doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.04.001

・基础研究・ 新型荧光探针 mMaple3 与 mEos3.2 应用于 Fsp27 介导脂滴融合的 功能研究 *

黄超郁苗汪文敏廖榕玉徐俐周林康△ (清华大学生命科学学院北京100084)

摘要目的:Fsp27已经被证明定位在脂滴上并且介导脂滴融合与增大。为研究 Fsp27介导脂滴融合的动态分子机制,我们构建了 Fsp27-mMaple3和 Fsp27-mEos3.2两种新型荧光探针的融合蛋白并研究其对脂滴融合的功能影响,进而为研发 Fsp27相关生理 功能的光学显像技术奠定基础。方法:对照传统绿色荧光的融合蛋白 Fsp27-EGFP,在共聚焦显微镜下观察 Fsp27-mMaple3和 Fsp27-mEos3.2两种新型融合蛋白的亚细胞定位和介导脂滴融合的功能,并利用荧光漂白恢复术 (fluorescence recovery after photo-bleaching, FRAP)以判断脂滴与脂滴之间是否存在脂的交换。结果:表达 Fsp27-mMaple3和 Fsp27-mEos3.2两种新型融合蛋白皆集中在脂滴与脂滴的接触位点上,且中性脂的交换实验显示脂滴与脂滴之间可以相 互连通。结论:我们建构的两种新型荧光探针融合蛋白 Fsp27-mMaple3和 Fsp27-mEos3.2保持了 Fsp27介导脂滴融合的功能,并 为我们进一步研发新型的超分辨光学显像技术提供功能基础。

关键词:脂滴;荧光探针;亚细胞定位;Fsp27

中图分类号:Q593;Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2018)04-601-05

Novel Fluorescent Probes mMaple3 and mEos3.2 for The Functional Study of Fsp27-mediated Lipid Droplet Fusion*

HUANG Chao, YU Miao, WANG Wen-min, LIAO Rong-yu, XU Li, ZHOU Lin-kang

(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing, 100084, China)

ABSTRACT Objective: Fsp27 has been proved to be localized on lipid droplets (LDs) and mediates LD growth. To study the molecular mechanism of Fsp27-mediated LD fusion, here, we investigated the functional effect of two novel fluorescent probes, Fsp27-mMaple3 and Fsp27-mEos3.2, on LD fusion for the super-resolution imaging in physiological studies. **Methods:** In comparison with arecently used fluorescence fused-protein Fsp27-EGFP, we observed the subcellular localization of the two novel probes and the sizes of LDs under confocal microscopy; And, fluorescence recovery after photo-bleaching (FRAP) was used to examine the lipid exchange between lipid droplets. **Results:** LDs expressing Fsp27-mMaple3 and Fsp27-mEos3.2 in 3T3-L1 pre-adipocytes were significantly larger than that without expression of the two probes. The FRAP experiment confirmed the normal exchange between LDs expressing the two probes. **Conclusions:** The two probes we constructed exhibit their comparable abilities with wild type Fsp27 in LD fusion and growth, and the study provides a functional basis on development of super-resolution imaging.

Key words: Lipid droplet; Fluorescent probes; Subcellular localization; Fsp27

Chinese Library Classification(CLC): Q593;Q78 Document code: A Article ID: 1673-6273(2018)04-601-05

前言

肥胖时,体内能量失衡^[2],过多的营养以脂肪的形式储存起来^[1,2]。脂滴是细胞内储存能量的细胞器,在能量代谢的调节中起到重要作用^[3,4]。CIDE蛋白包括Cidea、Cideb、Cidec(在小鼠中为Fsp27),是一类和脂肪代谢密切相关的蛋白^[5,6]。既往研究显示Fsp27能够定位在脂滴上,并且能够介导脂滴融合和大脂滴的形成^[7],Fsp27缺失的细胞中脂滴明显变小。脂滴融合过程

