

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.20.001

· 基础研究 ·

高内涵脂滴三维影像定量分析研究细胞内的脂质储存*

张少燕 梁 燕 印叶盛 马成新 陈丰荣[△]

(复旦大学代谢与整合生物科学研究院 上海 200438)

摘要 目的:研究细胞内脂滴含量的变化对肥胖、糖尿病等代谢性疾病发生发展的影响。**方法:**建立高内涵脂滴三维成像和定量分析系统,获得脂滴三维动态表型参数,例如细胞内脂滴的总体积量、脂滴平均体积、单一细胞内脂滴平均数量等指标。选择 HeLa、AML-12、COS-7 和 3T3-L1 四种细胞系进行油酸、基因沉默、酶活性抑制剂的处理,量化处理后四种细胞内的脂滴数量与大小的表型差异。**结果:**在加入油酸情况下,细胞随油酸浓度增加而生成更多、更大的脂滴,但 AML-12 细胞只有展现增加脂滴数量的变化表型;在 HeLa 细胞中进行 19 种中性脂合成通路上关键基因的转录表达沉默,发现需要同时双敲降两种甘油三酯合成酶 DGAT1 和 DGAT2 才能显著降低细胞内脂滴总体积储存量,但在 COS-7 细胞中只需要单敲降 DGAT1 即可降低脂滴存量;进一步使用了 DGAT1/2 抑制剂处理四种细胞后,发现对抑制剂响应可区分为两类细胞分组(HeLa、AML-12 与 COS-7、3T3-L1)的脂滴存量表型差异,其原因是 DGAT1 和 DGAT2 的转录表达谱在这两类细胞分组中的不同。**结论:**建立了高内涵脂滴三维成像和定量分析系统,量化了四种细胞系的脂滴数量与大小的表型差异,揭示了细胞的脂滴脂储存方式与蛋白酶表达谱的关系。

关键词:脂滴;脂滴数量;脂滴总体积;中性脂合成通路

中图分类号:R-33;Q26;Q75;Q593 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)20-3801-08

High Content Three-dimensional Imaging and Analysis of Lipid Droplets for the Study of Lipid Storage in Cells*

ZHANG Shao-yan, LIANG Yan, YIN Ye-sheng, MA Cheng-xin, CHEN Feng-jung[△]

(Institute of Metabolism and Integrative Biology, Fudan University, Shanghai, 200438, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of lipid storage level in cellular lipid droplets (LDs) on the development of metabolic diseases such as obesity and diabetes. **Methods:** We built up a high content LD imaging and quantitative analysis system to characterize cellular LDs as three-dimensional dynamic parameters such as the total volume of cellular LDs in a cell, the number of total LDs in a cell, and the average volume of LDs. We selected four types of cells including HeLa, AML-12, COS-7, and 3T3-L1 pre-adipocytes as our cell models. Next, we characterized the various phenotypes of cellular LDs in the four types of cells including LD number and LD volume, under different treatments by oleic acids, gene knockdown using RNA interference, and inhibitors for enzymes. **Results:** After treatment of cells by using oleic acids, more LDs but not larger LDs were produced in AML-12 cells, while the other three types of cells exhibited more and larger cellular LDs as the concentration of oleic acids increased. After knocking down the transcriptional expressions of 19 critical genes in a neutral lipid synthesis pathway in HeLa cells by using RNA interference, we found that double knockdown of DGAT1 and DGAT2 decreased lipid storage in cellular LDs. However, in COS-7 cells, only DGAT1 knockdown was sufficient to reduce the lipid storage of cellular LDs. Interestingly, after treatment of cells by using DGAT1 and DGAT2 inhibitors, we further found that the four types of cells were classified into two groups, HeLa and AML-12 versus COS-7 and 3T3-L1, based on the different resultant phenotypes of LDs. We measured and confirmed that the two different treated responses of cells resulted from the different transcriptional profiles of DGAT1 and DGAT2. **Conclusions:** In this study, we built up a high content LD imaging and quantitative analysis system to characterize the number and size of cellular LDs in the four types of cell lines. We found that the various phenotypes of LDs in the four types of cells and these results uncover a relationship between the lipid storage mode of cellular LDs and the transcriptional profiles of enzymes in the neutral lipid synthesis pathway.

Key words: Lipid droplet; Number of cellular lipid droplets; Total volume of cellular lipid droplets; Neutral lipid synthesis pathway

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q26; Q75; Q593 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)20-3801-08

* 基金项目:国家自然科学基金委重大研究计划培育项目(91857103)

作者简介:张少燕,女,硕士研究生,主要研究方向:脂滴生物学,电话:021-31242085, E-mail: 18210700151@fudan.edu.cn

[△] 通讯作者:陈丰荣,男,博士,研究员,主要研究方向:脂滴生物学,电话:021-31242085, E-mail: derrick_chen@fudan.edu.cn

(收稿日期:2021-04-06 接受日期:2021-04-30)

前言

世界卫生组织表明,肥胖患者会使罹患 2 型糖尿病、高血压和心脏病的发生几率上升^[1,2],而且肥胖人群被认为是新型冠状病毒肺炎的易感人群^[3]。肥胖是由于代谢紊乱后营养摄入量大于消耗量所导致的脂质储存过剩的结果,而脂质储存于机体是以脂肪酸合成中性脂方式储存在细胞的脂滴(Lipid droplets, LD)中,例如脂肪组织、肝脏与肌肉的脂滴中。近年来脂滴研究揭示了一系列脂代谢紊乱疾病发生发展的分子调控机制,例如脂肪肝、动脉粥样硬化、脂肪营养不良等^[4]。

脂滴是一种动态细胞器,其主要组成是单层磷脂层包裹着中性脂以及单层膜装载着众多的脂滴相关蛋白^[5,6],其中储存的中性脂可以是甘油三酯(Triglycerides, TG)或固醇酯。从细菌到人类,几乎所有生物体内都发现了脂滴,是一种保守的细胞器^[7]。虽然作为一种保守的细胞器,一些研究揭示了脂滴在不同类型细胞内的数量和大小方面都存在差异^[8,9],并且其大小、数量的动态变化与细胞内的营养物代谢状态高度相关^[10]。

