

研究论文

S100钙结合蛋白A16通过内质网应激促进HepG2细胞脂肪合成

阚敬保¹, 沈歌前¹, 杨洁¹, 童佩¹, 张日华¹, 梁秀斌², 苏东明², 李东³, 刘云^{1,*}

南京医科大学¹第一附属医院老年医学科; ²代谢病研究中心, 南京 210029; ³南京中医药大学附属江苏省中医院整形外科, 南京 210029

摘要: 本研究旨在探讨S100钙结合蛋白A16 (S100 calcium binding protein A16, S100A16)在肝细胞脂质代谢中的作用及可能的生物学机制。用脂肪酸培养HepG2细胞(人肝癌细胞系)以建立脂肪酸培养模型, 对照模型不加脂肪酸培养, 每一模型分成3组细胞, 分别用*S100a16*过表达质粒、shRNA质粒、Vector质粒转染。用试剂盒检测细胞甘油三酯浓度, 用油红O染色观察脂滴聚集情况, 用免疫沉淀和质谱分析寻找和S100A16相互作用的兴趣蛋白, 并用免疫共沉淀验证, 用Western blot和qRT-PCR进行相关机制研究。结果显示, 和对照模型相比, 脂肪酸培养模型细胞内脂肪和甘油三酯浓度显著增加。*S100a16*过表达组细胞内脂肪积累显著高于Vector质粒转染组。热休克蛋白A5 (heat shock protein A5, HSPA5)与S100A16之间存在相互作用。*S100a16*过表达可上调内质网应激的HSPA5/肌醇依赖酶1 α -X结合蛋白1 (inositol-requiring enzyme 1 α -X binding protein 1, IRE1 α -XBP1)通路相关蛋白(HSPA5、IRE1 α 和pIRE1 α)表达水平, 并上调脂肪合成相关基因*Srebp1c*、*Acc*和*Fas* mRNA表达水平, 而转染*S100A16* shRNA质粒可使上述蛋白和mRNA水平低于Vector质粒转染组。以上结果提示, S100A16可能通过内质网应激HSPA5/IRE1 α -XBP1通路促进HepG2细胞脂质合成。

关键词: S100A16; 脂代谢; HSPA5; 内质网应激

中图分类号: R33

S100 calcium binding protein A16 promotes fat synthesis through endoplasmic reticulum stress in HepG2 cells

KAN Jing-Bao¹, SHEN Ge-Qian¹, YANG Jie¹, TONG Pei¹, ZHANG Ri-Hua¹, LIANG Xiu-Bin², SU Dong-Ming², LI Dong³, LIU Yun^{1,*}

¹Department of Geratology, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; ²The Center of Metabolic Disease Research, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; ³Department of Orthopedics, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the role of S100 calcium binding protein A16 (S100A16) in lipid metabolism in hepatocytes and its possible biological mechanism. HepG2 cells (human hepatoma cell line) were cultured with fatty acid to establish fatty acid culture model. The control model was cultured without fatty acid. Each model was divided into three groups and transfected with *S100a16* over-expression, shRNA and vector plasmids, respectively. The concentration of triglyceride (TG) in the cells was measured by kit, and the lipid droplets was observed by oil red O staining. Immunoprecipitation and mass spectrometry were used to find the interesting proteins interacting with S100A16, and the interaction was verified by immunoprecipitation. The further mechanism was studied by Western blot and qRT-PCR. The results showed that the intracellular lipid droplet and TG concentrations in the fatty acid culture model were significantly higher than those in the control model. The accumulation of intracellular fat in the *S100a16*

Received 2018-10-15 Accepted 2018-11-14

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81600001BJ6), the Jiangsu Province's Key Provincial Talents Program (No. ZDRCA2016005), the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20141026 DA14), and the Jiangsu Science & Technology Program, China (No. BE2016002-4).

