

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.27.007

雷帕霉素对小鼠原代肝细胞脂滴形态和脂滴表面蛋白表达的影响*

李金存¹ 郑秉暄¹ 王超² 高星³ 叶菁^{2Δ}

(1 第四军医大学口腔系五队 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学病理与病理生理学教研室 陕西 西安 710032;

3 第四军医大学西京医院病理科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨雷帕霉素(Rapamycin)对小鼠原代肝细胞脂滴形态和脂滴表面蛋白表达的影响。**方法:**采用胶原酶灌注方法分离和培养小鼠原代肝细胞,采用 100 μ M 油酸诱导肝细胞内脂肪的合成。采用 0、10、20、50 μ M 的雷帕霉素处理肝细胞 12 hr 后,利用中性脂肪染料 Bodipy 493/503 对肝细胞内的脂滴进行染色,荧光显微镜下观察细胞脂滴形态和数量。定量试剂盒检测细胞内甘油三酯(TG)的含量利用 Western blot 检测不同浓度雷帕霉素处理的小鼠原代肝细胞脂滴表面蛋白 ADRP 的表达水平。**结果:**成功分离和培养了小鼠原代肝细胞,使用油酸处理能够明显增加原代肝细胞内脂滴的数量。随着体外雷帕霉素处理浓度的增加,荧光显微镜下观察发现原代肝细胞内脂滴的数量呈现明显的下降趋势,甘油三酯的含量也呈现明确的下降趋势,在 20 μ M 浓度下就表现出显著性差异。Western blot 结果显示雷帕霉素能够在抑制肝细胞内脂肪储积的同时降低脂滴表面蛋白 ADRP 的表达水平,并且随着雷帕霉素处理浓度的增加,其对 ADRP 表达的抑制越明显。**结论:**雷帕霉素能够抑制肝细胞内中性脂肪的储积,同时降低脂滴表面蛋白 ADRP 的表达水平。也间接说明了 mTOR 信号通路能够影响肝细胞内脂肪的储积,也为脂肪肝的防治提供了一个新的实验基础。

关键词:雷帕霉素;脂滴;脂滴表面蛋白;mTOR

中图分类号:Q95-3;R544 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)27-5220-05

Effects of Rapamycin on the Morphology of Lipid Droplets and the Expression of Lipid Droplet-associated Proteins in Mouse Primary Hepatocytes*

LI Jin-cun¹, ZHENG Bing-xuan¹, WANG Chao², GAO Xing³, YE Jing^{2Δ}

(1 Department of Stomatology company 5, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032;

2 Department of Pathology and Pathophysiology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

3 Department of Pathology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of different concentration of rapamycin on the morphology of lipid droplets(LD) and the expression of lipid droplet-associated proteins in mouse primary hepatocytes. **Methods:** The primary hepatocytes of mice were isolated and cultured using collagenase perfusion. 200 μ M oleic acid (OA) was used to stimulate and induce the production of the lipid in the hepatocytes and then 0 (control), 10, 20, 50 μ M rapamycin were added respectively. 12 hours later, Bodipy 493/503 staining was used to observe the morphology and amount of intracellular LD under fluorescence microscope. The Folch method and triglyceride quantitative kit were used to extract the total intracellular lipids and determine the TG contents. Furthermore, the expression of lipid droplet associated proteins (ADRP) was analyzed by Western Blot. **Results:** The mouse primary hepatocytes were isolated and cultured successfully. Oleic acid can increase the amount of intracellular LD. Along with the increase of treated concentration of rapamycin, the number of LDs and the content of TG in hepatocytes were gradually decreased. In addition, rapamycin could reduce the expression levels of ADRP. **Conclusion:** Rapamycin can inhibit intracellular lipid accumulation and decrease the expression levels of ADRP, suggesting the involvement of mTOR signaling pathway in intracellular lipid accumulation and providing the mechanism for the important role of mTOR in the cellular energy metabolism.