脂肪酸合成为中性脂是主要发生在内质网腔内,伴随着新生脂滴从内质网出芽生成,将中性脂转移至新生脂滴储存^[11]。在肠细胞中可通过单酰基甘油途径合成 TG^[12],或者在肝细胞、脂肪细胞中是通过甘油-3-磷酸途径来合成 TG^[13,14]。在中性脂合成通路中,二酰基甘油经被二酰基甘油酰基转移酶(Diacylglycerol acyltransferase, DGAT)酶催化合成为 TG,其中 DGAT 有 DGAT1 和 DGAT2 这两个同工酶^[15]。DGAT1 存在于内质网中,负责运用外源吸收的脂肪酸或细胞内脂解来源的脂肪酸进行甘油三酯合成,而 DGAT2 则定位在内质网或脂滴上,负责运用细胞内源的脂肪酸进行甘油三酯的合成^[16]。这两种 DGAT 酶被发现有不同的生物学与生理功能:DGAT1 介导脂肪细胞中的脂肪酸再酯化进而保护内质网免受脂毒性危害^[17];DGAT1 在肠上皮的脂肪代谢和脂毒性中有重要作用^[18];DGAT1 抑制视黄醇依赖性调节 T 细胞形成,并介导自身免疫性脑脊髓炎^[19];DGAT2 的缺失能够减少肝脂肪变性而不会增加小鼠的肝脏炎症或肝纤维化^[20]。尽管已揭示了 DGAT 酶的多种生物学功能,但这两种 DGAT 酶对脂滴大小、数量动态变化差异与分子调控机制仍是不清楚的。

目前有一些分析方法被用于脂滴定量分析,例如通过脂滴的圆度以期在成团的脂滴中能够分辨出个别脂滴,另外以前大部分技术是采用显微镜拍摄收集到二维的脂滴影像图,通过手动的方式测量脂滴的直径,但这种方法不适用于辨识细胞内为数众多的小脂滴。为了解决现有脂滴分析方法的问题,并更加高通量、高信心度定量解析两种 DGAT 酶对脂滴大小、数量动态变化差异的影响,本文主要介绍了我们所建立的高内涵脂滴三维成像分析系统,透过所获得高分辨率的细胞与脂滴图像进行自动化分析,来定量获得细胞内脂滴的总体积量、脂滴平均体积和单一细胞内脂滴平均数量等三种脂滴定量参数,进一步通过对这两种酶进行表达量与活性干扰后,在不同细胞内解析脂滴的各种动态变化。本文通过这一系列的实验,证明了不同细胞之间脂质储存在脂滴的方式不一样,并且 DGAT1 和 DGAT2 在脂滴变化中发挥着不同的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

人宫颈癌细胞系 HeLa、猴肾成纤维细胞系 COS-7、小鼠肝细胞系 AML-12 均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;小鼠 3T3-L1 前体脂肪细胞系购自美国 ATCC。胎牛血清购自 Biological Industries 公司;DMEM 细胞培养基 (high glucose, with L-Glutamine and Phenol Red)、磷酸盐缓冲液(Phosphate-buffered saline, PBS)均购自 Hyclone 公司;F-12 细胞培养基购自 Macgene 公司;胰酶 Trypsin-EDTA 购于生工生物公司;BODIPY 493/503、转染试剂 Lipofectamine™ RNAiMAX 购于美国 Thermo Fisher 公司;DGAT1 抑制剂购自 Selleck-Chemicals;DGAT2 抑制剂、油酸(Oleic Acid, OA)、青霉素和链霉素(100×)、甘油三酯储存检测试剂盒均购自 Sigma-Aldrich 公司;染料 Hoechst 33342 购自 Tocris;高内涵 96 孔盘购自 Perkin Elmer;靶向人和猴基因的 siRNA oligo 购自吉玛。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 培养 AML-12 细胞,我们使用 DMEM / F-12 常规培养基并包含 10% 胎牛血清(已加入青链霉素和胰岛素-转铁蛋白-硒溶液)。另外,针对 HeLa、COS-7、3T3-L1 前体脂肪细胞的培养,我们准备了含有 10% 胎牛血清(已加入青链霉素)的 DMEM 培养基,并将这些细胞培养在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中。

1.2.2 实时荧光聚合酶链反应(RT-PCR) 使用 Trizol(Sigma-Aldrich)从细胞内提取分离 RNA,并使用 Mastercycler 梯度 PCR 系统(Eppendorf)合成制备具有逆转录酶反应的 cDNA。使用 StepOnePlus™ 实时 PCR 系统(Applied Biosystems)结合 SYBR Green RT-PCR 预混液(日本 TOYOBO)检测目的基因的转录表达,利用 GAPDH 作为参考基因,对每种反应进行三次重复验证。

1.2.3 siRNA 基因沉默 当细胞密度在培养皿中达到约 90% 时,使用 Lipofectamine™ RNAiMAX 进行小干扰 RNA(siRNA)的基因表达敲降(Lipofectamine : siRNA = 4 : 1),利用 siNC 作为对照,所使用的 siRNA 浓度为 20 μM。

1.2.4 细胞内甘油三酯(Triglycerides, TG)储存检测 当 AML-12 和 HeLa 细胞的细胞密度在培养皿中达到 70% 时,加入不同浓度的油酸处理(0 μM, 50 μM, 100 μM, 200 μM)。16 小时后,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗三遍,再用 2 毫升 PBS 吹起,移入 15 毫升玻璃管,加入 8 毫升混合萃取液(正己烷:异丙醇 = 3 : 2),长时间剧烈振荡,放置 10 分钟后,进行 1000 rpm 离心 10 分钟。接着把含蛋白的底层溶液取出并以 4000 rpm 方式离心 20 分钟,去掉上层水溶液。将下层沉淀以 60℃ 烘干至粉末状后,加入 1 毫升 0.2 M、37℃ 的 KOH 摇晃溶解过夜后,使用 BCA 试剂盒定量样品总蛋白浓度。另一方面,吸取有机相到玻璃管中,用真空干燥仪吹干。吹干后加入含有 1% Triton X-100 的氯仿 0.5-1 毫升,混匀,继续吹干,然后加入 ddH₂O(200 μL)混匀,最后用甘油三酯储存检测试剂盒检测。

1.2.5 高内涵三维成像与影像定量分析 开启 Operetta/Opera 与 Harmony, 设置高内涵拍摄温度 37℃、CO₂ 浓度 5%, 将 PE 板上培养的细胞放入仪器,选择 63 倍的水镜进行拍摄,选择细

细胞核荧光通道 HOECHST 33342、脂滴荧光通道 Alexa 488, 确定拍摄范围以及拍摄的每孔 25 个视野、设置层扫范围 $-4\ \mu\text{m}\sim 11\ \mu\text{m}$, 保存数据运行拍摄, 待拍摄完毕后选择 Image Analysis 对细胞核与脂滴进行定量图像分析。在这里我们采用五个指标去衡量细胞内脂滴的动态变化, 细胞数量 (cell number)、脂滴数量 (LD number)、脂滴体积 / 脂滴数 (LD volume/LD, 单位: μm^3)、脂滴数量 / 细胞数 (LD number/cell)、脂滴体积 / 细胞数 (LD volume/cell, 单位: μm^3)。

