

研究论文

脂多糖通过mTOR途径抑制肝细胞脂质自噬

侯正萍, 李燕平, 赵蕾, 陈压西, 阮雄中*

重庆医科大学脂质研究中心, 脂糖代谢性疾病重庆市重点实验室, 重庆 400016

摘要: 本研究旨在探讨脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)对肝细胞脂质自噬的影响及其机制。体外培养人肝癌细胞株HepG2, 用0.1 mmol/L软脂酸(palmitic acid, PA)负荷, 分为对照(0 $\mu\text{g/mL}$ LPS)组、LPS (10 $\mu\text{g/mL}$)组、LPS+DMSO组、LPS+雷帕霉素(rapamycin, RAPA, 10 $\mu\text{mol/L}$)组。油红O染色观察HepG2细胞内脂质积聚情况; 自噬双标腺病毒mRFP-GFP-LC3转染细胞后激光共聚焦显微镜观察细胞自噬流; 通过氟硼二吡咯BODIPY 493/503荧光染料和溶酶体标记物溶酶体关联膜蛋白1 (lysosomal associated membrane protein 1, LAMP1)进行脂滴和溶酶体的共定位, 反映细胞内脂质自噬水平; Western blot检测哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、p-mTOR、核糖体S6激酶1 (ribosome protein subunit 6 kinase 1, S6K1)、p-S6K1、LC3II/I、P62蛋白表达。结果显示, 与对照组相比, LPS组细胞油红O染色红染脂滴增加, 自噬体增加, 自噬溶酶体明显降低, LAMP1/BODIPY共定位率降低($P < 0.05$), p-mTOR/mTOR、p-S6K1/S6K1和LC3II/LC3I比值升高, P62蛋白表达增加($P < 0.05$)。加入RAPA干预后, 与LPS+DMSO组相比, 自噬体减少, 自噬溶酶体明显增加, LAMP1/BODIPY共定位率升高($P < 0.05$), 肝细胞油红O染色红染脂滴减少($P < 0.001$)。综上, LPS通过激活mTOR通路抑制HepG2细胞脂质自噬, 从而加重细胞内脂质积聚。

关键词: 脂多糖; 肝细胞; 脂质自噬; 脂质积聚

中图分类号: R333.4; Q485; Q291

Lipopolysaccharide inhibits lipophagy in HepG2 cells via activating mTOR pathway

HOU Zheng-Ping, LI Yan-Ping, ZHAO Lei, CHEN Ya-Xi, RUAN Xiong-Zhong*

Key Laboratory of Metabolism on Lipid and Glucose, Center for Lipid Research, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: This study aimed to investigate the effect of lipopolysaccharide (LPS) on lipophagy in hepatocytes and the underlying mechanism. Human hepatoma cell line HepG2 was cultured *in vitro*, treated with 0.1 mmol/L palmitic acid (PA), and then divided into control group (0 $\mu\text{g/mL}$ LPS), LPS group (10 $\mu\text{g/mL}$ LPS), LPS+DMSO group and LPS+RAPA (rapamycin, 10 $\mu\text{mol/L}$) group. Lipid accumulation in hepatocytes was observed by oil red O staining. The autophagic flux of the cells was assessed using confocal laser scanning microscope after being transfected with autophagy double-labeled adenovirus (mRFP-GFP-LC3). The level of intracellular lipophagy was visualized by the colocalization of lipid droplets (BODIPY 493/503 staining) and lysosomes (lysosome marker, lysosomal associated membrane protein 1, LAMP1). The expression levels of mammalian target of rapamycin (mTOR), phosphorylated mTOR (p-mTOR), ribosome protein subunit 6 kinase 1 (S6K1), p-S6K1, LC3II/I and P62 protein were examined by Western blot. The results showed that the number of red lipid droplets stained with oil red O was significantly increased in LPS group compared with that in control group ($P < 0.001$). Moreover, in LPS group, the number of autophagosomes was increased, while the number of autophagolysosomes and the colocalization rate of LAMP1 and BODIPY were significantly decreased ($P < 0.05$). Meanwhile, the ratios of p-mTOR/mTOR and p-S6K1/S6K1, the ratio of LC3II/LC3I and the protein expression of P62 were significantly increased ($P < 0.05$).

Received 2020-10-19 Accepted 2021-03-11

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81970510), and the Scientific and Technological Research Program of Chongqing Municipal Education Commission, China (No. KJQN201900438).

*Corresponding author. Tel: +86-23-68486780; E-mail: xiongzruan@foxmail.com

in LPS group. Furthermore, compared with LPS+DMSO group, RAPA treatment obviously reduced the number of lipid droplets and autophagosomes, and raised the number of autophagolysosomes and the colocalization rate of LAMP1 and BODIPY ($P < 0.05$). In conclusion, the results demonstrate that LPS inhibits lipophagy in HepG2 cells via activating mTOR signaling pathway, thereby aggravating intracellular lipid accumulation.