Key words: Rapamycin; Lipid droplets; Lipid droplet-associated proteins; mTOR

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3; R544 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)27-5220-05

前言

脂肪肝(Fatty Liver)在我国的一般人群中约有 25%的发病

率,肥胖人群发病率提高一倍;嗜酒和酗酒者更高。每年约有十分之一的脂肪肝患者发生肝硬化,进而诱发肝癌,这些都需要全社会予以关注^[1]。正常肝脏中脂肪主要参与的是细胞基本组

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81101752;81101711)

作者简介:李金存(1991-),男,医学本科生,主要研究方向:脂肪代谢,电话:18700916529, E-mail: 3032010161@fmmu.edu.cn

Δ通讯作者:叶菁, E-mail: yejing1219@gmail.com

(收稿日期:2014-02-12 接受日期:2014-03-13)

分的构成,几乎不出现脂滴,且含量比较少,不足肝脏湿重的二十分之一。脂肪肝是指各种原因引起的肝细胞内脂肪堆积。当肝脏细胞内出现脂滴,或者肝脏内脂肪的含量超过正常值,均可以称为脂肪肝。深入了解肝细胞内脂肪形成和代谢的机制,寻找抑制肝细胞内脂肪积累的药物,对于脂肪肝的治疗具有重要意义。

目前关于肝脏功能的研究,均是选用一些已经建系成功的肝细胞系或者是肝癌细胞系,如 HepG2、McA-RH 7777 等,但这些细胞系与体内真正的肝细胞状态还是有所差距^[23]。原代肝细胞在脂肪分泌、合成和分解过程上均与正常肝细胞非常相近,有利于我们研究雷帕霉素对肝细胞脂肪代谢的影响。而且我们实验室拥有一套成熟的分离原代肝细胞的方法体系。我们主要利用胶原酶肝脏灌注消化活体小鼠肝脏,从而达到分离小鼠原代肝细胞的目的,然后使用新鲜的原代肝细胞作为细胞载体,更加贴近正常肝细胞的去研究雷帕霉素对肝细胞功能的影响。

在真菌、植物、昆虫和哺乳动物等很多物种的细胞内,脂滴(Lipid Droplets, LD)是细胞内储存脂类的重要部位。在过去的十年里,研究人员发现脂滴是一种非常复杂的受控的细胞器。脂滴的中心是中性脂肪,外被有单层磷脂,多种脂滴相关蛋白(Lipid Droplet-Associated Proteins)镶嵌其中。目前的研究发现这些蛋白分子参与了脂滴代谢、传输(Transport)、细胞内转运(Trafficking)过程^[24]。Perilipin 是第一个被发现的脂滴表面蛋白^[25]。随后,人们陆续发现了多种脂滴表面蛋白,其中 PAT 蛋白一个非常重要的家族,它是以其中的 Perilipin、ADRP、TIP47 三种最先发现的蛋白名称的首字母命名。其中,脂肪分化相关蛋白(adipose differentiation-related protein, ADRP)在脂滴的分布更为广泛,该蛋白分子量为 53 kd,由 426 个氨基酸组成^[23-25]。ADRP 最早发现存在于牛奶中脂滴的表面,现在一般认为它可能在前脂肪细胞的早期分化过程中发挥作用。ADRP 可以辅助细胞摄取和转运长链氨基酸,这是由它脂肪酸结合蛋白的属性决定。而 ADRP mRNA 和蛋白质在前脂肪细胞中的表达则依赖长链脂肪酸的剂量和时间^[26]。

雷帕霉素(Rapamycin, RAPA)是一种新型大环内酯类免疫抑制剂,又名 Sirolimus。雷帕霉素能够与 FK506 结合蛋白(FKBP12)形成复合物,从而抑制雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)及其信号通路。由此,雷帕霉素表现出免疫抑制和抗增殖活性^[5]。作为免疫抑制药物,其被广泛用于肾脏、肝脏和心脏移植,以抗急性免疫排斥作用^[6]。此外,雷帕霉素还具有抗增殖活性,作为一种新型的抗肿瘤药物被逐渐应用于临床^[7]。最近的研究显示,雷帕霉素还能够抑制体外人类脂肪细胞分化,并有证据显示其能够调控细胞的代谢过程。