1.2.6 统计分析 实验数据运用 GraphPad Prism 8 软件作图, 所有数值以平均值 $\pm$ 标准偏差的方式呈现。两组数据间的差异使用双尾学生 T 检验分析 (Two tailed student's T test) 进行比较。其中 $P<0.05$, 用 * 表示; $P<0.01$, 用 ** 表示; $P<0.001$, 用 *** 表示。

2 结果

2.1 利用高内涵脂滴三维影像分析系统量化在四种细胞内的脂滴数量和大小差异

为了测定不同细胞内储存脂质的脂滴动态变化差异, 我们建立了高内涵细胞内脂滴三维成像与自动化分析系统来量化

脂滴的外观表型变化 (图 1A)。我们准备了实验室常见的四种细胞系来进行细胞内脂滴三维表型鉴定, 分别是人源宫颈癌细胞 HeLa、鼠源肝细胞 AML-12、鼠源 3T3-L1 前体脂肪细胞, 以及猴肾成纤维细胞 COS-7。这些选择的细胞分别被培养在多孔盘中, 经过不同浓度的油酸处理使得细胞能生成脂滴, 并将这些准备好的细胞利用高内涵成像系统进行细胞内脂滴的三维层扫拍摄, 所获得的高通量细胞与脂滴的三维立体影像再通过自动化脂滴定量分析系统可获得我们所设置的五项数字化指标, 分别是影像视野内的总细胞数量、总脂滴数量、单一细胞内的总脂滴体积 (LD volume/cell)、单一细胞内的平均脂滴数 (LD number/cell) 与平均脂滴体积 (LD volume/LD)。量化后的数据显示, 当细胞受到油酸处理后, 随着油酸浓度从 $0\ \mu\text{M}$ 增加到 $200\ \mu\text{M}$, 上述四种细胞内的脂滴数量和大小都在不断增大 (图 1B)。我们选择在油酸处理浓度最高的 $200\ \mu\text{M}$ 时对这四种细胞类型的单一细胞内总脂滴体积进行对比, 可以发现 AML-12 这类肝细胞内的脂滴总体积是最大的 (图 1C), 依次是在 3T3-L1 前体脂肪细胞, 而在 COS-7 与 HeLa 细胞内的脂滴总体积相对是较小的, 说明后面两种细胞的储脂能力是较低的。

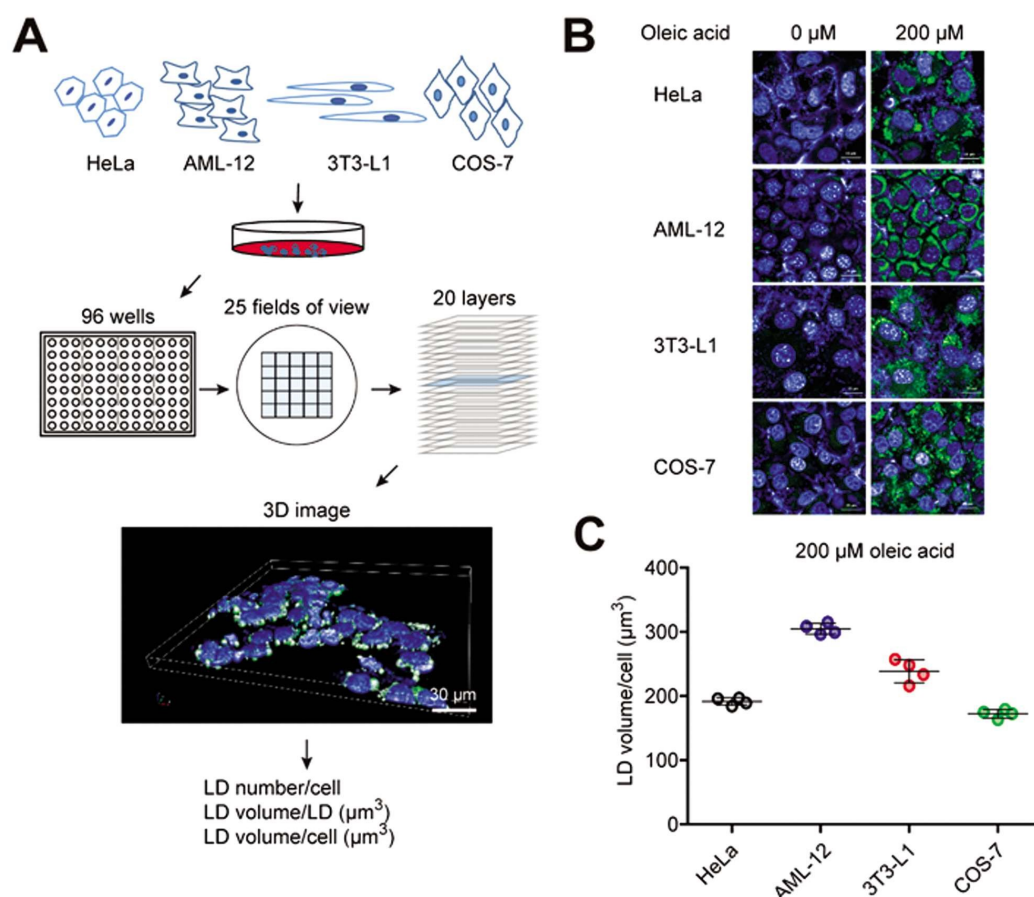


图 1 高内涵脂滴三维影像分析系统用于量化细胞内的脂滴数量和大小差异

(A) 高内涵脂滴三维影像分析系统的脂滴量化流程。(B) HeLa、AML-12、3T3-L1 与 COS-7 四种细胞在不同油酸浓度处理前后的脂滴变化。

(C) 在 $200\ \mu\text{M}$ 油酸处理下四种细胞类型的单一细胞内总脂滴体积量。

Fig.1 High content three-dimensional LD imaging and analysis system was applied to quantify the number and size of cellular LDs

(A) The quantification process in a high content three-dimensional LD imaging and analysis system. (B) The dynamics of cellular LDs in four types of cells such as HeLa, AML-12, 3T3-L1, and COS-7 cells under the treatment using different concentrations of oleic acids. (C) The total volume of LDs per cell in the four types of cells after the treatment using $200\ \mu\text{M}$ oleic acids.