Key words: lipopolysaccharide; hepatocytes; lipophagy; lipid accumulation

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver diseases, NAFLD) 是指除饮酒史外, 由其他原因引起的肝脏疾病, 包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、肝硬化等多种病理类型^[1]。NAFLD 的发病机制较为复杂, 但研究表明过量脂滴 (lipid droplets, LDs) 在肝细胞内积聚是其病变发生与发展的关键机制^[2]。LDs 中含有大量脂质, 多以甘油三酯形式储存。肝脏中介导 LDs 中甘油三酯的分解主要有两种途径: 胞浆脂解和自噬。自噬作为大部分真核细胞内存在的降解大分子物质的生物机制, 其高度选择性靶向 LDs 的过程称为脂质自噬 (lipophagy)^[3]。有研究显示, 抑制肝细胞自噬会增加细胞内 LDs 的大小和数量, 加重肝脏脂肪变性^[4], 因此, 脂质自噬可能在 NAFLD 发生与发展中起到重要作用。

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 也与 NAFLD 密切相关^[5], Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 识别 LPS 所引起的包括核转录因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 激活、炎症因子合成和释放增加、氧自由基大量生成等一系列反应是 NAFLD 发展为 NASH 的关键环节^[6]。但目前尚不清楚 LPS 是否参与肝细胞脂质自噬, 因此本研究以人肝癌细胞株 HepG2 为细胞模型, 观察 LPS 对细胞脂质积聚与脂质自噬的影响, 并初步探讨其分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与细胞 LPS、软脂酸 (palmitic acid, PA)、雷帕霉素 (rapamycin, RAPA) 购自 Sigma 公司; 自噬双标腺病毒 mRFP-GFP-LC3 构建于上海汉恒生物公司; 兔抗微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、p-mTOR 多克隆抗体购自 Cell Signaling 公司, 兔抗核糖体 S6 激酶 1 (ribosome protein subunit 6 kinase 1, S6K1)、p-S6K1 多克隆抗体购于美国 Selleck 公司; 兔抗溶酶体关联膜蛋白 1 (lysosomal associated membrane protein 1, LAMP1)、P62 多克隆

抗体购于武汉三鹰公司; 抗 β -actin 抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自北京博奥森公司; 罗丹明标记的山羊抗兔荧光二抗购于北京中杉金桥公司; 氟硼二吡咯 BODIPY 493/503 荧光染料购自 Invitrogen 公司; 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、油红 O 染色试剂盒购自北京索莱宝公司。

1.2 细胞培养与实验分组 人肝癌细胞株 HepG2 购自中国科学院上海细胞库; 胎牛血清和 DMEM 培养基、青霉素-链霉素双抗购自 Hyclone 公司; 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 购自上海碧云天公司; HepG2 细胞培养用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 并添加 2% 的青霉素+链霉素双抗, 5% CO₂、37 °C 细胞孵育箱培养, 待细胞生长融合至 80%~90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化传代。实验分组: (1) 对照 (Control) 组: 培养液中加入 0.1 mmol/L PA; (2) LPS 组: 在对照组基础上同时加入 10 μ g/mL LPS; (3) LPS+DMSO 组: LPS 处理同时加入 14 mmol/L DMSO; (4) LPS+RAPA 组: LPS 处理同时加入 10 μ mol/L RAPA (溶剂为 DMSO); 24 h 后收集细胞。

1.3 油红 O 染色检测细胞内脂质积聚 将细胞接种到铺上细胞爬片的 12 孔板中, 待细胞贴壁后, 按实验分组给予相应处理。PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 双蒸水清洗, 异丙醇快速浸润一遍, 滴加油红 O 染色液, 避光染色 15 min, 双蒸水清洗, 苏木素染色 1 min, 显微镜下观察拍照。用 1.5 mL 异丙醇洗脱油红 O 染色液, 于酶标仪 490 nm 波长中检测吸光度 (optical density, OD) 定量。

1.4 腺病毒转染与激光共聚焦观察细胞自噬流

取生长状态良好的细胞种于共聚焦皿中, 细胞铺满皿底 70%~80% 时, 按转染说明转染自噬双标腺病毒 mRFP-GFP-LC3, 48 h 后按实验分组给予相应处理。激光共聚焦显微镜观察细胞内荧光并拍照。此腺病毒用红色荧光蛋白 (mRFP) 及绿色荧光蛋白 (GFP) 串联标记 LC3, LC3 是自噬体的标记物, 自噬体晚期与溶酶体结合成为自噬溶酶体, 此时标记 LC3 的绿色荧光蛋白会淬灭, 表达为红色荧光, 自噬体则表达两种荧光, 混合色为黄色。观察红色荧