中,Fsp27蛋白的组装分布与动态行为仍然不清楚^[8]。近几年, 超高分辨率技术 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)在观察细胞显微结构方面应用越来越多^[9,10]。相比于传 统的荧光蛋白技术,其可以提高拍摄影像的空间分辨率^[12],而 且可以很好地观测活细胞从而对细胞内的分子进行追踪或者 定量研究,可以大大提升观测影像的空间与时间解析能力^[12]。 因此,我们拟利用超分辨荧光显微技术来研究脂滴融合过程中 以及完成后 Fsp27 的动态行为^[11]。

^{*} 基金项目:中国博士后科学基金项目(2013T60103,2012M520249);周林康博士受中国科协 2016-2018 年度青年人才托举计划的支持 作者简介:黄超(1989-),男,硕士研究生,主要研究方向:生物学,电话:010-62797133,E-mail: hcqqiop222@163.com △ 通讯作者:周林康,男,博士,助理研究员,主要研究方向:生物学,电话:010-62797133,E-mail: zhoulinkang@mail.tsinghua.edu.cn

⁽收稿日期:2017-06-12 接受日期:2017-06-30)

超分辨技术需要用到特殊的光转换荧光蛋白 mMaple3 和 mEos3.2,这两类光转换荧光蛋白拥有闪烁特性^[13],可以通过多 次的闪烁 - 熄灭实现定位 ^[14]。我们拟构建 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 的融合蛋白,通过 mMaple3 和 mEos3.2 蛋白的 定位来显示 Fsp27 的蛋白定位。利用这两种荧光蛋白的光学特 性,我们可以观察到更精确的 Fsp27 的亚细胞定位^[15],为 Fsp27 的研究乃至其他重要蛋白的研究提供一种新型的技术方案^[13]。本研究主要关注 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 融合蛋白 的功能,观察其融合蛋白是否保持 Fsp27 本身促进脂滴融合的 功能?包括融合蛋白在细胞内的定位,是否能像 Fsp27 蛋白一样促进脂滴的增大?为进一步通过荧光漂白恢复术(fluorescence recovery after photo-bleaching, FRAP) 证明这种新型的荧光蛋白融合 Fsp27 能否介导脂滴与脂滴之间的脂滴交换。

1 材料与方法

1.1 材料

HEK293T 细胞系和 3T3-L1 前脂肪细胞系购自美国的 ATCC 公司。DMEM 细胞培养基,转染试剂 Lipofectamine2000, 带有荧光标记的二抗购自 Invitrogen 公司。识别 Fsp27 的一抗 由本实验室自制。Bodipy C12 购自 Molecular Probes 公司。无脂 肪酸的 BSA 购自 Sigma 公司。油酸(Oleic Acid)购自 Sigma 公 司。BodipyC12 购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 pFsp27-EGFP-N1 质粒由本实验前期构建, 是表达 Fsp27 全长的质粒。将 pFsp27-EGFP-N1 中的 EGFP 对 应序列用合适的限制性内切酶切去,将 mMaple3 和 mEos3.2 表达载体中编码这两个荧光蛋白的序列并分别克隆到切好的 载体中,得到 pFsp27-mMaple3-N1 和 pFsp27-mEos3.2-N1。构建 好的质粒已通过测序来保证序列的准确性。pmMaple3-N1 和 pmEos3.2-N1 质粒来自于北京大学生物动态光学成像中心孙 育杰实验室。

1.2.2 细胞培养和转染 HEK293T 细胞在含有 10%四季青 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,5% CO₂,湿度 80%; 3T3-L1 细胞在含有 10% Gibco 胎牛血清的 DMEM 中培养, 5% CO₂,湿度 80%。HEK293T 和 3T3-L1 细胞均采用转染试剂 Lipofectamine2000 转染,转染操作按照说明书。当细胞密度达到 70%-80%时进行转染,分别在两个干净的 EP 管中加入 100 μL 的 opti-MEM,其中一个加入适量的质粒,另一个加入 2 倍质粒 体积的 Lipofectamine2000,轻轻摇勾后,在室温静置 5 分钟,然 后将两个 EP 管中的液体放在一起,并且轻轻混匀,在室温静置 15 分钟。待转染细胞则更换为 opti-MEM 培养基,将混合后的 溶液逐滴均匀地加入细胞中,4 个小时后,将培养基换位普通 的培养基,20 小时后收取细胞。