2.2 高内涵脂滴三维影像分析系统优于传统生化试剂方法检测细胞内的脂储存量

进一步的定量分析数据显示,随着油酸处理浓度从 0 μM 、50 μM 、100 μM 到 200 μM 增加,在 HeLa 细胞内的脂滴总体积变化呈现梯度增加(图 2A),这梯度增加同时也呈现在单一细胞内的平均脂滴数(总脂滴数量/总细胞数)与平均脂滴体积(总脂滴体积/总脂滴数)的两种数字化指标(图 2A)。相同的是随着油酸处理浓度增加,三项脂滴数字化指标的梯度增加也发生在 3T3-L1 与 COS-7 细胞内(图 2B,2C)。特别有趣的是,在 AML-12 中发现油酸处理浓度的增加能促使细胞内脂滴总体积的梯度增加,主要是透过脂滴数量的增加,然而脂滴的平均体积则是维持在一个恒定范围(图 2D),这显示 AML-12 这类细胞中是以脂滴数量增多但脂滴体积维持恒定的方式储存脂质。

为了检验我们所建立的高内涵脂滴三维定量方法的可靠性与灵敏性,我们也使用了传统生化试剂盒来检测不同细胞内甘油三酯的储存含量。进一步简化实验比较,我们选择高内涵定量方法所确认储脂能力最高的 AML-12 与相对较低的 HeLa 细胞来进行生化试剂盒检测比较。基于生化试剂盒方法所需的细胞量,我们使用常规培养 6 厘米盘的细胞总量进行油酸处理后测定这些细胞内的 TG 总含量,发现在这两种细胞都只能在油酸处理浓度为 0 μM 和 200 μM 的两组数据间看出差异,而利用 TG 试剂盒检测 50 μM 、100 μM 油酸处理浓度的两组实验组与 0 μM 对照组几乎区分不出差异(图 3A),这些结果显示传统 TG 生化检测试剂盒在低浓度油酸处理 6 厘米盘的细胞总量(约 4×10^6 细胞)条件下表现出检测灵敏度不足的问题。进一步验证这检测灵敏度不足确实是细胞总量太少的原因,我们改用 10 厘米盘的细胞量进行相同浓度油酸处理与 TG 含量测定,可以看到在四个不同油酸处理浓度下的 AML-12 细胞可以用试剂盒检测出 TG 含量的差异(图 3B),但对于 HeLa 细胞仍然不能够区分三个低油酸浓度处理后的变化差异(图 3B)。这些结果指出高内涵脂滴三维影像定量分析方法相对于传统的 TG 生化试剂盒检测来得更加灵敏,所需的细胞数量要求也大量减少。

2.3 敲低不同细胞的 DGAT1 和 DGAT2 后引起不一样的脂滴表型

脂滴的数量、大小动态变化与中性脂的合成和降解紧密相关,其中加入油酸后主要促进中性脂的合成。合成通路一开始的标志就是乙酰辅酶 A 合成酶(Acyl-CoA synthetase, ACSL)催化脂肪酸生成脂肪酸辅酶 A(FA-SCoA)(图 4A),这一步可能发生在细胞质中,接着经甘油-3-磷酸乙酰转移酶(Glycerol-3-phosphate acyltransferase, GPAT)催化而生成溶血磷脂酸(Lysophosphatidic acid, LPA),这是合成的限速步骤^[21]。后又经 AGPAT 催化生成磷脂酸(Phosphatidic acid, PA)。再经磷脂酸被磷脂酸磷酸酶(Phosphatidate phosphatase, PAP)水解后,生成 DAG。最后通过 DGAT 催化形成 TG。我们首先检测在四种细胞系中甘油三酯合成通路的 19 种酶的转录表达水平,对于任何一种细胞,油酸处理增多并没有显著改变这 19 种酶的转录水平(图 4B)。另一方面,中性脂脂解通路的三种脂水解酶(ATGL, HSL, MGL)的转录水平在有无油酸处理条件下对这四

种细胞也无显著改变。

为了进一步检验中性脂合成通路中这 19 种酶对于脂滴的数量、大小动态变化的影响,我们对 HeLa 细胞进行基因转录表达的沉默(RNA interference),并结合高内涵定量分析方法量化脂滴外观表型变化。如我们预期的是,GPAT4 敲低使得 HeLa 细胞内的脂滴总体积显著降低(图 4C)^[21]。同样的是, DGAT1 和 DGAT2 双敲低(siDGAT1 & siDGAT2)后,脂滴总体积也显著降低(图 4C),但单纯只敲低 DGAT1 或 DGAT2 后并没有影响 HeLa 细胞内脂滴总体积储存量。有意思的是,单一敲低 AGPAT1 或 AGPAT2 则导致 HeLa 细胞内脂滴总体积储存量的上升。我们进一步在 COS-7 细胞中进行 DGAT1 或 DGAT2 单一敲低以及双敲低 DGAT1 和 DGAT2,结果发现单一敲低 DGAT1 或双敲低 DGAT1 和 DGAT2 都能显著降低脂滴总体积储存量(图 4D),这结果和在 HeLa 细胞的基因表达敲低结果很不一样。

2.4 DGAT 抑制剂处理四种细胞引起两种不同的脂滴动态变化

中性脂合成通路产生脂滴的最后一步关键酶是 DGAT,其有两个分别是 DGAT1 和 DGAT2,两种蛋白在不同细胞中的生物学功能差异一直不明确。基于以上实验方法,我们在四种细胞中分别加入 DGAT1、DGAT2 抑制剂来干扰这两个酶的功能活性,并定量各种细胞内的脂滴动态变化。HeLa 和 AML-12 细胞的高内涵脂滴定量结果显示,需要两个抑制剂同时处理才能使细胞内的脂滴总体积储存量有显著的下降,而单独一种抑制剂处理对脂滴总储存量都没有巨大的变化(图 5A)。相比之下,在 COS-7 和 3T3-L1 细胞中仅加入 DGAT1 抑制剂后,细胞内的脂滴总体积储存量就有明显的下降,降低程度跟两个抑制剂同时处理后结果相似,但加入 DGAT2 抑制剂则没有显著变化(图 5B)。上述的两种脂滴动态变化结果显示,这四种细胞对于 DGAT 抑制剂的处理有两种截然不同的脂质储存方式响应。

为了探究这个差异现象,我们进一步检测了这四种细胞中 DGAT1 和 DGAT2 的转录水平表达量,发现 HeLa 和 AML-12 细胞中 DGAT1 和 DGAT2 的转录表达水平相当(图 5C),而 COS-7 和 3T3-L1 细胞里的 DGAT2 表达水平显著降低(图 5D),这或许说明在后面两种细胞中加入 DGAT2 抑制剂没有脂滴表型变化,但加入 DGAT1 抑制剂会大幅度降低脂滴总体积储存量。另一方面,也揭示了 DGAT1 可能作为细胞内主要的 DGAT 酶扮演脂滴储存脂质的重要角色。