本实验以体外培养的小鼠原代肝细胞作为研究对象,探讨雷帕霉素对肝细胞脂滴数量以及脂滴表面蛋白表达的影响,试图为脂肪肝的防治提供新的实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF 级健康雄性 12 周龄 C57BL/6 小鼠,由第四军医大学实验动物中心提供。胶原酶(C-6885)为 Sigma 公司产品,高糖

DMEM 培养液和胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)均购自 Gibco 公司。山羊抗兔 ADRP 抗体购自 Abcam 公司。雷帕霉素购自 Sigma 公司(R8781)。中性脂肪荧光染料 Bodipy493/503 购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠原代肝细胞的分离培养 本实验采取胶原酶肝脏灌注消化麻醉小鼠肝脏,分离小鼠原代肝细胞。4g/L 戊巴比妥钠(100 mg/kg)麻醉 C57BL/6 小鼠;暴露小鼠腹腔,找到下腔静脉和门静脉,采用 21 号套管针从下腔静脉穿入,直至接近肝静脉;用 3 号丝线固定套管针,1 mM EGTA 和 0.1%葡萄糖的 Krebs-Ringer 缓冲液灌注肝脏,同时迅速切断门静脉使灌注液从门静脉流出,2 滴/秒的灌注速度,10 min 后使用 0.5 mg/ml 胶原酶和 5 mM CaCl₂的灌注液替换,然后接着灌注 10 min,随机小心取出肝脏,在 Krebs-Ringer 缓冲液中剪开肝脏包膜,200 目细胞筛网过滤细胞,含有 10% FBS 的 DMEM 洗涤细胞 2 次,50× g 离心。弃掉上清,重悬细胞沉淀,根据所需密度接种细胞。细胞培养液为添加 100 u/ml 青霉素和 10%FBS 的 DMEM,5% CO₂,37℃ 细胞培养箱培养^[8]。

1.2.2 雷帕霉素对小鼠原代肝细胞脂滴数量的影响 分离培养的小鼠原代肝细胞细胞 37℃ 培养 12 h 后,接种至六孔培养板上,继续 37℃ 培养 12 h 后,观察细胞形态是否呈现出正常的小鼠肝细胞形态。待细胞生长状态稳定后,向六孔板每个孔中加入等量的 200 μM 油酸(Oleic Acid, OA)继续培养 12 h,刺激肝细胞内脂滴的储积。然后依次给予细胞 0、10、20、50 μM 的雷帕霉素刺激,37℃ 培养 12 h。PBS 清洗细胞 3 遍,4%的福尔马林固定细胞 30 min,之后 PBS 清洗细胞 3 次。然后采用 Bodipy 493/503 染料染色方法对细胞进行染色,Hoechst 33342 方法染色细胞核作为衬托,最后封片固定。显微镜下观察细胞内脂滴形态和数量的变化并拍照作为实验结果。

同期(不同浓度雷帕霉素刺激)处理的细胞,Folch 法^[9]抽提细胞内总脂类。按照甘油三酯定量检测试剂盒的说明书进行操作,测定甘油三酯含量。Bradford 法测定总蛋白浓度^[8]。

1.2.3 Western blot 检测细胞表面脂滴蛋白的表达 小鼠原代肝细胞分离培养和雷帕霉素处理同前。加入 100 μL 2× 上样缓冲液并小心刮下细胞,尽量保证把细胞全部刮下来,确保所提取蛋白足量。将 0、10、20、50 μmol/L 的雷帕霉素处理后提取的蛋白样品,采用 10% SDS-PAGE 电泳分离,转印蛋白至 PVDF 膜。5%脱脂牛奶封闭 1 h,然后使用 PBST 缓冲液洗涤 5 次,加入 1:1000 浓度的山羊抗小鼠 β-tubulin、ADRP 抗体,置于 4℃ 冰箱摇床孵育过夜。取出后 PBST 缓冲液同样方法洗膜 4 次后,加入 1:5000 的 HRP 标记的二抗室温孵育 1 hr, PBST 缓冲液洗涤 3 遍,加入 ECL 发光液发光,压 X-Ray 片,显影、定影^[8]。

