

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.05.005

三卡因浓度对斑马鱼心脏手术模型麻醉的影响 *

周 桑¹ 吴 豫² 宋婧文¹ 沈 茜³ 赵仙先¹ 秦永文^{1Δ}

(1 第二军医大学长海医院心血管内科 上海 200433; 2 中国人民解放军第 94 医院 江西 南昌 330002;

3 第二军医大学长海医院实验诊断科 上海 200433)

摘要 目的:探讨斑马鱼麻醉过程中三卡因浓度对其心脏手术后生存率的影响。**方法:**以经典实验方法中的三卡因(MS-222)浓度 150 mg/L 为对照,分别用浓度为 20 mg/L、40 mg/L、60 mg/L、80 mg/L、100 mg/L、150 mg/L、200 mg/L 的 MS-222 麻醉液麻醉,观察斑马鱼术后行为及术后生存率的差异。**结果:**随着 MS-222 浓度的提高,斑马鱼表现为入麻时间的逐渐减少、苏醒时间的逐渐增加。MS-222 麻醉斑马鱼成鱼的有效浓度为 40~160 mg/L,在此浓度范围内,鱼体能够在 3 min 内达到可施行手术操作的麻醉状态(II 或 III 期),10 min 内可苏醒恢复;随着浓度的增大,呼吸频率的下降速率增大;MS-222 浓度为 40 mg/L 时斑马鱼的术后存活率最高(98.3%)。**结论:**当 MS-222 浓度为 40 mg/L 时,斑马鱼入麻及苏醒较为平稳,术后斑马鱼复苏时间较短,且保持了较高的术后生存率。在实验操作或者生产应用时推荐 MS-222 麻醉药液最佳麻醉浓度为 40 mg/L,所对应的麻醉时间约为 15 min 左右。

关键词:斑马鱼;心脏;三卡因;麻醉;MS-222

中图分类号:R-33;Q959.4;R614 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)05-822-04

Effects of Three-cardin Concentration on Anesthesia in Zebrafish Cardiac Surgery*

ZHOU Sang¹, WU Yu², SONG Jing-wen¹, SHEN Qian¹, ZHAO Xian-xian¹, QIN Yong-Wen^{1Δ}

(1 Department of Cardiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China;

2 No.94 Hospital of PLA, Nanchang, Jiangxi, 330002, China;

3 Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of trisate concentration on the survival rate of zebrafish after partial cardiac resection. **Methods:** The concentration of tricaine (MS-222) anesthetic liquid in the classical experimental method is 150 mg/L. Zebrafish were treated with MS-222 at different concentrations including 20 mg/L, 40 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L and 200 mg/L to observe the different postoperative behavior and postoperative survival rate. **Results:** It was found that at a higher concentration zebrafish exhibit a remarkably long recovery time and a reduction of anesthesia time. The effective MS-222 concentration of zebrafish adult fish is 40-160 mg/L. Zebrafish can reach the anesthetic status (II or III) suitable for the operation within 3min, and recover within 10min. With the increase of the concentration, the decrease rate of the respiratory rate increases and the survival rate of zebrafish is the highest (98.3%) at the concentration of 40 mg/L. **Conclusion:** The results showed that when the concentration of MS-222 was 40 mg/L, zebrafish recovered faster with higher recovery ratio. In the experimental operation or production applications, MS-222 anesthetic concentration of 40 mg/L is recommended and the corresponding anesthesia time is about 15 minutes.

Key words: Zebrafish; Heart; Traine; Anesthesia; MS-222

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q959.4; R614 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)05-822-04

前言

斑马鱼是一种重要的模式生物,在发育生物学、肿瘤学、药理学等诸多方面的研究中发挥了重要作用,具有易于繁殖和观察、生存期短等特有的优势^[1]。斑马鱼的多种组织器官具有良好的再生能力,使其成为研究视网膜、心脏、鱼鳍等器官再生的重