光点和黄色荧光点可反映自噬流的情况。

1.5 LAMP1/BODIPY 荧光染色观察脂滴在溶酶体中的定位

取对数生长期细胞种于共聚焦皿中, 细胞 24 h 贴壁后按实验分组给予处理。PBS 清洗细胞, 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 清洗, 0.1% Triton X-100 透化 2 min, PBS 清洗 3 次, 5% BSA 封闭 1 h, 兔抗人 LAMP1 抗体 (1:100) 4 °C 孵育过夜。PBS 清洗 3 次, 避光, 罗丹明标记的山羊抗兔荧光二抗 (1:200) 室温孵育 1 h, PBS 清洗 3 次, DMSO 溶解 BODIPY 493/503 染色剂, 配制浓度为 2 μg/mL, 染色 30 min, PBS 清洗, DAPI 染核 5 min, PBS 清洗 3 次, 滴加抗荧光淬灭剂。激光共聚焦显微镜观察细胞中溶酶体与脂滴共定位情况并拍照, 记录 LASX 软件上每组绿色与红色荧光共定位率值。

1.6 细胞总蛋白提取

PBS 清洗 3 次, 1000 r/min 离心 5 min, 去上清, 加入 RIPA 蛋白裂解液 (400 μL) 及蛋白酶、磷酸酶抑制剂 (1:100), 4 °C 裂解 30 min, 12000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液。BCA 法检测蛋白浓度后, 剩余蛋白样本加入 1/3 体积的上样缓冲液, 沸水煮 10 min, -20 °C 冰箱保存。

1.7 Western blot 检测自噬相关蛋白表达

根据蛋白分子量的大小, 分别用 12%、8%、6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜。3% BSA 室温下孵育 1 h, 用 3% BSA 按 1:1000 稀释兔抗 mTOR、p-mTOR、S6K1、p-S6K1、P62、LC3、β-actin 多克隆抗体, 4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜, 用 TBST 按 1:5000 稀释辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜, ECL 化学发光液显影, SagCapture 成像系统采集图像, Image J 定量各条带灰度值,

以靶蛋白灰度值与 β-actin 灰度值之比表示蛋白相对表达水平。

1.8 统计学分析

应用 GraphPad Prism 5 进行统计学分析, 实验数据以 mean ± SD 表示, 两组间比较用 *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析, *P* < 0.05 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS加重HepG2细胞的脂质积聚

细胞油红 O 染色结果显示, 与对照组相比, LPS 组细胞油红 O 染色明显加深, 且红染脂滴增加 (图 1), 油红 O 定量结果显示 LPS 组脂质含量显著高于对照组 (*P* < 0.001)。以上结果提示 LPS 增加了 HepG2 细胞脂质积聚。

2.2 LPS抑制HepG2细胞自噬流

自噬双标腺病毒 mRFP-GFP-LC3 转染细胞, 自噬溶酶体呈现为红色荧光点, 自噬体则呈现为黄色荧光点, 观察红色荧光点和黄色荧光点可反映自噬流的情况。激光共聚焦结果显示 (图 2), LPS 组相较于对照组, 黄色荧光点聚集且数量增多, 红色荧光点 (如箭头所指) 数量明显减少, 说明 LPS 组自噬体增多, 自噬溶酶体数量减少, 说明自噬流被抑制。

2.3 LPS抑制HepG2细胞内LDs与溶酶体共定位

采用 LAMP1 与 BODIPY 免疫荧光共染检测细胞内 LDs 与溶酶体共定位情况。红色荧光区域为溶酶体, 绿色荧光区域为 LDs, 箭头所指的黄色荧光区域代表溶酶体与 LDs 共定位。共聚焦显微镜结果显示 (图 3), LPS 组较对照组黄色荧光强度降低, 且统计两组红、绿荧光的共定位率显示 LPS 组共

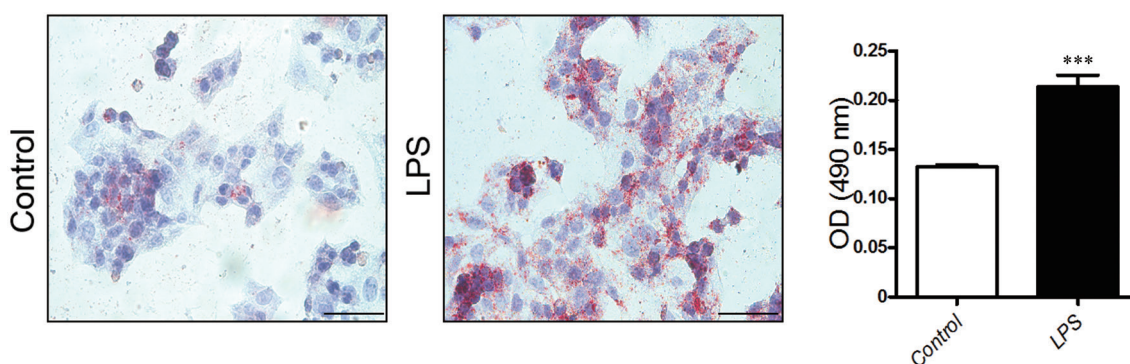


图 1. 脂多糖加重HepG2细胞脂质积聚

Fig. 1. Lipopolysaccharide (LPS) aggravates lipid accumulation in HepG2 cells. Cells were treated by 0.1 mmol/L palmitic acid (PA) for 24 h, with or without 10 μg/mL LPS. Cells with oil droplets stained by oil red O were quantified via spectrophotometry at an absorbance of 490 nm. Scale bar, 50 μm. Mean ± SD, *n* = 6, ****P* < 0.001 vs Control group.