1.2.4 统计学分析 将实验所得数据全部输入到 SPSS16.0 统计软件进行统计学分析,计量资料的组间差异采用单样本方差分析(ANOVA)。

2 结果

2.1 小鼠原代肝细胞的分离与培养

肝脏细胞经过胶原酶消化,细胞筛网过滤,含 10% FBS 的 DMEM 洗涤后重悬细胞沉淀,Trypan Blue 染色证实分离的肝

细胞的存活率大于 90%。显微镜下观察贴壁后的肝细胞,可以发现肝细胞呈条索状排列,多为双核,具有细胞极性,如图 1A。体外培养 48 hr 后,肝细胞形态开始发生变化,细胞状态下降,细胞碎片增多,不利于后续实验的进行,因而此后实验中均采

用的体外培养 48 hr 以内的肝细胞。利用油酸处理后,能够明显增加原代肝细胞内脂滴的数量,如图 1B(油酸处理前),1C(油酸处理后)。

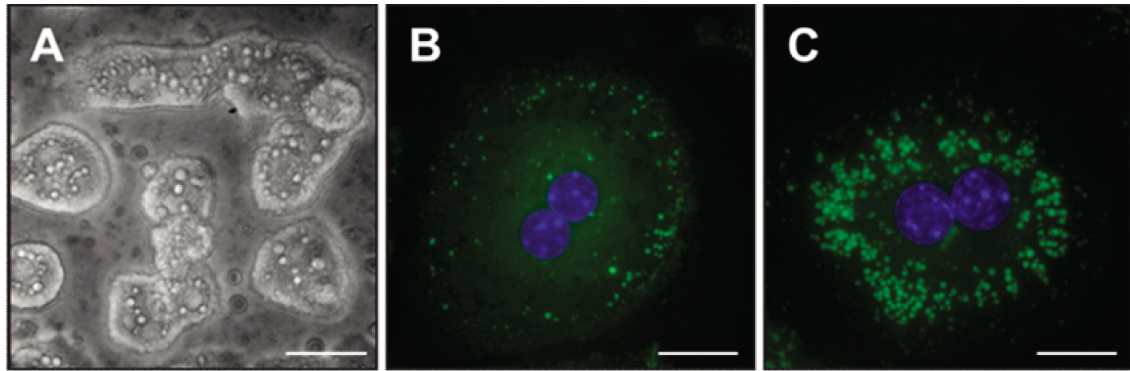


图 1 体外培养的肝细胞及其脂滴染色

A: 肝细胞体外培养镜下图, Bar=25 μm; B: 未经油酸处理的原代肝细胞脂滴染色, 绿色为 Bodipy 493/503 染色的脂滴, 蓝色为 Hoechst 33342 衬染的细胞核, Bar=10 μm; C: 经 200 μM 油酸处理后的原代肝细胞脂滴染色, 绿色为 Bodipy 493/503 染色的脂滴, 蓝色为 Hoechst 33342 衬染的细胞核, Bar=10 μm

Fig. 1 In vitro cultured liver cells and its lipid droplet staining

A: The morphology of cultured primary hepatocytes. Bar=25 μm; B: Hepatocytes treated without OA. The green represents lipid drops stained with Bodipy 493/503 and the blue represents nucleus stained with Hoechst 33342. Bar=10 μm; C: Hepatocytes treated with 200 μM OA. The green represents lipid drops stained with Bodipy 493/503 and the blue represents nucleus stained with Hoechst 33342. Bar=10 μm

2.2 雷帕霉素对肝细胞内脂滴数量及甘油三酯含量的影响

将雷帕霉素处理过的小鼠原代肝细胞分别用 Bodipy 493/503 对脂滴进行染色后,在显微镜下观察发现,不同浓度的雷帕霉素均能够降低肝细胞内脂滴的数量,并随着雷帕霉素浓

度的升高,小鼠原代肝细胞内脂滴数量明显减少,尤其表现在 20 表现在和 50 μM 浓度下(图 2),肝细胞内甘油三酯的含量也随着雷帕霉素处理浓度的增加而下降,与对照组相比,20 组相浓度起,就表现出显著差异(图 3),这些结果都可以说明,雷帕霉素能够抑制肝细胞内甘油三酯的积累,从而表现为脂滴数量的减少。