3 讨论

通过新型的高内涵脂滴三维影像定量分析系统研究在不同细胞中脂滴的动态变化,我们发现在油酸处理后,四种试验的细胞都会进行甘油三酯的合成与脂滴生成,并且每个细胞中的脂滴总体积储存量都有很大的增加。但是对于 AML-12 细胞而言,其脂滴平均体积大小的变化范围是维持恒定的,增加脂质储存在脂滴内是透过脂滴数量增加的方式来增长脂滴总体积储存量,那么脂滴的大小、数量调控是受什么因素影响的?根据先前 Florian Wilfling 等人的研究揭示, DGAT1 的过表达可以导致脂滴数量增加,而 DGAT2 的过表达则可以导致大脂滴成长与积累^[10],但是我们在 AML-12 细胞中测得相同的 DGAT2 与 DGAT1 转录水平表达量,无法说明透过脂滴数量增加这独特的脂滴脂质储存方式,有待后续进一步实验去阐明。

在 HeLa 细胞进行了 19 种酶的转录表达敲低测试,筛选出

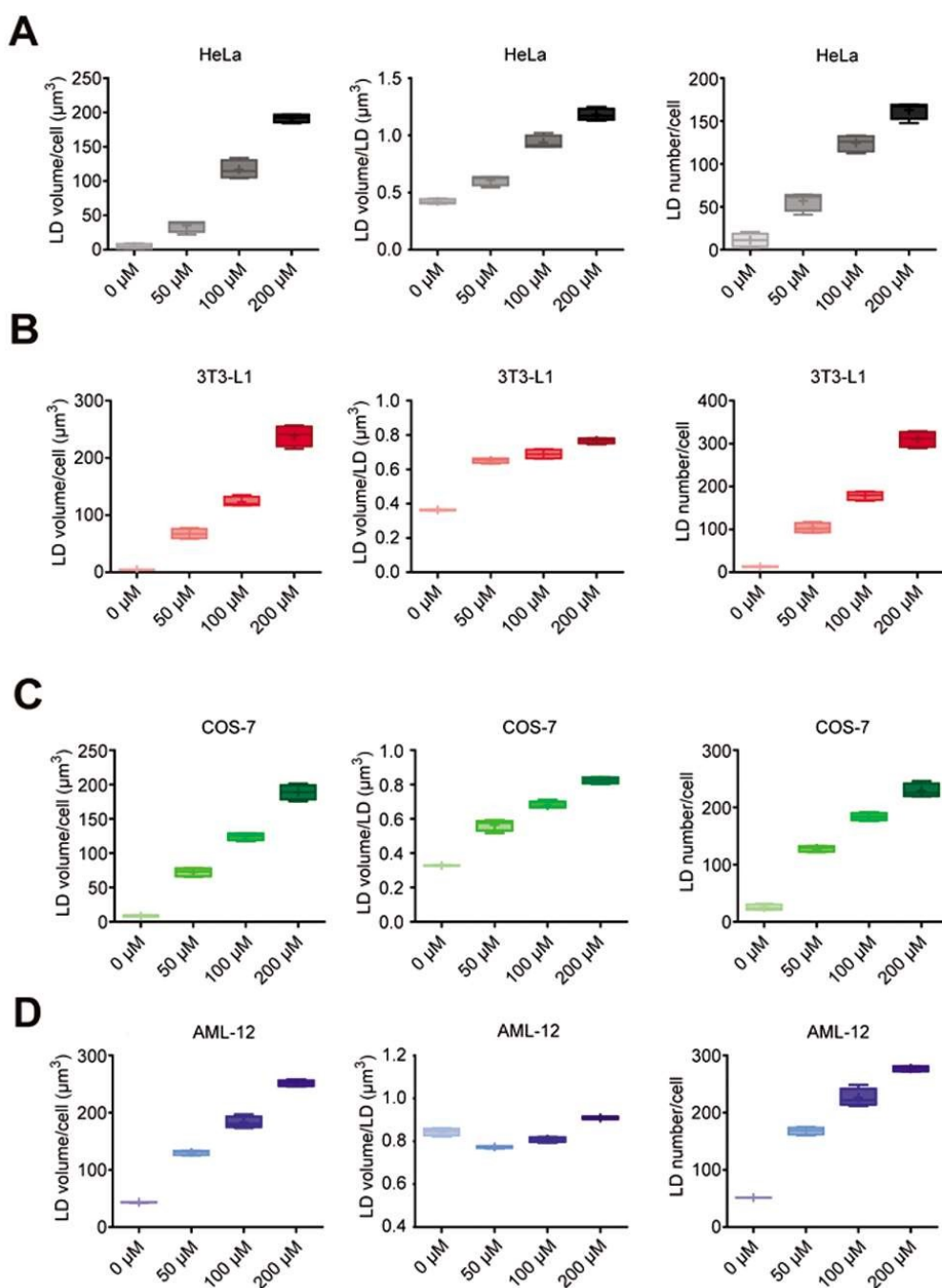


图2 利用高内涵影像分析细胞内不同油酸浓度处理后的脂储存量

在不同油酸浓度处理下,在(A)HeLa 细胞内、(B)3T3-L1 细胞内、(C)COS-7 细胞内、(D)AML-12 细胞内的三项脂滴动态指标变化。

Fig.2 The measurement of lipid storage under the treatment using various concentrations of oleic acids by using high content LD imaging. After the treatment of various concentrations of oleic acids, the three dynamic parameters of LDs in (A) HeLa, (B) 3T3-L1, (C) COS-7, and (D) AML-12 cells.

5 种酶对于脂滴的数量、大小动态变化有显著的影响。其中,如预期地发现敲低 GPAT4 显著降低细胞内脂滴脂质的储存能力,这是因为 GPAT4 被发现是利用外源脂肪酸或脂水解产生的脂肪酸转化合成中性脂的关键限速酶^[21]。此外,DGAT1 和 DGAT2 两种酶作为中性脂合成的最后一步,我们透过基因表达沉默与抑制剂处理等一系列的实验手段,揭示了两种脂滴动态变化的差异。在 HeLa 和 AML-12 细胞中,只有同时加入两个抑制剂才能发挥抑制脂滴生成的效果,暗指在这两种细胞中的 DGAT1 和 DGAT2 发挥着中性脂合成功能的互补作用^[17,22,23]。相对而言,COS-7 细胞就仅凭借着 DGAT1 来完成中性脂合成