定位率明显低于对照组 ($P < 0.05$), 说明 LPS 抑制 HepG2 细胞内 LDs 与溶酶体的共定位。

2.4 LPS 激活 mTOR 及 S6K1, 升高自噬体标志蛋白 LC3II/LC3I 比值及 P62 的表达

mTOR 是调节自噬的经典通路, 我们进一步观察了 LPS 对 mTOR 通路的影响。如图 4 所示, Western blot 结果显示, 与对照组相比, LPS 组 p-mTOR/mTOR, p-S6K1/S6K1、LC3II/LC3I 比值明显升高 ($P < 0.05$), P62 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$)。LC3II/LC3I 比值

升高说明自噬体增多, 与结果 2.2 中 LPS 抑制自噬流, 导致细胞内自噬体增多结果相符。P62 作为自噬降解底物蛋白, 其表达与自噬水平呈负相关。因此, 以上结果提示 LPS 通过激活 mTOR 通路抑制 HepG2 细胞脂质自噬。

2.5 mTOR 抑制剂 RAPA 促进 HepG2 细胞脂质自噬并减少细胞内脂质积聚

为了验证 mTOR 通路在 LPS 抑制脂质自噬中的作用, 我们进一步用 mTOR 抑制剂 RAPA 处理

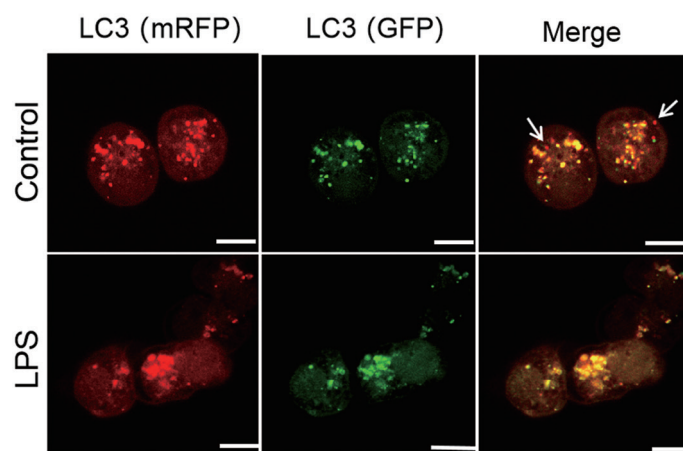


图 2. 脂多糖抑制 HepG2 细胞自噬流

Fig. 2. Lipopolysaccharide (LPS) inhibits autophagic flux in HepG2 cells. Cells were infected with mRFP-GFP-LC3 lentivirus and treated as described in Fig. 1. Cellular autophagy flux was assessed using fluorescent LC3 puncta analysis. The red dots indicated by the arrow represent autophagolysosome, and yellow dots represent autophagosome. Scale bar, 10 μm .

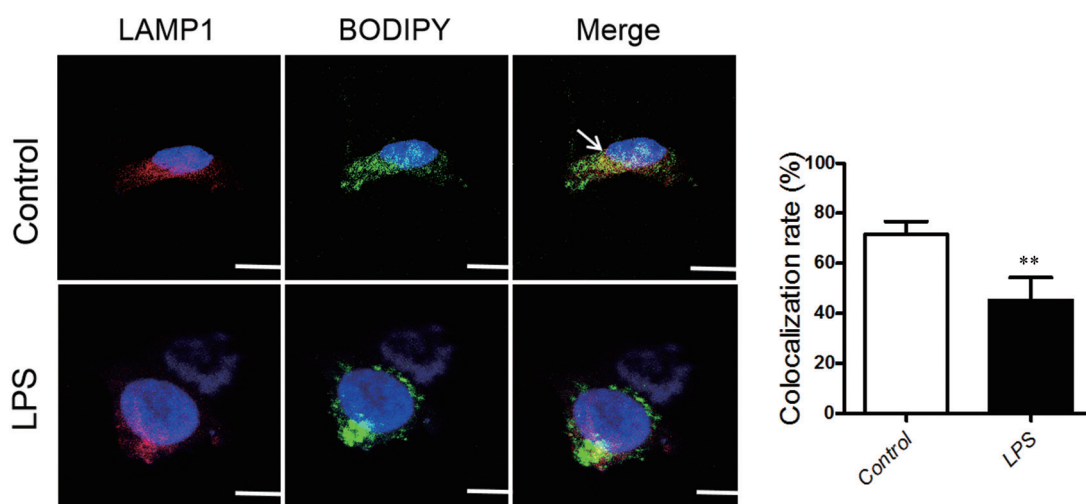


图 3. 脂多糖抑制 HepG2 细胞内脂滴与溶酶体共定位

Fig. 3. Lipopolysaccharide (LPS) inhibits the colocalization of lipid droplets (LDs) and lysosomes in HepG2 cells. Cells were treated as described in Fig. 1. Red fluorescence represents the lysosomes, green fluorescence represents the LDs, the yellow area indicated by the arrow represents the colocalization of lysosomes and LDs, and expressed as the colocalization rate of red and green fluorescence. Scale bar, 10 μm . Mean \pm SD, $n = 4$, ** $P < 0.01$ vs Control group.