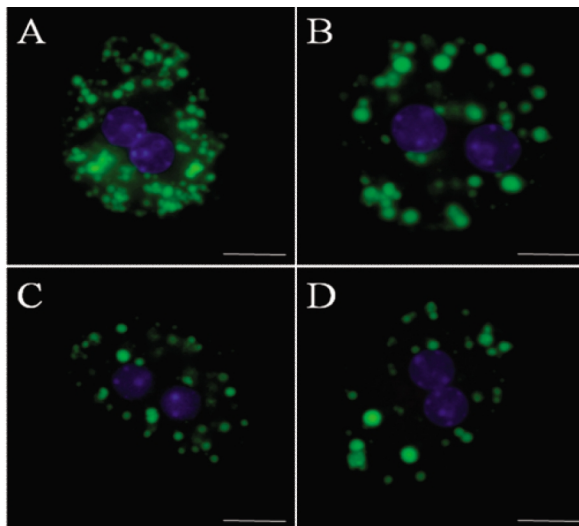


图 2 雷帕霉素对肝细胞脂滴数量的影响

A: 200 μM 油酸 + 0 μM 雷帕霉素; B: 200 μM 油酸 + 10 μM 雷帕霉素; C: 200 μM 油酸 + 20 μM 雷帕霉素; D: 200 μM 油酸 + 50 μM 雷帕霉素。图中绿色代表 Bodipy 493/503 染色的脂滴,蓝色为 Hoechst 33342 衬染的细胞核。Bar=10 μm

Fig. 2 The effect of rapamycin on the number of hepatocytes lipid drops

A: Hepatocytes treated with 200 μmol/L OA without rapamycin; B: Hepatocytes treated with 200 μmol/L OA and 10 μmol/L rapamycin; C: Hepatocytes treated with 200 μmol/L OA and 20 μmol/L rapamycin; D: Hepatocytes treated with 200 μmol/L OA and 50 μmol/L rapamycin. The green represents lipid drops stained with Bodipy 493/503 and the blue represents nucleus stained with Hoechst 33342. Bar=10 μm

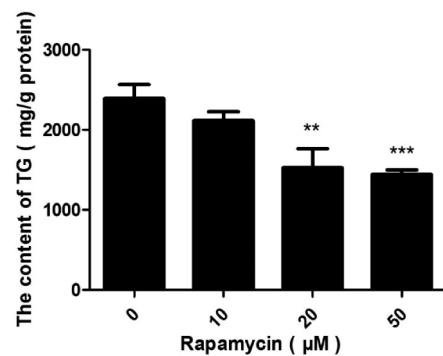


图 3 雷帕霉素对肝细胞内甘油三酯含量的影响

Fig. 3 The effect of rapamycin on the content of TG in primary hepatocytes

2.3 雷帕霉素对肝细胞内脂滴表面蛋白表达量的影响

真核细胞内脂滴的代谢过程主要受脂滴表面蛋白的调控,其中 PAT 家族是最为重要的一种脂滴表面蛋白。最近的研究显示, PAT 家族中的 ADRP 对肝细胞的脂肪代谢具有重要的作用。雷帕霉素能够抑制肝细胞内脂质的储积,为了探究进一步原因,我们采用 Western blot 分析雷帕霉素对脂滴表面蛋白 ADRP 表达水平的影响。结果显示,0、10、20、50 μM 雷帕霉素处理过的肝细胞内脂滴表面蛋白表达量逐渐降低,且与雷帕霉素浓度呈现负相关(图 4)。