*Corresponding author. Tel: +86-25-83714511; E-mail: liuyun@njmu.edu.cn

over-expression group was significantly higher than that in the vector plasmid transfection group. There was an interaction between heat shock protein A5 (HSPA5) and S100A16. Over-expression of S100A16 up-regulated protein expression levels of HSPA5, inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) and pIRE1 α , which belong to endoplasmic reticulum stress HSPA5/IRE1 α -XBP1 pathway. Meanwhile, over-expression of S100A16 up-regulated the mRNA expression levels of adipose synthesis-related gene *Srebp1c*, *Acc* and *Fas*. In the *S100a16* shRNA plasmid transfection group, the above-mentioned protein and mRNA levels were lower than those of vector plasmid transfection group. These results suggest that S100A16 may promote lipid synthesis in HepG2 cells through endoplasmic reticulum stress HSPA5/IRE1 α -XBP1 pathway.

Key words: S100A16; lipid metabolism; HSPA5; endoplasmic reticulum stress

1965年, Moore首次发现S100蛋白^[1], S100家族是一类分子量较小的酸性钙结合蛋白, 因其能溶于100%饱和的中性硫酸铵中而得名, 此后S100家族中先后有25个成员被发现, S100钙结合蛋白A16 (S100 calcium binding protein A16, S100A16)是第二十个被发现的S100家族成员, 在人体各组织器官中广泛表达, S100A16是EF手型Ca²⁺结合蛋白的成员^[2], S100A16的功能尚不完全清楚, 从已知数据来看, S100A16的异常表达常常出现在各种肿瘤疾病中^[3-5]。本课题组前期研究显示, S100A16可降低前体脂肪细胞3T3-L1对胰岛素的敏感性, S100A16的过度表达可促进前脂肪细胞3T3-L1中脂质合成和抑制胰岛素刺激下的葡萄糖摄取, 并引起胰岛素抵抗, S100A16在3T3-L1细胞的过度表达促进了3T3-L1的增殖和分化^[6]。另外, 本课题组前期研究显示, S100A16还可以诱导骨髓间充质干细胞分化为脂肪细胞, 并通过增加PPAR γ 转录来刺激脂肪细胞脂质合成^[7]。另一项研究也显示, 雌激素通过抑制S100A16的表达来抑制脂肪生成^[8]。因此, 我们推测S100A16是一个全新的脂代谢调节因子, 可能参与调节肝细胞脂代谢。非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种全球流行的非传染性脂代谢疾病, 目前尚无良好的治疗方法, 而上文所提的研究提示S100A16对糖脂代谢具有调节作用, S100A16表达改变与糖脂代谢紊乱有关。因此, S100A16有可能成为代谢类疾病的生物标志物和治疗靶标, 而肝脏是体内的代谢中心, S100A16可能在NAFLD的发生、发展过程中发挥重要作用。在本研究中, 我们寻找与S100A16可能有互相作用的蛋白, 再用各种生物学方法通过这些蛋白探索S100A16调节肝细胞脂代谢的机制, 从而研究S100A16在肝细胞脂代谢中的作用, 这将有助于进一步了解肝细胞脂代谢以及NAFLD的发病机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养、质粒转染、脂肪酸培养细胞模型的构建

实验对象为人肝癌细胞系HepG2细胞(南京医科大学病理学系苏东明教授馈赠), 用含10%胎牛血清(Gibco, 美国)的低糖DMEM培养基(Gibco, 美国)培养细胞。*S100a16* shRNA质粒、*S100a16*过表达质粒和Vector对照质粒来自本课题组, 序列信息见相关文献^[6, 7]。在6孔板内进行细胞培养。质粒转染方法为: 接种细胞, 培养细胞生长至70%~90%孔板底部面积时转染; 在Opti-MEM (Gibco, 美国)培养基中加入5 μ L Lipofectamine[®] 3000 (Thermo Scientific[™], 美国)试剂、质粒2 μ g和P3000[™] (Thermo Scientific[™], 美国)试剂, 37 $^{\circ}$ C孵育细胞2 d。质粒转染效率的鉴定: 细胞转染24 h后置于荧光显微镜 (IX51+DP72, Olympus, 日本)下观察HepG2细胞绿色荧光表达强度并拍照, 质粒转染效率 = 每高倍镜视野发出绿色荧光的细胞数 / 同一视野可见光下的总细胞数 \times 100%。细胞转染48 h后提取细胞RNA和蛋白, 用实时荧光定量PCR测定*S100A16* mRNA的表达情况, 用Western blot法测定S100A16蛋白的表达情况。在质粒转染后立即使用0.6 mmol/L油酸 (oleic acid, OA) 和0.3 mmol/L棕榈酸 (palmitic acid, PA) 培养细胞, 建立脂肪酸培养细胞模型^[9]; 另外设置非脂肪酸培养细胞模型, 作为脂肪酸培养细胞模型的对照 (Control)。每个模型分别含有3组, 分别是*S100a16* shRNA组、过表达组和Vector组。培养48 h后, 每组细胞取一部分提取蛋白质和mRNA, 取另一部分进行油红O染色。