细胞，自噬双标腺病毒 mRFP-GFP-LC3 转染后激光共聚焦显微镜结果显示 (图 5)：与 LPS+DMSO 组比较，LPS+RAPA 组代表自噬体的黄色荧光点减少，代表自噬溶酶体的红色荧光点 (如箭头所指) 数量增加，提示 RAPA 促进肝细胞自噬流。

同时，LAMP1/BODIPY 的免疫荧光共聚焦结果表明 (图 6)，LPS+RAPA 组相较 LPS+DMSO 组，

黄色荧光强度增加，红绿荧光共定位率明显升高 ($P < 0.05$)，提示 RAPA 增加肝细胞内 LDs 在溶酶体中定位。

与 LPS+DMSO 组相比，LPS+RAPA 细胞油红 O 染色红染 LDs 减少 (图 7)，定量结果显示细胞内脂质含量降低 ($P < 0.001$)。这些结果表明：抑制 mTOR 通路能改善 LPS 对脂质自噬的抑制并改善

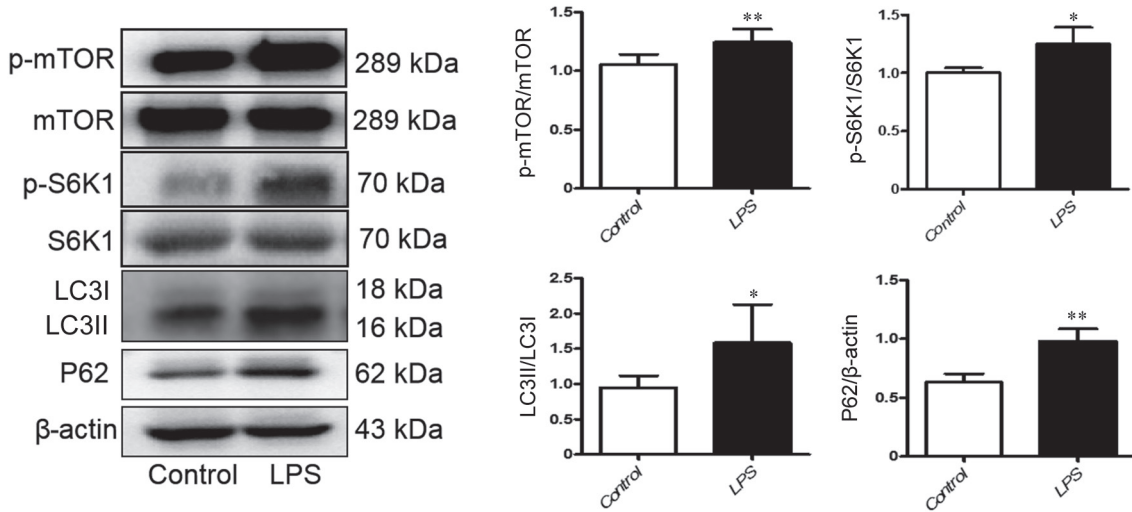


图 4. 脂多糖激活mTOR及S6K1，升高自噬体标志蛋白LC3II/LC3I比值及P62的表达

Fig. 4. Lipopolysaccharide (LPS) induces mTOR and S6K1 activation, and increases the ratio of LC3II/LC3I and the protein expression of P62. Cells were treated as described in Fig. 1. The protein expression of P62, and the ratio of p-mTOR/mTOR, p-S6K1/S6K1 or LC3II/LC3I in HepG2 cells were detected by Western blot analysis. Mean \pm SD, $n = 5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group.

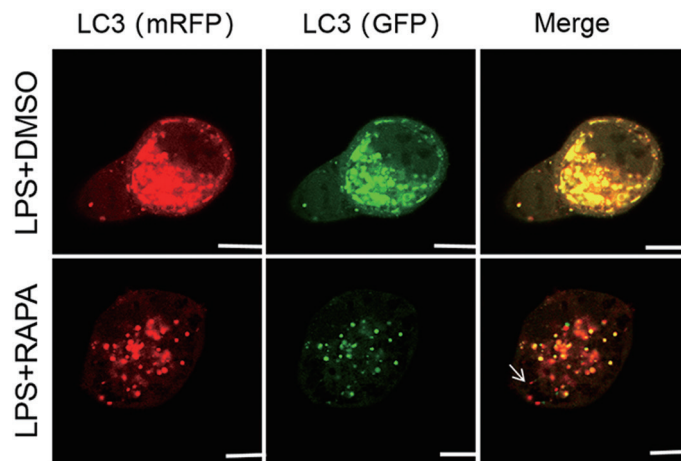


图 5. 雷帕霉素对脂多糖诱导的HepG2细胞内自噬流的影响

Fig. 5. Effects of rapamycin (RAPA) on autophagy flux in lipopolysaccharide (LPS)-induced HepG2 cells. Cells were infected with mRFP-GFP-LC3 lentivirus and treated with 10 μ g/mL LPS and 14 mmol/L DMSO or 10 μ mol/L RAPA (diluted by DMSO) for 24 h. Cellular autophagy flux was assessed using fluorescent LC3 puncta analysis. The red dots indicated by the arrows represent autophagolysosome, and yellow dots represent autophagosome. Scale bar, 10 μ m.