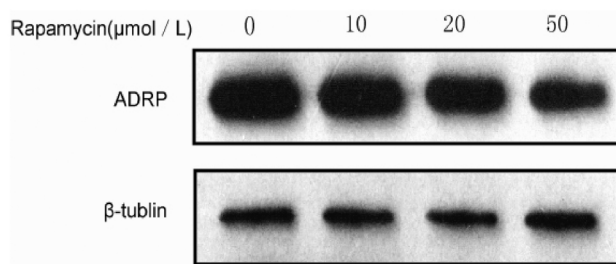


图4 雷帕霉素对脂滴蛋白 ADRP 表达水平的影响

Fig. 4 The effect of rapamycin on ADRP protein expression level

3 讨论

肝脏是一个重要的代谢器官,参与了脂类的消化、吸收、分解、合成及运输等过程。肝细胞在正常情况下,脂类物质含量较少,约为4-7%,而甘油三酯则占了其中一半以上,甘油三酯含量过高就会引起脂肪肝。脂肪肝是一种常见的临床现象,描述的肝细胞中脂肪含量的异常升高,并非作为一种独立的疾病来研究。脂肪肝的临床表现可轻可重,轻者无明显症状,重者病情发展凶猛。一般情况下,脂肪肝现象是可逆的,早期诊断并及时治疗即可恢复正常。

我们采取胶原酶肝脏灌注消化麻醉小鼠肝脏,分离和培养小鼠原代肝细胞。将得到的小鼠原代肝细胞分别给予0、200 μM油酸刺激后,用Bodipy 493/503对脂滴进行染色,在显微镜下观察发现细胞内脂质的含量明显增加,说明OA能够增加小鼠原代肝细胞内脂滴的数量(图1)。脂滴存在于真菌、植物、昆虫和哺乳动物等很多物种的细胞内,被认为是体内重要的能量储备,是细胞内储存脂类的重要部位^[10]。随着研究的深入,脂滴还参与许多物质代谢过程,是细胞内有功能的细胞器^[9]。之后我们分别用0、10、20、50 μM的雷帕霉素对小鼠原代肝细胞施加刺激,37℃培养12 h后,再用Bodipy 493/503对脂滴进行染色,显微镜下观察发现随着雷帕霉素浓度的增加,细胞内脂滴的数量明显减少,以20 μM和50 μM浓度表现的最为明显(图2)。为了印证这一结果,我们又抽提了经相同处理的原代肝细胞中的甘油三酯含量,发现从20 μM浓度雷帕霉素处理开始,TG的含量就显著减少(图3)。

为了研究雷帕霉素对脂质含量调节的机制,我们检测了脂滴表面蛋白的表达水平。随着雷帕霉素浓度的增加,细胞内脂滴表面蛋白ADRP的表达量逐渐降低(图4)。这表明雷帕霉素可能通过抑制细胞表面脂滴蛋白ADRP的表达来抑制细胞内脂滴沉积。ADRP作为脂滴表面蛋白PAT家族中的重要一员,几乎在所有类型的细胞内都有表达^[9]。通常情况下,ADRP被作为肝脏脂滴存在的标记物,也有研究发现可以提高ADRP表达的因素均能诱导肝细胞内TG含量的增加^[11]。目前认为ADRP主要在脂肪前体细胞的早期分化过程中发挥作用,过表达ADRP可以提高对长链脂肪酸的摄取和转运^[12]。还有研究认为ADRP对甘油三酯水解具有保护作用,这种作用的实现是通过阻碍脂肪细胞甘油三酯脂酶(adipose triglyceride lipase, ATGL)接触脂滴来实现^[13]。为了证实这种作用,有研究者采用了蛋白酶体抑制剂MG132去抑制CHO细胞中ADRP的降解,发现不仅ADRP的含量增加了,细胞内甘油三酯含量也大幅提高

^[17]。另有研究表明,ADRP基因敲除小鼠肝脏内TG含量明显降低,具有抗脂肪肝的作用^[14,16]。所以,雷帕霉素能够减少脂滴表面蛋白ADRP的表达量从而降低肝脏细胞内脂滴的含量,对脂肪肝的治疗和预防或许会起到一定的作用。