要模型^[2-4]。由于斑马鱼的心脏在部分切除术后可于 2 周内实现完全再生,恢复原有功能,使斑马鱼成为心脏再生领域最为重要的模式动物^[5-7]。在该模型中,研究者常以 MS-222 进行术前麻醉^[8]。MS-222 作为美国食品药品监督管理局(FDA)批准的惟一可用于食用鱼类的麻醉剂^[9],使用广泛。在经典的实验方法中,三卡因的麻醉浓度为 150 mg/L-160 mg/L,斑马鱼的术后生存率

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81470407)

作者简介:周桑(1993-),硕士研究生,主要研究方向:心脏再生,E-mail: sangandyin@sina.com

Δ 通讯作者:秦永文(1952-),博士生导师,教授,主要研究方向:冠心病的基础与临床,

E-mail: qinyongwenaxin@sina.com,电话:18521055441

(收稿日期:2017-10-07 接受日期:2017-10-30)

较低(60%-70%)^[10,11]。本文以经典实验方法中的麻醉浓度为对照,探究斑马鱼心脏部分切除实验中不同浓度 MS-222 的麻醉效果及其术后影响,探讨如何在满足手术要求的前提下尽可能提高斑马鱼手术生存率^[12],在保证麻醉效果的前提下选择更为麻醉浓度和麻醉时间,以期 MS-222 更好地应用于斑马鱼心脏手术麻醉及其他鱼类手术麻醉提供参考^[13]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

随机捞取健康成年斑马鱼(年龄大于 3 个月,雌雄均可,实验中所选取斑马鱼为 7 月龄斑马鱼)420 尾。分成 7 组,每组 60 尾,分组情况见表 1。三卡因(Sigma, Cat A5040, 3-amino benzoic acid ethyl ester):用于麻醉成鱼。鱼水:用于配制麻醉液以及斑马鱼术后苏醒。分别用鱼水配制浓度为 20 mg/L、40 mg/L、60 mg/L、80 mg/L、100 mg/L、150 mg/L、200 mg/L 的 MS-222 麻醉液备用。斑马鱼固定装置:在吸水海绵的上表面剪开一条较深的长缝,使其深度和长度恰好固定斑马鱼。维纳斯剪刀(弯型,中国苏州):在手术中切除心脏。维纳斯剪刀(直型,中国苏州):在手术中剪开斑马鱼的腹壁。显微镊(直型,中国上海):手术中剖开斑马鱼的围心腔,以及心脏切除时夹持心尖处的心肌组织。Leica M80 立体显微镜:用于放大手术域,便于操作。其他:无菌吸管、5 mm 培养皿、鱼缸。

1.2 实验流程

1.2.1 术前准备 (1)取斑马鱼培育系统的恒温水置于准备好的鱼缸中,用于苏醒术后的斑马鱼。(2)用鱼水充分浸润海绵块,海绵块切口朝上置于显微镜下,调整焦距。

1.2.2 手术操作 在培养皿中加入 10 mL MS-222 工作液麻醉斑马鱼,将鱼以仰卧位将其腹部朝上,固定于海绵块,在显微镜下剪开斑马鱼腹部心脏搏动最明显部位的皮肤,大致位于鳃弓以下。暴露心脏,用维纳斯剪沿心尖剪去 20%心室^[14]。鱼的离水操作时间约为 1 min 左右。

1.2.3 术后处理 将手术后的鱼放入鱼缸中,当斑马鱼恢复鱼鳃自主张合,继而恢复自主游动时,即可将斑马鱼放回恒温培育系统中,进行后续观察和实验。

1.2.4 麻醉深度的判断 参考以往的评价标准^[15,16],提出了更为直观合理的评价方式,将麻醉行为的变化将麻醉深度分为以下四级:(I)能保持身体平衡,对外界刺激反应明显,鳃盖张合频率不降低。(II)可以保持身体平衡,但游动速度减慢,鳃盖张合频率较前降低,有声响时仅尾部轻微摆动。(III)勉强维持平衡,对外界的反应能力弱,鳃盖缓慢张合,用手去抓时不能逃避。(IV)鱼体偏斜或腹部朝上,不再持续游动,鳃盖张合微弱。

1.3 数据分析

本实验中,统计分析采用单因素方差分析(ANOVA,SPSS 软件 Version 20.0 版本), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,数据记录为平均值 $\pm$ 标准误差。