1.2.3 免疫荧光固定 用 PBS 缓冲液将需要固定的细胞清洗 2~3 遍,加入 4%多聚甲醛室温下固定 30 分钟,然后用 PBS 缓 冲液清洗 3 遍。细胞预先在含有玻璃底的培养皿中或者载玻片 上培养。

1.2.4 Fluorescence Recovery After Photo-bleaching (FRAP)实验 在带有玻璃底的培养皿中培养 3T3-L1 细胞,并转染 1 μg 的 pFsp27-EGFP-N1 质粒,转染方法同之前的转染。同时在换液 时,需要在新鲜的 DMEM 中加入适量的油酸,终浓度是 100 µM 和适量的 Bodipy C12,最终浓度是 1 µg/mL。在拍摄前,提前 1 h 将多余的 Bodipy C12 洗去,并换上新鲜的培养基,待细胞适应后方可进行拍摄。选择其中的较小的脂滴进行荧光淬灭,用高强度的激光照射小脂滴的某个区域,同时记录下脂滴中荧光强度的变化,拍摄周期为 50 s,每组细胞进行 3 次循环。

1.3 统计学分析

两组数据的差异显着性将利用双尾 Student's T test 进行比较,以 P 值小于 0.05 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 构建 pFsp27-mMaple3-N1 和 pFsp27-mEos3.2-N1 质粒以及 酶切鉴定

将 pFsp27-EGFP-N1 中的 EGFP 对应序列用合适的限制性 内切酶切去,将 mMaple3 和 mEos3.2 表达载体中编码这两个 荧光蛋白的序列分别克隆到切好的载体中,插入的酶切位点分 别是 BamH1 和 Not1。mMaple3 的编码序列大小为 711 bp, mEos3.2 的编码序列大小为 630 bp。pFsp27-mMaple3-N1 和 pFsp27-mEos3.2-N1 均用双酶切来鉴定,所选的限制性内切酶 为 BamH 1 和 Not1。BamH1 位于 mMaple3 和 mEos3.2 编码序 列的 5' 端,而 Not1 则位于 3' 端。酶切的结果显示,这两个质粒 被酶切后分别有一条约 800 和 600 的条带,说明 mMaple3 和 mEos3.2 确实已经克隆到表达载体中,如图 1 所示。





2.2 重组质粒在 HEK293T 中的表达情况

将构建好的质粒转染入 HEK293T 细胞中,通过检测 Fsp27 蛋白的表达来检测这两个质粒是否能够表达。pFsp27-mMaple3-N1,pFsp27-mEos3.2-N1 和 pFsp27-EGFP-N1 都 转入1μg。对照组(NC)不转染质粒。对应的 western blot 的结果 如图 2 所示,利用 Fsp27 的抗体能够在转染 Fsp27-mMaple3, Fsp27-mEOS3.2 和 Fsp27-GFP 的组检测到条带,说明在这三组 都有融合蛋白的表达,其分子量在 55KD 处。

2.3 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 可以促进脂滴增大并且 定位在脂滴上

本实验室之前的研究显示 Fsp27 可以定位在脂滴上,并且 在脂滴 - 脂滴的结合部上富集,促进脂滴的融合和大脂滴的形



图 2 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 在 293T 细胞中的表达量 Fig.2 Expression levels of Fsp27-mMaple3 and Fsp27-mEos3.2 in 293T cells, Actin was used as a loading control