我们通过实验结果推测,雷帕霉素可能通过降低脂滴表面蛋白ADRP的表达水平来减少肝细胞内脂滴的沉积。然而这种作用的实现究竟是怎样实现的,目前也有多种解释,其中一种观点是雷帕霉素通过抑制雷帕霉素靶蛋白这条信号通路来发挥作用。雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)属于磷脂酰肌醇3-激酶相关激酶家族,是哺乳动物mTOR信号通路中雷帕霉素的靶分子,它是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[17]。它作为一种重要的调控基因在细胞周期、蛋白质代谢、细胞能量代谢等多种途径发挥重要的作用,特别是在脂肪代谢过程中起着中心调控点的作用。且已有临床研究证实,mTOR信号通路抑制剂对胸腺瘤的治疗发挥着重要的作用^[18]。已有研究表明在脂肪前体细胞中,mTOR表达明显升高,活化后脂质含量升高^[19],活化mTOR不仅可以促进脂肪前体细胞的分化还可以提高脂质的合成。过氧化物酶体增殖激活物受体(peroxisome proliferator-activated receptors,PPAR)家族可以调节ADRP基因的表达,且在小鼠和人类ADRP的启动子上都发现有PPAR的反应元件。PPAR均可通过激活PPAR与ADRP上游的反应元件结合,上调ADRP的mRNA水平,调控ADRP的表达。雷帕霉素作为mTOR的抑制剂,可以使脂肪形成和分化程度降低^[20]。还有研究发现抑制了mTOR信号通路,脂肪酸酯化和重新合成会有所困难^[21,22]。所以,在本实验中雷帕霉素作为mTOR信号通路的抑制剂,通过降低ADRP的表达来减少脂滴的形成,最终得到我们的实验结果。然而我们的结果并不是非常深入,我们接下来的研究就是雷帕霉素对肝细胞中脂质积累的调控机制,力图完整详细的阐述其调节机制。

参考文献(References)

- [1] Farrell G. C., Larter C. Z. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2006, 43(2 Suppl 1): S99-S112
- [2] Zehmer J. K., Huang Y., Peng G., et al. A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic[J]. *Proteomics*, 2009, 9(4): 914-921
- [3] Greenberg A S, Egan J J, Wek S A, et al. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(17): 11341-11346
- [4] Brasaemle D L, Barber T, Wolins N E, et al. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein [J]. *J Lipid Res*, 1997, 38 (11): 2249-2263
- [5] Marx S O, Marks A R. Bench to bedside: the development of rapamycin and its application to stent restenosis[J]. *Circulation*, 2001, 104(8): 852-855
- [6] Keogh A, Richardson M, Ruygrok P, et al. Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection and prevents coronary artery disease at 2 years: a randomized clinical trial [J]. *Circulation*, 2004, 110(17): 2694-2700
- [7] Guertin D A, Sabatini D M. An expanding role for mTOR in cancer[J]. *Trends Mol Med*, 2005, 11(8): 353-361