1.2 油红O染色与细胞甘油三酯 (triglyceride, TG) 浓度检测

用于染色的细胞在其接种时进行细胞定量, 将细胞吹打均匀, 吸取同样体积的细胞悬液进行接种, 确保接种细胞数量相同、分布均匀, 染色时每一步骤完全相同, 当实验时间不一致时, 接

种两个平行孔, 一个用于油红 O 染色, 一个用于细胞计数, 观测染色结果时, 用细胞计数标准化观测结果, 再进行统计分析。细胞培养结束后, 弃细胞培养液, 用 PBS 清洗两次, 进行油红 O (南京建成生物工程技术有限公司) 染色, 染色结果通过 Image J 软件进行分析。

细胞 TG 浓度检测: 弃细胞培养液, 用 PBS 清洗两次, 六孔板每孔添加 100 μ L 的裂解液 (组织 TG 测定试剂盒 E1013, 北京普利莱基因技术有限公司), 然后置冰上 10 min, 用细胞刮刮下细胞并收集裂解液, 70 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 2 000 r/min 室温下离心 5 min, 取上清液, 在酶标仪中 (ELX800, Biotech, 美国) 检测 OD 值后计算上清液 TG 浓度。

1.3 免疫沉淀和质谱分析 将冰预冷的裂解液 [含有 PMSF 的 200~400 μ L NP-40 (P0013F, 碧云天)] 加入到长满细胞的 10 cm 培养皿中, 10 min 后将细胞刮下, 4 $^{\circ}$ C 下缓慢摇晃 15 min, 4 $^{\circ}$ C 14 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, BCA 方法测量其蛋白质浓度。其次, 将 100 μ L 蛋白 A 琼脂糖珠 (88846, Thermo ScientificTM, 美国) 加入 1 mL 总蛋白中, 4 $^{\circ}$ C 摇动 10 min 除去非特异性杂合蛋白并减少背景, 4 $^{\circ}$ C 14 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 将总蛋白浓度稀释至 1 μ g/ μ L, 向 500 μ L 总蛋白中加入 10 μ L 兔抗大鼠 S100A16 抗体 (ab130419, Abcam, 英国), 4 $^{\circ}$ C 下将抗原-抗体混合物摇动过夜; 加入 100 μ L 蛋白 A, 将抗原-抗体混合物在 4 $^{\circ}$ C 下轻轻摇动 6 h; 以 14 000 r/min 离心 5 s, 弃上清液, 收集琼脂糖珠-抗原复合物; 用预冷的裂解液洗涤 3 次; 用 60 μ L 裂解液悬浮琼脂糖珠-抗原抗体复合物, 95 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 收集上清液, 委托南京医科大学分析测试中心采用飞行时间质谱仪 (ABSciex Triple-TOF[®] 5600+, 美国) 进行蛋白质质谱分析。在质谱分析结果中挑选兴趣蛋白, 将其与 S100A16 进行免疫共沉淀分析, 实验步骤与用抗 S100A16 抗体进行的免疫沉淀相同, 琼脂糖珠-抗原抗体复合物用 60 μ L 2 \times 上样缓冲液悬浮, 95 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 收集上清液用于 Western blot 分析。