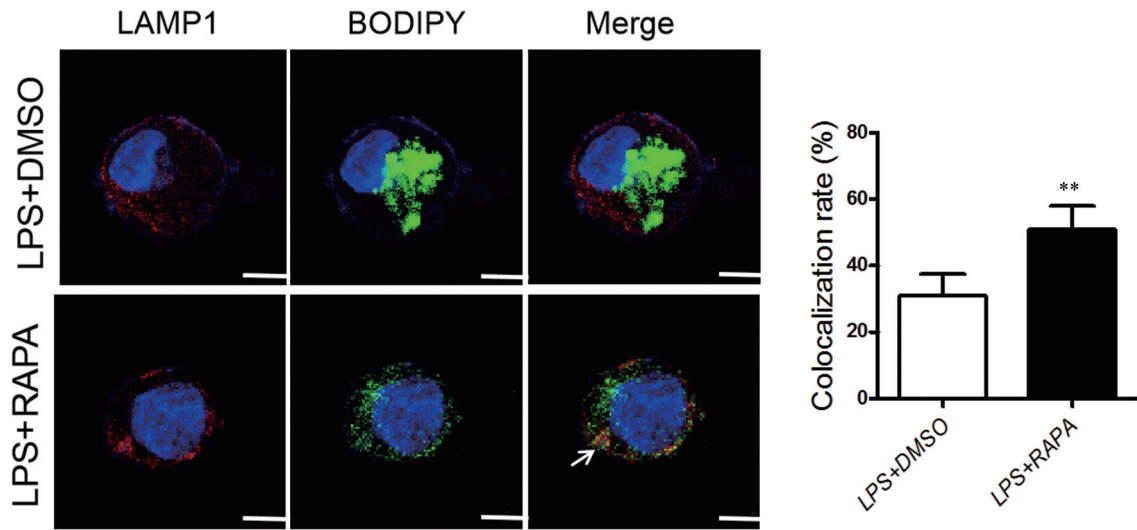


图 6. 雷帕霉素对脂多糖诱导的HepG2细胞溶酶体与脂滴共定位的影响

Fig. 6. Effects of rapamycin (RAPA) on colocalization of lipid droplets (LDs) and lysosomes in lipopolysaccharide (LPS)-induced HepG2 cells. Cells were treated as described in Fig. 5. Red fluorescence represents the lysosomes and green fluorescence represents the LDs. The area indicated by the arrow represents the colocalization of lysosomes and LDs, and expressed as the colocalization rate of red and green fluorescence. Scale bar, 10 μm . Mean \pm SD, $n = 4$, ** $P < 0.01$ vs LPS+DMSO group.

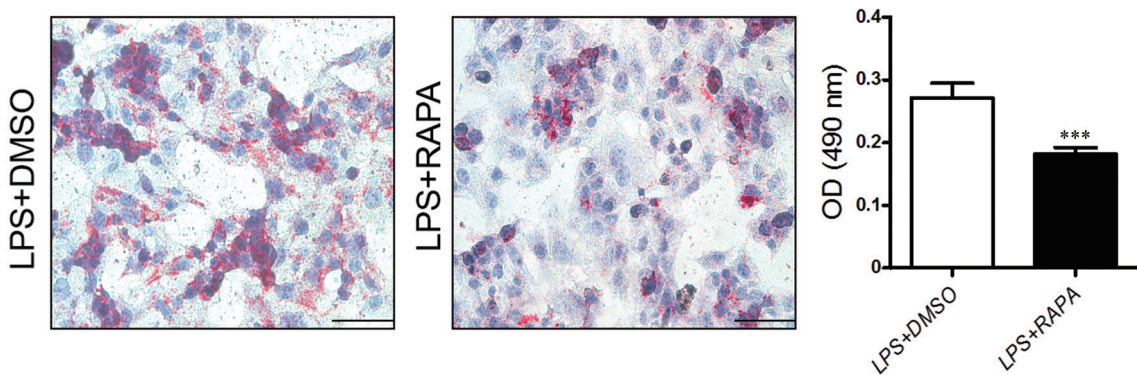


图 7. 雷帕霉素对脂多糖诱导的HepG2细胞脂质积聚的影响

Fig. 7. Effects of rapamycin (RAPA) on lipid accumulation in lipopolysaccharide (LPS)-induced HepG2 cells. Cells with oil droplets stained by oil red O were quantified via spectrophotometry at an absorbance of 490 nm. Scale bar, 50 μm . Mean \pm SD, $n = 6$, *** $P < 0.001$ vs LPS+DMSO group.