2 结果

在恒温条件下,随着 MS-222 浓度的增加,斑马鱼的入麻时间逐步缩短($P < 0.01$)。MS-222 浓度为 20 mg/L 时,斑马鱼在 1 小时内始终保持(I)级麻醉状态;当 MS-222 浓度为 40 mg/L

时,入麻时间约为 12 min,斑马鱼表现为对外界刺激反应能力降低,鳃盖张合频率降低,游动速度减慢,为(II)级麻醉状态,并且没有进入更深的麻醉状态,在 MS-222 浓度上升到 80 mg/L 时,斑马鱼平均入麻时间缩短为 5 min 左右。而当 MS-222 浓度为 100 mg/L 时,大多数斑马鱼在经过(II)级麻醉状态后迅速进入(III)级麻醉状态,无法躲避抓捕,无法维持平衡,鳃盖缓慢张合,用手去抓时无法逃避,斑马鱼最终麻醉状态为(III)级麻醉状态,平均入麻时间为 2 min 左右。当 MS-222 浓度升高至 150 mg/L 至 200 mg/L 时,斑马鱼的入麻时间大幅缩短至 10 s 至 20 s 左右并在短暂的(II)级和(III)级麻醉状态后迅速进入(IV)级麻醉状态,出现鱼体偏斜或反肚,不再持续游动,鳃盖张合微弱,此时不进行心脏切除手术并迅速将鱼放入清水中苏醒,斑马鱼仍有无法复苏、死亡出现。

随着 MS-222 浓度的梯度升高,斑马鱼的最终麻醉状态不断加深,40 mg/L 时,斑马鱼可由(I)级麻醉状态进入(II)级麻醉状态;100 mg/L 时,斑马鱼迅速进入(III)级麻醉状态,而 MS-222 浓度大于 150 mg/L 时,开始出现不做手术马上放入清水复苏依旧无法苏醒的斑马鱼。而当斑马鱼进入(II)级麻醉状态或更深的麻醉状态时,均可进行手术操作,但术后复苏时间逐步延长(排除术后死亡斑马鱼)。

MS-222 浓度在 40-80 mg/L 时,斑马鱼的最终麻醉状态均为(II)级麻醉状态,心脏部分切除术后的生存率随浓度上升逐步下降($P < 0.05$),当 MS-222 浓度为 40 mg/L 时,斑马鱼的术后生存率高达 98%,仅有 1 条斑马鱼因失血过多死亡。而 MS-222 浓度上升至 200 mg/L 时,斑马鱼的术后生存率仅为 63%。从本实验结果来看,当 MS-222 浓度为 40 mg/L 时,斑马鱼入麻及苏醒较为平稳,斑马鱼的入麻反应较为明显,能进入(II)级麻醉状态,并且维持(II)级麻醉状态,不进入更深的麻醉状态,能在 16 分钟左右进入(II)级麻醉状态,术后斑马鱼复苏时间较短。因此,在试验操作或者生产应用时 MS-222 麻醉药液最佳麻醉浓度为 40 mg/L,所对应的麻醉时间约为 15 min。

3 讨论

斑马鱼心脏部分切除术对斑马鱼的伤害较大,因心尖部切除 20%导致心室缺口,术中斑马鱼出现中到大量的失血。而斑马鱼除愈合能力较强外,有两套吸收氧气的系统,心脏部分切除后可通过斑马鱼皮肤直接吸收水中的氧气,故在术后不予缝合或包扎斑马鱼亦可存活,等待腹部切口愈合及心脏再生后,斑马鱼仍正常活动,则造模过程结束,造模成功。一般来说,腹部切口在术后 3 天即可形成疤痕组织,心脏在 30 天内即可完全再生,斑马鱼在术后第一天存活则一般造模成功。但经典实验过程中鱼的术后生存率过低,导致最终造模成功的斑马鱼数量较少,影响了实验进程,造成了资源和生命的浪费,同时在生存率较低时,实验者往往为保证生存率导致心脏切除面积过小,影响实验结果的准确性。我们经过实验发现,(II)级麻醉状态在已经可以满足手术时的操作要求的前提下,将鱼转入清水中能够在较短时间内复苏,并且复苏率高。经典麻醉浓度下的麻醉深度已经可以保证鱼体在手术操作过程中保持一种完全静止状态,却不利于动物术后的恢复,并升高了死亡率,而相对较浅的麻醉状态满足了大多数动物实验操作的要求,过分追求