- [8] Wang C, Yuan Y, Li L, et al. Effects of resveratrol on the morphology of lipid droplets and the expression of lipid droplet-associated proteins in mouse primary hepatocytes [J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2012, 28(9): 911-914
- [9] Folch J, Lees M, Sloane Stanley G H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues[J]. J Biol Chem, 1957, 226(1): 497-509
- [10] Murphy D J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms[J]. Prog Lipid Res, 2001, 40(5): 325-438
- [11] Liu M F. The progress of adipose differentiation-related protein[J]. Progress in Physiological Sciences, 2012, 43(4): 241-246
- [12] Gao J, Serrero G. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake[J]. J Biol Chem, 1999, 274(24): 16825-16830
- [13] Listenberger L L, Ostermeyer-Fay A G, Goldberg E B, et al. Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover[J]. J Lipid Res, 2007, 48(12): 2751-2761
- [14] Magnusson B, Asp L, Bostrom P, et al. Adipocyte differentiation-related protein promotes fatty acid storage in cytosolic triglycerides and inhibits secretion of very low-density lipoproteins[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(7): 1566-1571
- [15] 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
- [16] Ohsaki Y., Cheng J., Suzuki M., et al. Lipid droplets are arrested in the ER membrane by tight binding of lipidated apolipoprotein B-100 [J]. J Cell Sci, 2008, 121(Pt 14): 2415-2422
- [17] Fingar D. C., Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression[J]. Oncogene, 2004, 23(18): 3151-3171
- [18] Wheler J., Hong D., Swisher S. G., et al. Thymoma patients treated in a phase I clinic at MD Anderson Cancer Center: responses to mTOR inhibitors and molecular analyses[J]. Oncotarget, 2013, 4(6): 890-898
- [19] Cho H. J, Park J, Lee H W, et al. Regulation of adipocyte differentiation and insulin action with rapamycin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 321(4): 942-948
- [20] Kim J E, Chen J. regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis[J]. Diabetes, 2004, 53(11): 2748-2756
- [21] Brown E. J., Albers M. W., Shin T. B., et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex [J]. Nature, 1994, 369(6483): 756-758
- [22] Chakrabarti P., English T., Shi J., et al. Mammalian target of rapamycin complex 1 suppresses lipolysis, stimulates lipogenesis, and promotes fat storage[J]. Diabetes, 2010, 59(4): 775-781
- [23] 张利军. OXPAT 对原代培养肝细胞脂滴形态的影响[D]. 西安: 第四军医大学基础部病理学与病理生理学教研室, 2008
Zhang Li-jun. The Effect of OXPAT on the Morphology of Lipid Droplet in Primary Cultured Mouse Hepatocytes [D]. Xi'an: Department of Pathology & Pathophysiology, Fourth Military Medical University, 2008
- [24] 李航. LSDP5 在肝脏脂肪和脂滴代谢中的作用及机制研究[D]. 西安: 第四军医大学基础部病理学与病理生理学教研室, 2011
Li Hang. The role and mechanism of LSDP5 in lipid droplet and lipid metabolism of liver[D]. Xi'an: Department of Pathology & Pathophysiology, Fourth Military Medical University, 2011
- [25] 刘芳. LSDP5 在脂肪代谢中功能的初步研究[D]. 西安: 第四军医大学基础部病理学与病理生理学教研室, 2009
Liu Fang. The Preliminary Studies on the Function of LSDP5 in Lipid Metabolism [D]. Xi'an: Department of Pathology & Pathophysiology, Fourth Military Medical University, 2009

(上接第 5219 页)

- [12] 刘江月, 张代娟, 刘同美, 等. TtR, sTtR 表达与 2 型糖尿病大鼠大血管病变的关系[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(18): 4494-4495
Liu Jiang-yue, Zhang Dai-juan, Liu Tong-mei, et al. The relationship between TtR, sTtR expression in rats with type 2 diabetes macroangiopathy [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2013, 33(18): 4494-4495
- [13] Jayaraman A, Pike CJ. Alzheimer's disease and type 2 diabetes: multiple mechanisms contribute to interactions [J]. Curr Diab Rep, 2014, 14(4): 476
- [14] Hanyu H. Diabetes mellitus and dementia [J]. Brain Nerve, 2014, 66(2): 129-134
- [15] Kleophas W, Dellanna F. Interdisciplinary interaction in vascular diseases of the eye, diabetes and diabetic retinopathy [J]. Ophthalmology, 2014, 111(1): 19-22
- [16] Kadoğlu NP, Sailer N, Fotiadis G, et al. The Impact of Type 2 Diabetes and Atorvastatin Treatment on Serum Levels of MMP-7 and MMP-8[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2014, 122(1): 44-49
- [17] Zeadin MG, Petlura CI, Werstuck GH. Molecular Mechanisms Linking Diabetes to the Accelerated Development of Atherosclerosis [J]. Can J Diabetes, 2013, 37(5): 345-350
- [18] Xu R, Yang R, Hu H, et al. Diabetes alters the expression of partial vasoactivators in cerebral vascular disease susceptible regions of the diabetic rat[J]. Diabetol Metab Syndr, 2013, 5(1): 63
- [19] Almagrouk TA, Ewart MA, Salt IP, et al. Perivascular fat, AMP-activated protein kinase and vascular diseases [J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(3): 595-617
- [20] Li RP, Xue FS, Cheng Y, et al. Assessing association between type 2 diabetes and cardiac complications after vascular surgery [J]. Anaesth Intensive Care, 2014, 42(1): 137