LPS 诱导的肝细胞内脂质沉积。

3 讨论

NAFLD 是在没有过量饮酒和其他刺激因素 (例如药物和病毒) 下, 早期以肝细胞脂肪变性 $> 5\%$ 为病理特征的肝脏疾病, 可发展为 NASH、肝纤维化、肝硬化、肝癌。目前 NAFLD 已经成为我国乃至全球范围内的重大公共健康问题, 据估计, 2030 年全球 15 岁以上人群中 NAFLD 的患病率将达到 33.5%。NAFLD 发病和发展的病理机制复杂, 尚未

完全阐明^[7], 被认为可能与遗传和表观遗传、饮食、胰岛素抵抗、脂肪毒性、促炎因子和肠道微生物群^[8]等多种因素有关。

研究显示, LPS 与 NAFLD 的发生与发展密切相关^[5]。长期高脂饮食会引起肠道菌群失衡, 以革兰氏阴性杆菌为主的菌群大量繁殖, 产生的 LPS 不仅能破坏肠道屏障, 还能通过损伤的肠道屏障大量进入肝脏, 通过肝实质细胞上的 TLR4 引起细胞固有免疫, 导致肝脏损伤^[9]。本研究结果显示 LPS 能引起 HepG2 细胞内 LDs 积聚。有研究报道肝细胞

中 LDs 的降解主要有胞浆脂解和脂质自噬两种途径，其中脂质自噬途径通过自噬体靶向 LDs，最终与溶酶体融合，以溶酶体中酸性脂肪酶对 LDs 进行降解^[3]。研究显示，脂质自噬异常在肝细胞 LDs 积聚中起到重要作用。自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA) 能显著增加肝细胞甘油三酯的含量，同样的，在细胞中敲除自噬基因 *ATG5* 也能增加甘油三酯含量，增加 LDs 大小和数量^[10]。在本研究中，自噬双标腺病毒 mRFP-GFP-LC3 感染细胞的荧光结果显示，LPS 处理后细胞内自噬流被抑制。同时，LAMP1/BODIPY 荧光共染的结果表明 LPS 减少了 LDs 在溶酶体中的定位，提示 LPS 能显著抑制肝细胞的脂质自噬。

mTOR 是调节自噬的重要信号通路，在细胞内形成两种复合体，分别为 mTOR 复合体 1 (mTORC1) 和复合体 2 (mTORC2)。mTOR 通路受到多种生长因子或胰岛素、氨基酸、葡萄糖等调控。mTOR 在体内以磷酸化的形式被激活，其下游可通过影响核糖体 S6 激酶 (ribosome protein subunit 6 kinase, S6K) 和真核翻译起始因子 4E (eukaryotic initiation factor 4E, eIF4E) 结合蛋白 1 的磷酸化，进而影响这两种蛋白下游与细胞生长、增殖相关蛋白的翻译来抑制自噬，也可直接磷酸化自噬相关蛋白 13 (autophagy-related protein 13, ATG13) 和 UNC-51 样激酶 1 (serine/threonine kinase UNC-51-like kinase-1, ULK1)，影响启动自噬的复合体形成，从而影响自噬的起始过程。自噬体的后续发育和成熟还受由 III 类磷酸肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K) 催化亚基 VPS34、自噬标记蛋白 Beclin1 和自噬相关蛋白 14 (autophagy-related protein 14, ATG14) 组成的复合物控制。p-mTOR 可通过促进 ATG14 的磷酸化影响自噬体成熟。核转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB) 影响溶酶体的生物发生，影响自噬溶酶体的形成，磷酸化 mTOR 能促进 TFEB 磷酸化导致其核定位减少，影响下游基因转录，抑制自噬过程^[11, 12]。LC3 是自噬体的标志蛋白，可靶向定位于溶酶体膜上，经过其同源物自噬相关蛋白 4 (autophagy-related protein 4, ATG4) 的催化下，加工成 LC3I，定位于胞浆内。LC3I 经过进一步的催化加工形成 LC3II，定位于自噬体膜，由于 LC3II 可被溶酶体内水解酶降解，所以 LC3II 不存在于晚期自噬溶酶体中。LC3II/LC3I 比值能反映细胞中自噬体的数量^[13]。P62 是一种常见的自噬蛋白，其含量与