的最后一步。有意思的是,3T3-L1 前体脂肪细胞仍有一定程度的 DGAT2 转录表达,这对未来研究 DGAT2 功能提供了更多的启示。已有的研究发现 DGAT2 主要负责细胞内脂肪酸从头合成中性脂^[24,25],其提供一种与 SREBP1 介导途径相关的反馈机制^[26,27]。DGAT2 是一种在真核生物进化上保守的 TG 合成酶^[15,28],而 DGAT1 是 MBOAT 基因家族的成员,它介导脂质酯化作用常常与内质网中脂质过度积累导致地的脂毒性有关^[17]。在我们这项研究中揭示了这两种 DGAT 酶对脂滴动态变化的不同作用,其各自的分子调控机制是我们下一步要去研究的。

相比于传统生化试剂检测 TG 含量,我们所建立的新型高

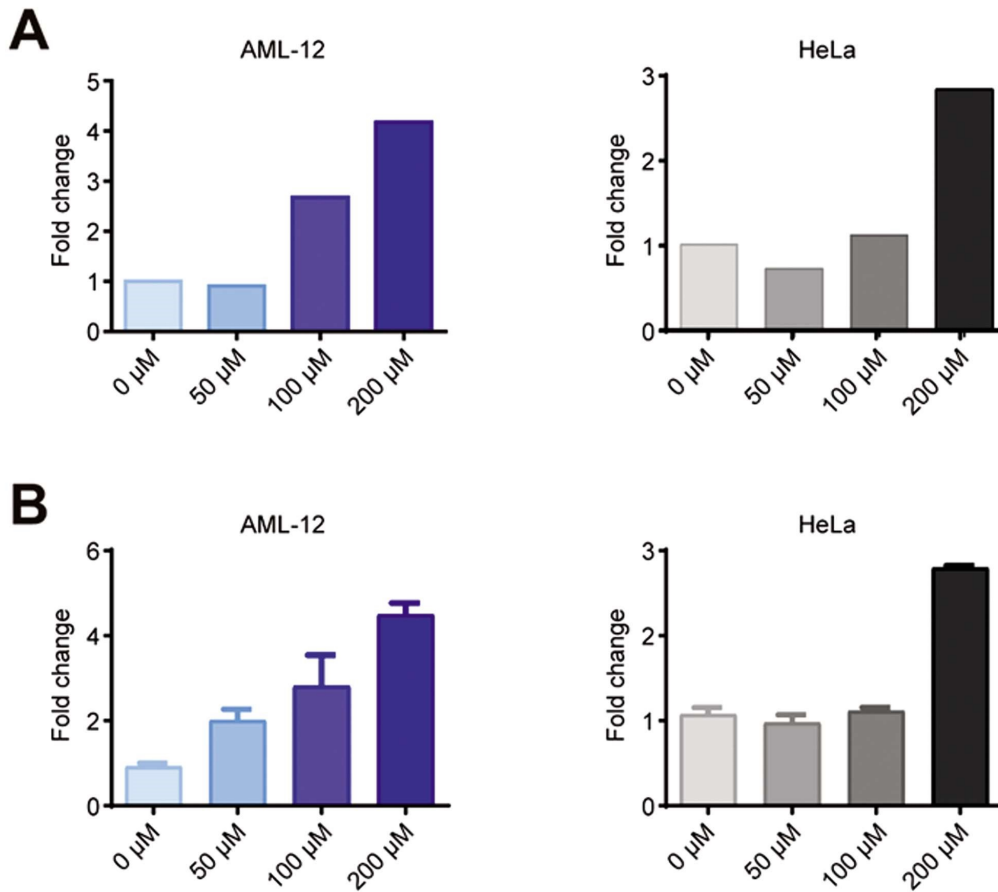


图3 利用生化试剂盒检测细胞内在不同油酸浓度处理后的脂储量

在不同油酸浓度处理下,使用(A)6厘米盘的细胞总量或(B)10厘米盘的细胞总量,在AML-12和HeLa细胞内甘油三酯储存量的变化。

Fig.3 The measurement of lipid storage under the treatment using various concentrations of oleic acids by using a biochemical assay

Under the treatment using various concentrations of oleic acids, the changed quantities of triglycerides in HeLa or AML-12 cells on (A) a 6 cm dish or (B) a 10 cm dish were measured by a biochemical assay.

内涵脂滴三维影像定量分析系统已经展现出卓越的灵敏性,并且大幅降低所需的细胞数量。结合自动化分析系统可以量化脂滴的外观表型变化,例如重要的脂滴总体积储存量、单一细胞内的平均脂滴数与平均脂滴体积等三项数字化指标,为未来研究细胞内脂质储存在脂滴内的分子调控机制提供强大的实验手段,对定量脂滴生物学的研究奠定基础。

参考文献(References)

- [1] Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation [J]. World Health Organ Tech Rep Ser, 2000, 894 (i-xii): 1-253
- [2] Ataey A, Jafarvand E, Adham D, et al. The Relationship Between Obesity, Overweight, and the Human Development Index in World Health Organization Eastern Mediterranean Region Countries[J]. J Prev Med Public Health, 2020, 53(2): 98-105
- [3] Finer N, Garnett S P, Bruun J M. COVID-19 and obesity[J]. Clin Obes, 2020, 10(3): e12365
- [4] Gao G, Chen F J, Zhou L, et al. Control of lipid droplet fusion and growth by CIDE family proteins [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2017, 1862(10 Pt B): 1197-1204
- [5] Ding Y, Yang L, Zhang S, et al. Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets [J]. J Lipid Res, 2012, 53(3): 399-411
- [6] Onal G, Kutlu O, Gozuacik D, et al. Lipid Droplets in Health and Disease[J]. Lipids Health Dis, 2017, 16(1): 128
- [7] Zhang C, Liu P. The lipid droplet: A conserved cellular organelle [J]. Protein Cell, 2017, 8(11): 796-800
- [8] Hermes A, Bosch M, Ariotti N, et al. Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity [J]. Curr Biol, 2013, 23(15): 1489-1496
- [9] Thiam A R, Beller M. The why, when and how of lipid droplet diversity [J]. J Cell Sci, 2017, 130(2): 315-324
- [10] Balthasar N, Dalgaard L T, Lee C E, et al. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure[J]. Cell, 2005, 123(3): 493-505
- [11] Wilfling F, Wang H, Haas J T, et al. Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets[J]. Dev Cell, 2013, 24(4): 384-399
- [12] D'Aquila T, Hung Y H, Carreiro A, et al. Recent discoveries on absorption of dietary fat: Presence, synthesis, and metabolism of cytoplasmic lipid droplets within enterocytes [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1861(8 Pt A): 730-747
- [13] Wang H, Airola M V, Reue K. How lipid droplets "TAG" along: Glycerolipid synthetic enzymes and lipid storage [J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2017, 1862(10 Pt B): 1131-1145
- [14] Zhang P, Reue K. Lipin proteins and glycerolipid metabolism: Roles at the ER membrane and beyond[J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2017, 1859(9 Pt B): 1583-1595
- [15] Yen C L, Stone S J, Koliwad S, et al. Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis[J]. J Lipid