完全麻醉带来的麻醉效果适得其反。因此,在鱼手术操作时,推荐采用(II)级麻醉状态作为选择麻醉深度的参考。在以往对的实验流程中通常推荐 150 mg/L 或 160 mg/L 作为斑马鱼手术前麻醉的标准浓度,在该浓度下斑马鱼可顺利经(II)级麻醉进入(III)级麻醉状态。而本实验中采用了一种相对较浅的麻醉状态(保持在(II)级麻醉而不进入(III)级麻醉状态),达到了较好的手术效果并且提高了术后生存率。该现象提示我们在保证手术施行顺利的前提下尽可能降低实验动物的麻醉深度,可以获得较好的术后恢复。在人的手术麻醉中,全麻手术的术后恢复

及术后生存率亦低于局麻手术,提示该原则同样适用于人的麻醉。在完全静止的状态下从事对动物伤害较大的手术,这种较深的麻醉状态可能降低了动物体自身的保护机制,从而降低了术后生存率。MS-222 麻醉药最佳浓度为 40 mg/L。当麻醉剂浓度过高时($MS-222 > 150 \text{ mg/L}$),虽然入麻时间很短,斑马鱼在 10~20 s 左右很快进入深度麻醉状态,鳃盖张合频率很低,不能逃避抓捕动作,但是进入深度麻醉状态后的恢复时间较长,且存活率较低。

表 1 三卡因不同浓度对于斑马鱼的麻醉效果分析

Table 1 Effects of different three-cardin concentration on anesthesia in zebrafish cardiac surgery

Three-cardin concentration(mg/L)	The time of anesthesia (s)	Anesthesia depth	The time of waking up (s)	Amount of surviving (n)	Survival rate(%)
20	-	(I)	-	-	-
40	764± 78.9	(II)	8± 3.5	59	98.33
60	469± 54.2	(II)	64± 12.9	55	91.67
80	263± 36.1	(II)	356± 37.4	49	81.67
100	109± 18.3	(III)	584± 71.2	48	80.00
150	18± 3.5	(IV)	605± 75.3	41	68.33
200	10± 2.7	(IV)	847± 98.7	38	63.33

在斑马鱼实验中,MS-222 是最常用的试验用麻醉剂。MS-222 主要通过鱼的体表和鱼鳃吸收,起效快,在麻醉时间短时恢复迅速。MS-222 主要抑制鱼的神经中枢反射^[17],鱼入麻后表现为呼吸频率的降低和动作的迟缓等,同时 MS-222 也可以通过抑制离子通道降低斑马鱼的呼吸功能和心血管功能,引起心率的降低和呼吸频率的减慢,在长时程麻醉时死亡率较高。28℃是斑马鱼最适生长温度,本实验中采用该温度,在此温度下,鱼体抗逆性最强,术后的成活率也最高,而低温可引起斑马鱼出现类似于麻醉状态的行动力下降及呼吸心率减慢,MS-222 配合低温麻醉将引起斑马鱼麻醉程度的加深及苏醒率的下降。MS-222 进入鱼体后主要积累于脾肝等脏器中,当 MS-222 浓度过高($> 250 \text{ mg/L}$)或者麻醉时间过长时,在斑马鱼体内积聚过多 MS-222 无法及时排出时,MS-222 便可引起鱼的死亡^[18]。手术中对于斑马鱼的麻醉在考虑更大程度地限制鱼的活动及意识利于手术操作之外,还要考虑手术成功率及术后生存率^[19]。既往有研究者为了改善麻醉效果及术后生存率,对其他麻醉剂进行了和 MS-222 的对比实验,其中异氟烷和 MS-222 联合麻醉可延长斑马鱼的麻醉耐受时间,并加快麻醉后复苏^[9];利多卡因单独麻醉可使而与标准剂量的 MS222 相比,异丙酚和利多卡因联合麻醉可更快地诱导斑马鱼失去平衡以及光感和疼痛反应的丧失,但麻醉后复苏时间较慢,麻醉后死亡率较高^[8]。既往有研究报道,MS-222 对出生 9 天的斑马鱼幼鱼的 1 小时半数致死浓度为 730 mg/L,1 小时有效麻醉浓度为 31 mg/L,出生 3 天的斑马鱼幼鱼的 1 小时半数致死浓度为 1633 mg/L,1 小时有效麻醉浓度为 65 mg/L^[20],研究者认为斑马鱼对 MS-222 的敏感性在出生后 4-7 天突然增加,而该实验中对于有效麻醉的定义为 1 小时时间中使鱼达到中级麻醉,该定义对于鱼类手术中的麻醉不是十分实用,同时该实验仅仅研究

