSL 仍可以定位在脂滴表面(图 3A 和 B), 说明 *Fsp27* 基因的整个 C 端对于其抑制 HSL 的脂滴定位的能力是必要的.

为了进一步探究 *Fsp27* 对 HSL 在脂滴表面定位的影响是否由于二者之间的相互作用, 在 293T 细胞中表达了带有 Flag 标签的 HSL 及带有 HA 标签的 *Fsp27* 并进行免疫共沉淀分析. 由于 *Fsp27* 已经被报道过可以形成二聚体<sup>[18]</sup>, 因此在本研究中采取 Flag 标签的 *Fsp27* 以及 HA 标签的 *Fsp27* 之间的相互作用作为阳性参照. 通过使用与 Flag 抗体交联的凝胶微球将带有 Flag 标签的 *Fsp27* 及 HSL 蛋白免疫沉淀并经过蛋白免疫印迹检测后, 如图 3C 所示, 带有 Flag 标签的 *Fsp27* 与 HSL 蛋白均可以被免疫沉淀. 此外, 实验组与对照组中的细胞总蛋白样品中的 HA 标签的 *Fsp27* 也均表达良好. 在免疫共沉淀产物中能检测到阳性对照组的 HA 标签的 *Fsp27*, 显示 Flag 标签的 *Fsp27* 可以免疫共沉淀 HA 标签的 *Fsp27*, 但在实验组的免疫共沉淀产物中却检测不到 HA 标签的 *Fsp27* 蛋白的信号, 说明 Flag 标签的 HSL 无法免疫共沉淀 HA 标签的 *Fsp27* 蛋白, 也就是说 HSL 与 *Fsp27* 之间并不

存在直接的相互作用.

## 2.4 *Fsp27* 通过抑制 HSL 脂滴定位从而调控脂肪水解的模型

根据以上实验结果, 可以得出 *Fsp27* 通过抑制 HSL 的脂滴定位从而调控脂肪水解速率的基本模型(图 4). 在野生型小鼠脂肪组织中, 或者在表达 *Fsp27* 蛋白的细胞中, *Fsp27* 蛋白水平处于较高的状态, *Fsp27* 定位在脂滴上并且抑制 HSL 定位到脂滴表面, 因此绝大多数的 HSL 分布在细胞质中而无法接触到脂滴中所包含的中性脂肪 TAG, 因此细胞不能有效地进行脂肪水解. 而在 *Fsp27* 敲除小鼠的脂肪组织或者基因沉默 *Fsp27* 的脂肪细胞中, 没有 *Fsp27* 蛋白或者只有非常低的 *Fsp27* 蛋白, 此时解除了 *Fsp27* 对 HSL 脂滴定位的抑制, HSL 可以很好地定位在脂滴表面并且与脂滴中的 TAG 有充分的接触, 因而可以有效地介导脂肪水解. 因此, *Fsp27* 蛋白直接影响到脂肪水解关键酶 HSL 在脂滴表面定位, 影响脂肪水解以及脂类的积累.

## 3 讨论

作为一个在脂肪组织中特异性表达的基因,

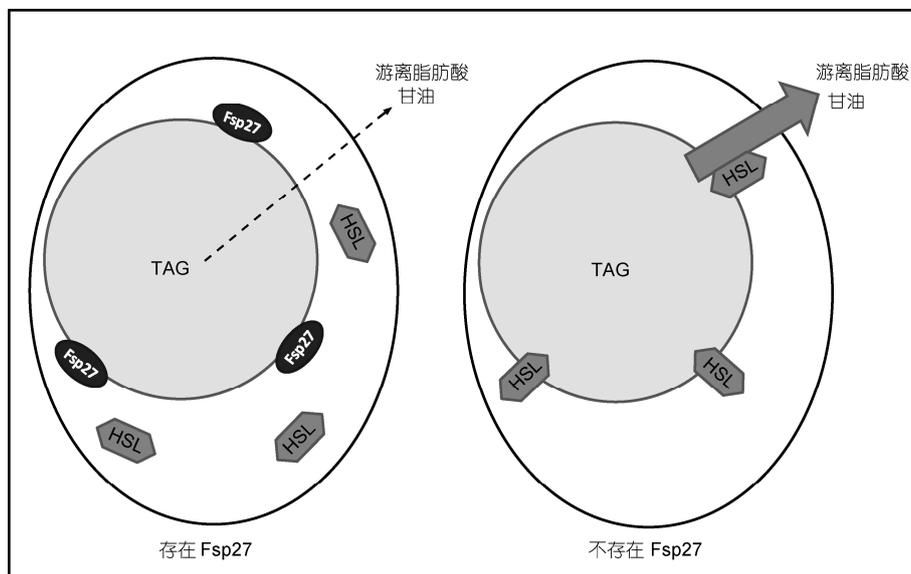


图 4 *Fsp27* 通过影响 HSL 的脂滴定位调控脂肪水解的模型

在 *Fsp27* 存在的条件下, *Fsp27* 结合在脂滴上并抑制 HSL 在脂滴表面的定位. 脂肪细胞不能进行有效的脂肪水解. 在 *Fsp27* 不存在或者蛋白水平较低的情况下, HSL 可以从细胞质中转移到脂滴表面并催化三酰甘油水解成为游离脂肪酸及甘油分子, 脂肪细胞可以进行较高水平的脂肪水解