成。Fsp27-EGFP融合蛋白也已经被证明能够促进脂滴的融合, 说明GFP并不会影响Fsp27促进脂滴融合的功能。在3T3-L1 细胞中转入1µgpFsp27-EGFP-N1、pFsp27-mMaple3-N1和pFsp27-mEos3.2-N1,另一组不转入质粒。如图3所示,在不转入 重组质粒的情况下,细胞中的脂滴较多,大部分都是一些较小 的脂滴。在分别转入pFsp27-EGFP-N1、pFsp27-mMaple3-N1和 pFsp27-mEos3.2-N1的三组细胞中,细胞内脂滴数量变少,脂滴 大小明显变大。和之前的研究类似^{III},Fsp27-GFP融合蛋白能够 定位于脂滴上,并且在脂滴-脂滴接触点富集。我们发现 Fsp27-mMaple3和Fsp27-mEos3.2融合蛋白也能够定位于脂滴 上,在脂滴-脂滴接触点也有富集。这说明Fsp27-mMaple3和 Fsp27-mEos3.2 融合蛋白具有促进脂滴融合的功能,mMaple3 和 mEos3.2 蛋白并不会影响Fsp27 蛋白脂滴融合的功能。





C Fsp27-EGFP Fsp27-mMaple3 Fsp27-mEos3.2的脂滴定位 图 3 Fsp27-EGFP,Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2的脂滴定位 Fig.3 The localizations of Fsp27-EGFP, Fsp27-mMaple3 and Fsp27-mEos3.2in 3T3L1 preadipocytes.

2.4 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 可以促进脂滴间脂的交换

在脂滴与脂滴结合部位,Fsp27 会聚集形成脂滴接触位点 (Lipid droplet contact site, LDCS)。小脂滴中的中性脂通过接触 位点流向大脂滴中,最终形成一个大脂滴。融合是一个非常缓 慢的过程,整个过程需要2小时或是更长的时间完成。 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 在上一章已经被证明能够在 细胞中形成大脂滴。荧光漂白恢复术实验通常用来证明膜的流 动性和蛋白的扩散速率。这里我们运用荧光漂白恢复术来验证 两个脂滴之间的中性脂是可以相互流通的。本实验室之前的工 作已经验证了 Fsp27 在形成脂滴接触位点时,可以使得两个脂 滴保持连通 ^[7]。在本实验中,在转入 Fsp27-mMaple 质粒后, Fsp27-mMaple3 融合蛋白定位在脂滴上,在荧光漂白相邻脂滴 中较小的一个时,发现小脂滴明显的变暗了,然后每隔一段时 间,小脂滴的亮度慢慢升高,而大脂滴的亮度则逐渐下降(如图 4),说明两个脂滴之间是连通的,脂滴中的中性脂可以进行交 换。该实验证明 Fsp27-mMaple3 融合蛋白也具有促进中性脂流 通的功能。

2.5 Fsp27-mMaple3 介导脂交换的动力学分析

Fsp27-mMaple3 可以介导脂滴间脂的交换,因此若测量了 中性脂的交换速率我们可以进一步估算出交换时的孔径大小, 为此我们选取了 44 对带有 Fsp27-EGFP 的脂滴和 37 对带有 Fsp27-mMaple3 的脂滴(图 5)。用 ImageJ 测量每一个脂滴中红 色的亮度,代表了中性脂的含量,并测量每一个脂滴的直径得 到脂滴的体积。从而得到脂交换的速率和孔径的大小。之前的 实验已经证明了外源的 Fsp27-EGFP 有着内源 Fsp27 同样的功 能。实验结果显示,转染了 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-EGFP 细 胞中,脂交换的速率和孔洞的大小并没有发生太大的变化(P > 0.05)(如图 5),进一步证明了 Fsp27-mMaple3 也保持了 Fsp27 原有的功能。