了斑马鱼幼鱼,未涉及斑马鱼成鱼的研究。本实验中,首先根据术前麻醉时,斑马鱼成鱼的入麻行为及术后行为定义了斑马鱼的麻醉深浅分级,运用了较为直观和简捷的分辨方式,对斑马鱼不造成伤害。本实验中,发现用 40 mg/L 的 MS-222 麻醉斑马鱼,斑马鱼的术后生存率最高,在该浓度下,斑马鱼可实现平稳的入麻及复苏,而且在手术过程保持了了一定程度的平稳状态,可以顺利进行过心脏切除手术,在该损伤程度较高的手术后,实现了 90%以上的较高生存率。本次实验通过 MS-222 对斑马鱼麻醉浓度及致死浓度的试验,发现斑马鱼在(II)度麻醉至(III)度麻醉的过渡中,会发生无法维持身体平衡,失去闪避反射,甚至出现鱼体倒置腹部朝上的情况,而鱼进入(IV)级麻醉后,鱼体彻底失去平衡,活动微弱,沉入鱼缸底部,鱼停止鳃动或仅有轻微鳃动,斑马鱼鳃动停止后再进行手术则术后斑马鱼死亡率很高,此时尽快将斑马鱼换入清水中后,斑马鱼体内积聚的 MS-222 逐渐排出,斑马鱼尚可存活。斑马鱼进入(IV)级麻醉后,即便尽量缩短麻醉时间、缩短手术操作时间,斑马鱼的术后苏醒时间较长,且有 30%以上的鱼死亡。

参考文献(References)

- [1] Fako VE, Furgeson DY. Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2009, 61(6): 478-486
- [2] Mokalled MH, Patra C, Dickson AL, et al. Injury-induced ctgfa directs glial bridging and spinal cord regeneration in zebrafish [J]. Science, 2016, 354(6312): 630-634
- [3] Saera-Vila A, Kish PE, Kahana A. Fgf regulates dedifferentiation during skeletal muscle regeneration in adult zebrafish [J]. Cell Signal, 2016, 28(9): 1196-1204
- [4] Sanchez M, Ceci ML, Gutierrez D, et al. Mechanosensory organ regeneration in zebrafish depends on a population of multipotent progenitor