Fsp27与脂代谢的关系一直是脂代谢研究领域中的一个重要方向. 本实验室之前在 Fsp27 敲除小鼠的白色脂肪组织中检测到显著上升的脂肪水解速率, 暗示 Fsp27 基因可能参与了脂肪水解这一重要的脂肪代谢过程. 本研究以 3T3-L1 前脂肪细胞经诱导分化形成的脂肪细胞为细胞模型, 发现脂肪细胞在使用 siRNA 特异性沉默 Fsp27 基因后, 基础脂肪水解速率明显上升, 得到了与之前研究相一致的结论<sup>[3]</sup>, 并发现这一现象是由于 Fsp27 抑制了脂肪水解中的关键酶 HSL 在脂滴表面的定位, 说明 Fsp27 确实可以直接参与脂肪水解的调控. 本实验室之前的研究显示, Fsp27 是一个不稳定的蛋白, 其半衰期只有 1 h 左右并可以经泛素-蛋白酶体途径快速降解<sup>[19]</sup>, Fsp27 的稳定性受到细胞内脂肪酸水平的调控, 在加入油酸 (oleic acid, OA) 的条件下其稳定性显著增加. 因此在脂肪酸添加时 Fsp27 的蛋白水平会显著提高并抑制脂肪水解, 来适应此时细胞内脂肪酸较多的状态. 而在缺失脂肪酸时, Fsp27 的蛋白稳定性下降导致 Fsp27 的水平降低, 此时 Fsp27 对 HSL 的抑制解除, 脂肪水解速率增加并产生脂肪酸来满足机体的需求. 可见 Fsp27 在调控脂肪水解以及脂类储存中担任了一个更为动态的角色.

尽管 HSL 已被发现和研究了数十年, 但是 HSL 是如何从细胞质转移到脂滴表面仍是一个重要且未被解释清楚的问题. 目前的较多观点认为, 在未受 $\beta$ -肾上腺素刺激下, 细胞中的 HSL 主要分布在细胞质中, 受到激素刺激后, Perilipin1 被 PKA 磷酸化之后对 HSL 转移到脂滴表面起到了重要的作用<sup>[17]</sup>. 但最新的对脂肪细胞中内源性 HSL 的研究发现, 即使在本底条件下, 也有 50%左右的 HSL 可以定位在脂滴表面, 并且证明了在 Perilipin1 无法磷酸化的条件下, 受到激素刺激的脂肪细胞中的 HSL 也可以转移到脂滴表面, 但却无法进行有效的脂肪水解, 说明 Perilipin1 的磷酸化对于 HSL 的脂滴定位并非必需,

而是对 HSL 是否发挥其水解功能起关键作用<sup>[20]</sup>. 本研究发现, 在 3T3-L1 前脂肪细胞中, 过表达的 HSL 确实在未受刺激条件下就可以定位在脂滴表面, 并且过表达 Perilipin1 在细胞未受刺激条件下即可以促进 HSL 的脂滴定位, 而 Fsp27 则抑制 HSL 的脂滴定位. 由于 Fsp27 与 HSL 之间并没有直接的相互作用, Fsp27 对 HSL 脂滴定位的抑制作用可能需要其他蛋白参与. 本实验室之前的研究显示, Fsp27 的 N 端结构域可以与 Perilipin1 发生特异性的相互作用并进一步增强 Fsp27 促进脂滴融合的能力<sup>[18]</sup>, 因此 Fsp27 调控 HSL 脂滴表面定位的机制是否是由其与 Perilipin1 的相互作用所介导也有待进一步研究. 另一方面, 对磷酸化位点突变型 HSL 的研究显示, HSL 自身的磷酸化对于其从细胞溶质到脂滴表面的转移也是必需的<sup>[21]</sup>, 因此, 深入研究 Fsp27 是否影响了 HSL 的翻译后修饰尤其是磷酸化修饰也许可以了解 Fsp27 调控 HSL 脂滴表面定位的机制提供一些线索. 此外, 研究显示, 脂肪酸结合蛋白 (fatty acid binding protein, FABP) 可以与 HSL 发生直接的相互作用并促进 HSL 的脂肪水解能力<sup>[22]</sup>, 以及 Lipotransin 也可以结合 HSL 并在胰岛素的作用下调控 HSL 的活性<sup>[23]</sup>. 因此, 研究 Fsp27 是否调控 HSL 的水解酶活性, 是否参与了 Perilipin1 对 HSL 定位的调控, 以及 Fsp27 是否参与 FABP, Lipotransin 和 HSL 之间的相互作用将是本研究的下一步工作.