自噬水平呈负相关^[14]。本实验结果显示：LPS 处理导致 LC3II/LC3I 比值升高并且 P62 表达增加，结合前面对自噬流检测的结果来看，LPS 对前期自噬小体的生成影响不明显，主要是影响了后期自噬小体与溶酶体的结合，导致了自噬小体在细胞中的积累，引起 LC3II 水平增高。而 P62 表达增加说明 LPS 抑制了细胞自噬水平。mTOR 及其下游的 S6K1 磷酸化的增加说明了 LPS 通过 mTOR 信号通路抑制自噬，接下来我们在 LPS 负荷的基础上加入 mTOR 抑制剂 RAPA 处理细胞，结果显示 RAPA 后能够逆转 LPS 造成的 HepG2 细胞脂质积聚增加，并且细胞内自噬溶酶体数量增多，LDs 与溶酶体共定位增加。既往有研究报道 LPS 可以激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路，MAPK 下游可以增加 mTOR 磷酸化水平，抑制自噬^[15, 16]，推测本研究中 LPS 对 mTOR 的激活从而抑制自噬可能通过类似通路调节，有待进一步验证。

综上所述，本研究表明 LPS 能激活 mTOR 从而抑制肝细胞脂质自噬，进而促进肝细胞脂质积聚。同时，mTOR 信号通路抑制剂 RAPA 可以改善 LPS 诱导的脂质自噬异常，减轻肝细胞脂质积聚，提示其可能在 NAFLD 防治中有一定潜在应用前景。

参考文献

- 1 Qin YE, Duan L, He Y, Yuan C, Wang T, Yuan D, Zhang C, Liu C. Saturated fatty acids promote hepatocytic senescence through negative regulation of miR-34a/cyclin-dependent kinase 6. *Mol Nutr Food Res* 2020; e2000383.
- 2 Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013; 10(6): 330–344.
- 3 Schott MB, Weller SG, Schulze RJ, Krueger EW, Drizyte-Miller K, Casey CA, McNiven MA. Lipid droplet size directs lipolysis and lipophagy catabolism in hepatocytes. *J Cell Biol* 2019; 218(10): 3320–3335.
- 4 Christian P, Sacco J, Adeli K. Autophagy: Emerging roles in lipid homeostasis and metabolic control. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831(4): 819–824.
- 5 Ceccarelli S, Panera N, Mina M, Gnani D, De Stefanis C, Crudele A, Rychlicki C, Petrini S, Bruscalupi G, Agostinelli L, Stronati L, Cucchiara S, Musso G, Furlanello C, Svegliati-Baroni G, Nobili V, Alisi A. LPS-induced TNF- α factor mediates pro-inflammatory and pro-fibrogenic pattern in non-alcoholic fatty liver disease. *Oncotarget* 2015; 6(39):

- 41434–41452.
- 6 Carpino G, Del Ben M, Pastori D, Carnevale R, Baratta F, Overi D, Francis H, Cardinale V, Onori P, Safarikia S, Cammisotto V, Alvaro D, Svegliati-Baroni G, Angelico F, Gaudio E, Violi F. Increased liver localization of lipopolysaccharides in human and experimental NAFLD. *Hepatology* 2020; 72(2): 470–485.
 - 7 Estes C, Razavi H, Loomba R, Younossi Z, Sanyal AJ. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* 2018; 67(1): 123–133.
 - 8 Di Sessa A, Cirillo G, Guarino S, Marzuillo P, Miraglia Del Giudice E. Pediatric non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives on diagnosis and management. *Pediatric Health Med Ther* 2019; 10: 89–97.
 - 9 Fei N, Bruneau A, Zhang X, Wang R, Wang J, Rabot S, Gérard P, Zhao L. Endotoxin producers overgrowing in human gut microbiota as the causative agents for nonalcoholic fatty liver disease. *mBio* 2020; 11(1): e03263-19.
 - 10 Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009; 458(7242): 1131–1135.
 - 11 Shi B, Ma M, Zheng Y, Pan Y, Lin X. mTOR and Beclin1: Two key autophagy-related molecules and their roles in myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Cell Physiol* 2019; 234(8): 12562–12568.
 - 12 Odle RI, Walker SA, Oxley D, Kidger AM, Balmanno K, Gilley R, Okkenhaug H, Florey O, Ktistakis NT, Cook SJ. An mTORC1-to-CDK1 switch maintains autophagy suppression during mitosis. *Mol Cell* 2020; 77(2): 228–240. e7.
 - 13 Bergamini E, Cavallini G, Donati A, Gori Z. The anti-ageing effects of caloric restriction may involve stimulation of macroautophagy and lysosomal degradation, and can be intensified pharmacologically. *Biomed Pharmacother* 2003; 57(5–6): 203–208.
 - 14 Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays Biochem* 2017; 61(6): 609–624.
 - 15 Ren Q, Guo F, Tao S, Huang R, Ma L, Fu P. Flavonoid fisetin alleviates kidney inflammation and apoptosis via inhibiting Src-mediated NF- κ B p65 and MAPK signaling pathways in septic AKI mice. *Biomed Pharmacother* 2020; 122: 109772.
 - 16 Ba L, Gao J, Chen Y, Qi H, Dong C, Pan H, Zhang Q, Shi P, Song C, Guan X, Cao Y, Sun H. Allicin attenuates pathological cardiac hypertrophy by inhibiting autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK/mTOR signaling pathways. *Phytomedicine* 2019; 58: 152765.