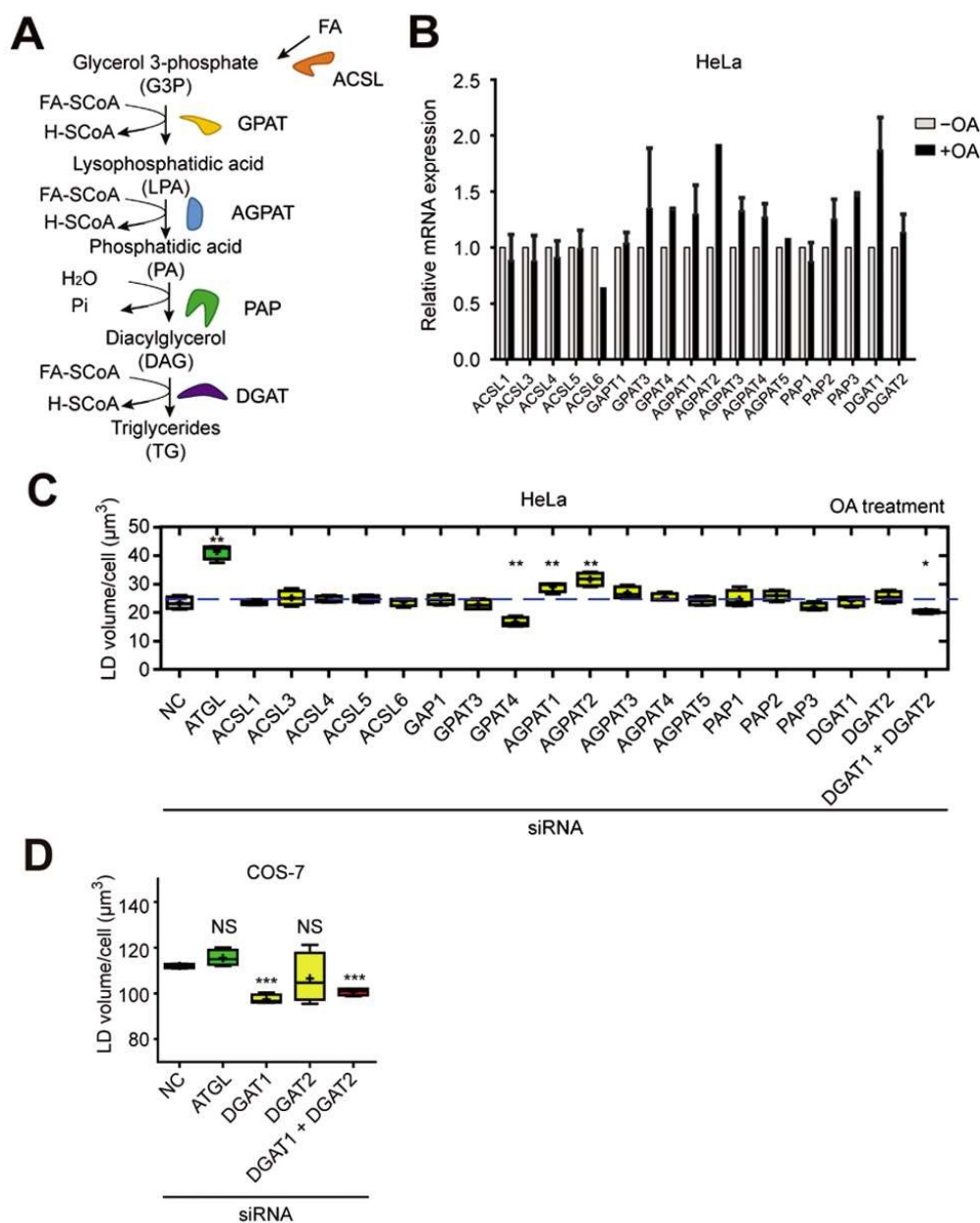


图4 敲低细胞内中性脂合成通路中的关键基因会引起不同的脂滴表型

(A)甘油三酯合成通路。(B)在有/无脂肪酸处理 HeLa 细胞后,19 个在甘油三酯合成通路中关键酶的转录表达水平变化。(C)在 HeLa 细胞中敲低 19 种酶转录表达量后单一细胞总脂滴体积变化。(D)在 COS-7 细胞中敲低 DGAT 酶表达量后单一细胞总脂滴体积变化。siATGL 作为细胞内总脂滴体积增大的正对照组。

Fig.4 Knockdown of key genes in the neutral lipid synthesis pathway resulted in various phenotypes of cellular LDs

(A) A triglycerides synthesis pathway. (B) Under the treatment using oleic acids or not, the transcriptional expression of 19 key enzymes in the neutral lipid synthesis pathway. (C) The total volume of LDs per cell in HeLa cells after knocking down the transcriptional expression levels of the 19 key enzymes. (D) The total volume of LDs per cell in COS-7 cells after knocking down the transcriptional expression levels of DGAT1 or DGAT2. siATGL was a positive control that increased the total volume of LDs per cell.

Res, 2008, 49(11): 2283-2301

- [16] Xu N, Zhang S O, Cole R A, et al. The FATP1-DGAT2 complex facilitates lipid droplet expansion at the ER-lipid droplet interface [J]. J Cell Biol, 2012, 198(5): 895-911
- [17] Chitraju C, Mejhert N, Haas J T, et al. Triglyceride Synthesis by DGAT1 Protects Adipocytes from Lipid-Induced ER Stress during Lipolysis[J]. Cell Metab, 2017, 26(2): 407-18 e3
- [18] van Rijn J M, Ardy R C, Kuloglu Z, et al. Intestinal Failure and Aberrant Lipid Metabolism in Patients With DGAT1 Deficiency [J]. Gastroenterology, 2018, 155(1): 130-43 e15

- [19] Graham K L, Werner B J, Moyer K M, et al. DGAT1 inhibits retinol-dependent regulatory T cell formation and mediates autoimmune encephalomyelitis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(8): 3126-3135
- [20] Gluchowski N L, Gabriel K R, Chitraju C, et al. Hepatocyte Deletion of Triglyceride-Synthesis Enzyme Acyl CoA: Diacylglycerol Acyltransferase 2 Reduces Steatosis Without Increasing Inflammation or Fibrosis in Mice[J]. Hepatology, 2019, 70(6): 1972-1985
- [21] Wendel A A, Cooper D E, Ilkayeva O R, et al. Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT)-1, but not GPAT4, incorporates newly syn-