3 讨论

Fsp27 作为一个新的脂滴结合蛋白,近十年来受到了越来越多的关注^[1618]。2008 年,同时有两篇文章报道了 Fsp27 缺失小鼠的表型。Fsp27 缺失小鼠白色组织脂肪明显减少,胰岛素敏感





性增强,脂肪细胞内线粒体活性增高,小鼠有较高的代谢速率 [19.20]。白色脂肪组织是储存脂类的重要器官,而白色脂肪细胞的 一个典型特征是细胞内有一个体积巨大的脂滴。脂滴几乎占据 了白色脂肪细胞90%以上的体积,细胞核和少量的内质网被挤 到细胞边缘。而 Fsp27 缺失后, 白色脂肪细胞内脂滴的数目明 显增多,可达 200 多个。虽然 Perilipin, seipin, lipin 基因敲除的 小鼠也表现出脂肪组织变少[21-23],脂肪细胞也变小,但是其都没 有表现出细胞内脂滴数目的增多的现象。后续的细胞生物学研 究显示 Fsp27 定位于脂滴表面,其在脂滴的融合中起到重要作 用。Fsp27能够富集在脂滴-脂滴接触点,推测其可能形成了一 个中性脂流通的通道,同时也鉴定出 Perilipin、Rab8a 等蛋白质 和 Fsp27 相互作用[24],这些蛋白质形成蛋白复合物来调控脂滴 的融合。Fsp27 究竟是如何形成孔径的,包括孔径的大小都不得 而知。解析 Fsp27 的结构将可以回答这些问题,但是 Fsp27 是 膜蛋白,比较难形成均一的晶体。因此,我们拟利用超高分辨率 技术来观察 Fsp27 形成的孔径的大小以及其在融合过程中的 动态变化。

标签蛋白如 GFP、GST、His、Flag、HA 等的利用在生物学的研究中起到了重要作用,但不可忽视的是标签蛋白的加入可能会影响蛋白质的功能。Fsp27 蛋白有两个结构域,N 端结构域(1-135aa)可以形成二聚体,C 端(136-219)结构域是跨膜结构域^[25]。我们之前的研究显示将标签蛋白如 Flag、HA 放到 Fsp27 蛋白的 N 端所形成的融合蛋白丧失了 Fsp27 促进脂滴融合的功能。而将标签蛋白如 HA、GFP 放到 Fsp27 促进脂滴融合的功能。以 Fsp27-EGFP 融合蛋白作为参照,我们构建重组质粒 pFsp27-mMaple3-N1 和 pF-sp27-mEos3.2-N1,然后研究 mMaple3 和 mEos3.2 是否会对

Fsp27 促进脂滴融合的功能产生影响,通过实验证明新的荧光 探针同样能够发挥原来 Fsp27 的功能。当转入重组质粒并且表 达的时候,细胞中的脂滴会明显增大,而且数量会减少,与 Fsp27-EGFP 进行比较可以看出他们在促进脂滴增大的功能上 并没有太大的变化。在重组蛋白的亚细胞定位上,将他们与 Fsp27-EGFP 也做了进一步的比较,结果是 Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 也都会聚集在脂滴与脂滴的结合部位,并且能 够很好的定位在脂滴上,尤其是在脂滴结合部位,进而促进脂 滴的融合,形成大脂滴,说明 Fsp27 促进脂滴融合的功能并未 受到中两个荧光蛋白的影响。