值得注意的是, Fsp27 的整个 C 端以及 Fsp27 蛋白在脂滴表面的定位对于其抑制 HSL 脂滴定位的能力是必要的, 而 Fsp27 的 C 端恰好又是其促进脂滴融合与增大的功能所必需的, 包括脂滴定位结构域 172~219 以及促进 Fsp27 蛋白在 LDGS 富集的结构域 136~172<sup>[15]</sup>. 因此 Fsp27 抑制 HSL 的脂滴定位进而抑制脂肪水解的能力与其促进脂滴融合的能力是否有内在的联系需要从结构生物学以及分子细胞生物学的角度进行更为深入的研究.

## 参考文献

- 1 Cheng H Y. Midlife body mass index and total mortality. *JAMA-J Am Med Assoc*, 2006, 295: 1772
- 2 Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, et al. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1504: 82-106
- 3 Toh S Y, Gong J, Du G, et al. Up-regulation of mitochondrial activity and acquirement of brown adipose tissue-like property in the white adipose tissue of Fsp27 deficient mice. *PLoS One*, 2008, 3: e2890
- 4 Duncan R E, Ahmadian M, Jaworski K, et al. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu Rev Nutr*, 2007, 27: 79-101
- 5 Schwartz J P, Jungas R L. Studies on the hormone-sensitive lipase of adipose tissue. *J Lipid Res*, 1971, 12: 553-562
- 6 Zechner R, Kienesberger P C, Haemmerle G, et al. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid*

- Res, 2009, 50: 3–21
- 7 Lafontan M, Langin D. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res*, 2009, 48: 275–297
  - 8 Wang S P, Laurin N, Himms-Hagen J, et al. The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obes Res*, 2001, 9: 119–128
  - 9 Zimmermann R, Strauss J G, Haemmerle G, et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science*, 2004, 306: 1383–1386
  - 10 Zimmermann R, Strauss J G, Haemmerle G, et al. FAT SIGNALS—lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab*, 2012, 15: 279–291
  - 11 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. *Cell Metab*, 2006, 3: 309–319
  - 12 Zhou Z, Yon Toh S, Chen Z, et al. Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet*, 2003, 35: 49–56
  - 13 Gong J, Sun Z, Li P. CIDE proteins and metabolic disorders. *Curr Opin Lipidol*, 2009, 20: 121–126
  - 14 Matsusue K, Kusakabe T, Noguchi T, et al. Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene *Fsp27*. *Cell Metab*, 2008, 7: 302–311
  - 15 Gong J, Sun Z, Wu L, et al. *Fsp27* promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites. *J Cell Biol*, 2011, 195: 953–963
  - 16 Langin D, Dicker A, Tavernier G, et al. Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes*, 2005, 54: 3190–3197
  - 17 Sztalryd C, Xu G, Dorward H, et al. Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol*, 2003, 161: 1093–1103
  - 18 Sun Z, Gong J, Wu H, et al. Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of *Fsp27* in adipocytes. *Nat Commun*, 2013, 4: 1594
  - 19 Nian Z, Sun Z, Yu L, et al. Fat-specific protein 27 undergoes ubiquitin-dependent degradation regulated by triacylglycerol synthesis and lipid droplet formation. *J Biol Chem*, 2010, 285: 9604–9615
  - 20 Miyoshi H, Souza S C, Zhang H H, et al. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*, 2006, 281: 15837–15844
  - 21 Su C L, Sztalryd C, Contreras J A, et al. Mutational analysis of the hormone-sensitive lipase translocation reaction in adipocytes. *J Biol Chem*, 2003, 278: 43615–43619
  - 22 Jenkins-Kruchten A E, Bennaars-Eiden A, Ross J R, et al. Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding. *J Biol Chem*, 2003, 278: 47636–47643
  - 23 Syu L J, Saltiel A R. Lipotransin: a novel docking protein for hormone-sensitive lipase. *Mol Cell*, 1999, 4: 109–115

## Fsp27 Inhibits Lipolysis by Excluding HSL from Lipid Droplet Surface

LI Cong, ZHOU LinKang & LI Peng

*Protein Science Laboratory of Ministry of Education, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China*

Fat-specific protein 27 (*Fsp27*), a member of the CIDE family proteins, has been shown to be a lipid droplet-associated protein that promotes lipid storage in adipose tissue. *Fsp27* knock-out mice have increased energy expenditure and are resistant to diet-induced obesity. *Fsp27*-induced lipid storage is mediated either by enhancing lipid droplet fusion or inhibiting lipolysis. However, the mechanism by which *Fsp27* controls lipolysis remains unclear. Here, we observed that increased lipolysis in *Fsp27* knockdown adipocytes was significantly abrogated when HSL was knocked down. In addition, we found that when co-expressed with *Fsp27*, HSL was excluded from lipid droplet surface. Furthermore, HSL exclusion was dependent on the C-terminal region of *Fsp27*. Our data indicate that *Fsp27* regulates lipolysis by inhibiting the lipid droplet association of HSL, providing a novel mechanism for the regulation of lipid storage in adipose tissue and the development of obesity.

**obesity, lipid droplets, lipolysis, Fsp27, HSL**

doi: 10.1360/052014-65