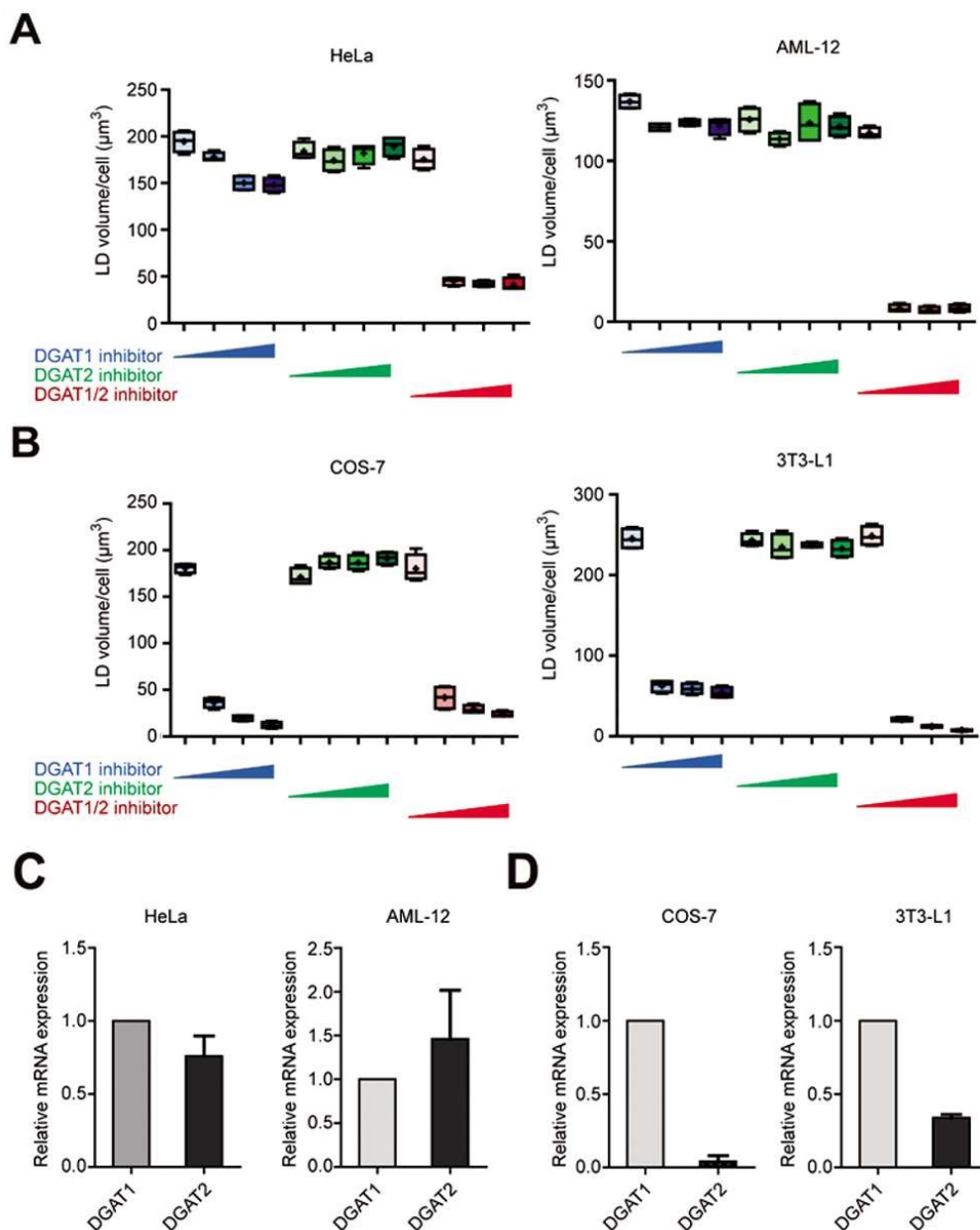


图 5 DGAT 抑制剂处理导致脂滴动态变化差异归咎于细胞内 DGAT1 与 DGAT2 的转录表达差异

(A)对 HeLa 与 AML-12 细胞处理两种不同浓度 DGAT 酶抑制剂后脂滴动态变化。(B)对 COS-7 与 3T3-L1 细胞处理两种不同浓度 DGAT 酶抑制剂后脂滴动态变化。(C)HeLa 与 AML-12 细胞的两种 DGAT 的转录表达水平。(D)COS-7 与 3T3-L1 细胞的两种 DGAT 的转录表达水平。

Fig. 5 The dynamics of cellular LDs after the treatment using DGAT inhibitors resulted from the difference in the transcriptional expression levels of DGAT1 and DGAT2

The dynamics of cellular LDs in (A) HeLa and AML-12 cell or (B) COS-7 and 3T3-L1 cells after the treatment using various concentrations of DGAT1 and DGAT2 inhibitors. The transcriptional expression levels of DGAT1 and DGAT2 are in (C) HeLa and AML-12 cell or (D) COS-7 and 3T3-L1 cells.

thesized fatty acids into triacylglycerol and diminishes fatty acid oxidation[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(38): 27299-27306

[22] Chitraju C, Walther T C, Farese R V, Jr. The triglyceride synthesis enzymes DGAT1 and DGAT2 have distinct and overlapping functions in adipocytes[J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(6): 1112-1120

[23] Harris C A, Haas J T, Streeper R S, et al. DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes [J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(4): 657-667

[24] Villanueva C J, Monetti M, Shih M, et al. Specific role for acyl CoA: Diacylglycerol acyltransferase 1 (Dgat1) in hepatic steatosis due to exogenous fatty acids[J]. *Hepatology*, 2009, 50(2): 434-442

[25] Wurie H R, Buckett L, Zammit V A. Diacylglycerol acyltransferase 2 acts upstream of diacylglycerol acyltransferase 1 and utilizes nascent

diglycerides and de novo synthesized fatty acids in HepG2 cells[J]. *FEBS J*, 2012, 279(17): 3033-3047

[26] Choi C S, Savage D B, Kulkarni A, et al. Suppression of diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(31): 22678-2288

[27] McLaren D G, Han S, Murphy B A, et al. DGAT2 Inhibition Alters Aspects of Triglyceride Metabolism in Rodents but Not in Non-human Primates[J]. *Cell Metab*, 2018, 27(6): 1236-48 e6

[28] Liu Q, Siloto R M, Lehner R, et al. Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase: molecular biology, biochemistry and biotechnology [J]. *Prog Lipid Res*, 2012, 51(4): 350-377