除了从直观的角度看到脂滴增大的现象,我们进一步从动 力学的角度比较了 Fsp27-EGFG 和 Fsp27-mMaple3 所形成的 孔径对中性脂交换速率的影响,结果显示两者并没有明显的差 异。既往研究已证明 Fsp27 会在脂滴与脂滴结合部位富集,如 果要进行融合,还要将两个脂滴连通起来,我们通过荧光漂白 恢复术实验来验证脂滴是连通的,其中的中性脂可以相互交 换。同样,我们用 Fsp27-EGFG 作为参照,Fsp27-mMaple3 和 Fsp27-mEos3.2 转染的细胞中都可以观察到中性脂相互交换的 现象,说明他们仍然保持了原有 Fsp27 的功能,改变了膜的结 构,使得接触的脂滴连通起来,进而进行中性脂的交换,并促进 脂滴的融合。另一方面,Fsp27 的 CIDE-N 端结构域被证明会与 Perilipin1(Plin1)相互作用,而 Plin1 作为激活因子能加强了原 本 Fsp27 的功能^[620],我们未来也将进一步探究 Fsp27-mMaple3 是否仍保持这一特性,检查是否 Fsp27-mMaple3 并没有影响 CIDE-N 结构域的发挥。

mMaple3 和 mEos3.2 这两种新的荧光探针对 Fsp27 的脂 滴融合功能已充分研究,我们可以利用这两种荧光蛋白的光学 性质来完成一些传统绿色荧光蛋白 GFP 不能完成的空间超分 辨定位实验^[27,28],为我们进一步了解 Fsp27 乃至其他重要的蛋 白提供了一种可靠的方法^[29]。此外,我们不仅要关注 Fsp27 所 起的作用,例如 Plin1 等其他脂滴相关蛋白也是参与整个脂滴 融合过程并确保融合正常运行。已有的研究表明,Fsp27 可以介 导脂滴间形成中性脂转移的孔径,而 Plin1 的存在可以大大的 增加中性脂转移的效率^[30],是否 Plin1 是直接影响孔径进一步 增大的原因或同时影响脂滴的表面张力将是未来研究的重点 之一。同样,研究 Plin1 在脂滴上的分布与 Fsp27 结合的动态行 为,这两种新型的荧光探针 mMaple3 和 mEos3.2 也可以在将 来用来解决这方面的问题。

参考文献(References)

- Crino M, Sacks G, Vandevijvere S, et al. The Influence on Population Weight Gain and Obesity of the Macronutrient Composition and Energy Density of the Food Supply [J]. Current obesity reports, 2015, 4: 1-10
- [2] Allison KR, Irving HM, Adlaf EM, et al. Ten-year trends in overweight/obesity among Ontario middle and high school students and their use in establishing baseline measures for government reduction targets [J]. Canadian journal of public health, 2016, 106: e514-519
- [3] McVicker BL, Rasineni K, Tuma DJ, et al. Lipid droplet accumulation and impaired fat efflux in polarized hepatic cells: consequences of ethanol metabolism [J]. International journal of hepatology, 2012, 2012: 978136
- [4] Xu X, Park JG, So JS, et al. Transcriptional activation of Fsp27 by the liver-enriched transcription factor CREBH promotes lipid droplet growth and hepatic steatosis[J]. Hepatology, 2015, 61: 857-869
- [5] Langhi C, Baldan A. CIDEC/FSP27 is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and plays a critical role in fasting-and diet-induced hepatosteatosis [J]. Hepatology, 2015, 61: 1227-1238
- [6] Park HH. Structural insight into CIDE domains: the Janus face of CIDEs [J]. Apoptosis : an international journal on programmed cell death, 2015, 20: 240-249
- [7] Gong J, Sun Z, Wu L, et al. Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites [J]. The Journal of cell biology, 2011, 195: 953-963
- [8] Pol A, Gross SP, Parton RG. Review: biogenesis of the multifunctional lipid droplet: lipids, proteins, and sites [J]. The Journal of cell biology, 2014, 204: 635-646
- [9] Huang B, Babcock H, Zhuang X. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells[J]. Cell, 2010, 143: 1047-1058
- [10] Jungst C, Klein M, Zumbusch, A. Long-term live cell microscopy studies of lipid droplet fusion dynamics in adipocytes [J]. Journal of lipid research, 2013, 54: 3419-3429
- [11] Sun Z, Gong J, Wu L, et al. Imaging lipid droplet fusion and growth[J]. Methods in cell biology, 2013, 116: 253-268
- [12] Gu M, Kang H, Li X. Breaking the diffraction-limited resolution barrier in fiber-optical two-photon fluorescence endoscopy by an azimuthally-polarized beam[J]. Scientific reports, 2014, 4: 3627
- [13] Kuang C, Li S, Liu W, et al. Breaking the diffraction barrier using fluorescence emission difference microscopy [J]. Scientific reports,