- cells kept latent by Schwann cells[J]. *BMC Biol*, 2016, 14: 27
- [5] Matrone G, Tucker CS, Denvir MA. Cardiomyocyte proliferation in zebrafish and mammals: lessons for human disease [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(8): 1367-1378
- [6] Wang LW, Huttner IG, Santiago CF, et al. Standardized echocardiographic assessment of cardiac function in normal adult zebrafish and heart disease models[J]. *Dis Model Mech*, 2017, 10(1): 63-76
- [7] Fang Y, Gupta V, Karra R, et al. Translational profiling of cardiomyocytes identifies an early Jak1/Stat3 injury response required for zebrafish heart regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(33): 13416-13421
- [8] Valentim AM, Felix LM, Carvalho L, et al. A New Anaesthetic Protocol for Adult Zebrafish (*Danio rerio*): Propofol Combined with Lidocaine [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147747
- [9] Huang WC, Hsieh YS, Chen IH, et al. Combined use of MS-222 (tricaine) and isoflurane extends anesthesia time and minimizes cardiac rhythm side effects in adult zebrafish [J]. *Zebrafish*, 2010, 7(3): 297-304
- [10] Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, et al. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by *gata4* (+) cardiomyocytes [J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 601-605
- [11] Jopling C, Sleep E, Raya M, et al. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation[J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 606-609
- [12] Lidster K, Readman GD, Prescott MJ, et al. International survey on the use and welfare of zebrafish *Danio rerio* in research [J]. *J Fish Biol*, 2017, 90(5): 1891-1905
- [13] Readman GD, Owen SF, Knowles TG, et al. Species specific anaesthetics for fish anaesthesia and euthanasia [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7102
- [14] Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish[J]. *Science*, 2002, 298(5601): 2188-2190
- [15] Martins T, Valentim AM, Pereira N, et al. Anaesthesia and analgesia in laboratory adult zebrafish: a question of refinement [J]. *Lab Anim*, 2016, 50(6): 476-488
- [16] Collymore C, Tolwani A, Lieggi C, et al. Efficacy and safety of 5 anesthetics in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2014, 53(2): 198-203
- [17] Ramlochanasingh C, Branoner F, Chagnaud BP, et al. Efficacy of tricaine methanesulfonate (MS-222) as an anesthetic agent for blocking sensory-motor responses in *Xenopus laevis* tadpoles [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101606
- [18] Collymore C, Banks EK, Turner PV. Lidocaine Hydrochloride Compared with MS222 for the Euthanasia of Zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2016, 55(6): 816-820
- [19] Nordgreen J, Tahamtani FM, Janczak AM, et al. Behavioural effects of the commonly used fish anaesthetic tricaine methanesulfonate (MS-222) on zebrafish (*Danio rerio*) and its relevance for the acetic acid pain test[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e92116
- [20] Rombough PJ. Ontogenetic changes in the toxicity and efficacy of the anaesthetic MS222 (tricaine methanesulfonate) in zebrafish (*Danio rerio*) larvae [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2007, 148(2): 463-469

(上接第 851 页)

- [16] Bejarano E, Cuervo A M. Chaperone-Mediated Autophagy [J]. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2010, 7(1): 29-39
- [17] Rowland T J, Sweet M E, Mestroni L, et al. Danon disease - dysregulation of autophagy in a multisystem disorder with cardiomyopathy [J]. *Journal of Cell Science*, 2016, 129(11): 2135-2143
- [18] Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, et al. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(18): 5747-5763
- [19] Ruivo R, Anne C, Sagne C, et al. Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(4): 636-649
- [20] Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, et al. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes[J]. *Autophagy*, 2013, 9(8): 1167-1171
- [21] Perez L, Mclellie S, Gardiner G J, et al. LAMP-2C Inhibits MHC Class II Presentation of Cytoplasmic Antigens by Disrupting Chaperone-Mediated Autophagy[J]. *J Immunol*, 2016, 196(6): 2457-2465
- [22] Leone D A, Peschel A, Brown M, et al. Surface LAMP-2 Is an Endocytic Receptor That Diverts Antigen Internalized by Human Dendritic Cells into Highly Immunogenic Exosomes [J]. *J Immunol*, 2017, 199(2): 531-546
- [23] Orenstein S J, Cuervo A M. Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(7): 719-726
- [24] Kimmel A R, Sztalryd C. The Perilipins: Major Cytosolic Lipid Droplet-Associated Proteins and Their Roles in Cellular Lipid Storage, Mobilization, and Systemic Homeostasis [J]. *Annu Rev Nutr*, 2016, 36: 471-509
- [25] Brasaemle D L. Perilipin 5: putting the brakes on lipolysis[J]. *J Lipid Res*, 2013, 54(4): 876-877
- [26] Kuramoto K, Okamura T, Yamaguchi T, et al. Perilipin 5, a lipid droplet-binding protein, protects heart from oxidative burden by sequestering fatty acid from excessive oxidation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(28): 23852-23863
- [27] Szendroedi J, Roden M. Perilipin 5: from fatty liver to hepatic lipodystrophy?[J]. *Hepatology*, 2015, 61(3): 751-753
- [28] Kimmel A R, Sztalryd C. Perilipin 5, a lipid droplet protein adapted to mitochondrial energy utilization [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2014, 25(2): 110-117