2013, 3: 1441

- [14] Sun Q, Sun D, Song L, et al. Highly Selective Fluorescent Turn-On Probe for Protein Thiols in Biotin Receptor-Positive Cancer Cells[J]. Analytical chemistry, 2016, 88: 3400-3405
- [15] Dave K, Gelman H, Thu CT, et al. The Effect of Fluorescent Protein Tags on Phosphoglycerate Kinase Stability Is Nonadditive [J]. The journal of physical chemistry. B, 2016, 120: 2878-2885
- [16] Xu L, Zhou L, Li P. CIDE proteins and lipid metabolism [J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2012, 32: 1094-1098
- [17] Xu W, Wu L, Yu M, et al. Differential Roles of Cell Death-inducing DNA Fragmentation Factor-alpha-like Effector (CIDE) Proteins in Promoting Lipid Droplet Fusion and Growth in Subpopulations of Hepatocytes[J]. The Journal of biological chemistry, 2016, 291: 4282-4293
- [18] Qian, H., Chen, Y., Nian, Z. et al. HDAC6-mediated acetylation of lipid droplet-binding protein CIDEC regulates fat-induced lipid storage[J]. The Journal of clinical investigation, 2017, 127: 1353-1369
- [19] Toh SY, 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[J]. PloS one, 2008, 3: e2890
- [20] Nishino N, Tamori Y, Tateya S, et al. FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets [J].The Journal of clinical investigation, 2008, 118: 2808-2821
- [21] Cui X, Wang Y, Tang Y, et al. Seipin ablation in mice results in severe generalized lipodystrophy [J]. Human molecular genetics, 2011, 20: 3022-3030
- [22] Reue K, Dwyer JR. Lipin proteins and metabolic homeostasis [J]. Journal of lipid research, 2009, 50(Suppl): S109-114
- [23] Krahmer N, Farese RV, Jr Walther TC. Balancing the fat: lipid droplets and human disease [J]. EMBO molecular medicine, 2013, 5: 973-983
- [24] Wu L, Xu D, Zhou L, et al. Rab8a-AS160-MSS4 regulatory circuit controls lipid droplet fusion and growth[J]. Developmental cell, 2014, 30: 378-393
- [25] Wu C, Zhang Y, Sun Z, et al. Molecular evolution of Cide family proteins: novel domain formation in early vertebrates and the subsequent divergence[J]. BMC evolutionary biology, 2008, 8: 159
- [26] Min J, Zhang W, Gu Y, et al. CIDE-3 interacts with lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor, and overexpression increases apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. Medical oncology, 2011, 28(Suppl 1): S219-227
- [27] Hirata T, Terai, T., Yamamura, H. et al. Protein-Coupled Fluorescent Probe To Visualize Potassium Ion Transition on Cellular Membranes [J]. Analytical chemistry, 2016, 88: 2693-2700
- [28] Charest-Morin X, Marceau F. Biotechnological Fluorescent Ligands of the Bradykinin B1 Receptor: Protein Ligands for a Peptide Receptor[J]. PloS one, 2016, 11: e0148246
- [29] Albers JJ, Vuletic S, Cheung MC. Role of plasma phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism[J]. Biochimica et biophysica acta, 2012, 1821: 345-357
- [30] Sun Z, Gong J, Wu H, et al. Perilipin1 promotes unilocular lipid droplet formation through the activation of Fsp27 in adipocytes [J]. Nature communications, 2013, 4: 1594