1.4 Western blot 细胞加入 RIPA 裂解液 (P0013B, 碧云天) 和 PMSF (P1005, 碧云天), 置冰上 10 min 后, 用细胞刮收集细胞裂解物, 12 000 r/min 离心获得上清。用 BCA 法检测上清蛋白的浓度后, 95 $^{\circ}$ C 10 min 充分变性。用 8%~15% SDS-PAGE 行蛋白质

电泳, 然后转移到 PVDF (Millipore, 美国); 将 PVDF 膜用 5% BSA (V900933, Sigma, 美国) 在室温下在摇床上封闭 1~2 h, 然后在 4 $^{\circ}$ C 下与一抗孵育过夜, TBST 洗涤 10 min \times 3 后, 在摇床上室温下与辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (A0208, 碧云天, 1:1 000) 孵育 1.5 h, 然后用 TBST 洗涤 PVDF 膜 15 min \times 3, 最后添加 ECL (70-U1423, 联科生物) 试剂, 进行曝光显影。免疫印迹法所需的主要抗体包括抗 S100A16 抗体 (ab130419, Abcam, 英国, 1:250)、抗 β -actin 抗体 (HP-60008, Proteintech, 美国, 1:2 000)、抗热休克蛋白 A5 (heat shock protein A5, HSPA5) 抗体 (sc-376768, Santa Cruz, 美国, 1:500)、抗肌醇依赖酶 1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α) 抗体 (sc-390960, Santa Cruz, 美国, 1:500) 和抗 X 结合蛋白 1 (X binding protein 1, XBP1) 抗体 (sc-8015, Santa Cruz, 美国, 1:500)。

1.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 通过 TRIzol 方法提取细胞总 RNA 并逆转录成 cDNA。将 cDNA 稀释 10 倍并进行 qRT-PCR 实验 (Step One Plus 实时定量 PCR 仪, ABI, 美国), 采用 20 μ L 系统: SYBR GREEN (04913914001, Roche, 瑞士) 10 μ L, 正向和反向引物 1 μ L, cDNA 2 μ L, DEPC 水 6 μ L, 低光照操作, 每个样品设 3 个副孔, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 40 个循环; 熔解曲线: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s。以 GAPDH 为内参, 计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。实验中使用的引物: *Srebp1c*: F: 5'-ACAGT-GACTTCCCTGGCCTAT-3', R: 5'-GCATGGACGG-GTACATCTTCAA-3'; *Acc*: F: 5'-GAGGGCTAG-GTCTTTCTGGAAG-3, R: 5'-CCACAGTGAAATC-TCGTTGAGA-3'; *Fas*: F: 5'-CCACCTTAGAT-CCCCGGTCAT-3', R: 5'-GTGGGAGGCTGACTACAAACA-3'; *Gapdh*: F: 5'-GGAGCGAGATCCC-TCCAAAAT-3', R: 5'-GGCTGTTGTCATA-CTTCTCATGG-3'; *S100a16*: F: 5'-ATGTCAGACTGCTACACGGAG-3', R: 5'-GTTCTTGACCAGGC-TGTACTION-3'。

1.6 统计学分析 数据以 mean \pm SD 表示, 采用 SPSS 19.0 进行统计检验分析, 两组间比较用 Student's *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 时认为是差异具有显著性。

2 结果

2.1 *S100a16*质粒成功转染至HepG2细胞

S100a16 过表达、shRNA 和 Vector 质粒转染至 HepG2 细胞后 24 h, 于荧光显微镜下观察细胞绿色荧光表达强度并拍照 (图 1A), 同时计数同一视野可见光下的总细胞数, 结果显示, 质粒转染效率分别为 $88.3\% \pm 7.9\%$ 、 $86.5\% \pm 8.6\%$ 、 $88.5\% \pm 9.4\%$; qRT-PCR 结果显示, 过表达质粒组 *S100a16* mRNA 表达水平显著高于 Vector 质粒组, 而 Vector 质粒组明显高于 shRNA 组 (图 1B), 各组 S100A16 蛋白的表达情况同 mRNA (图 1C)。

2.2 *S100A16*促进HepG2细胞脂质合成

油红 O 染色结果显示, 与对照模型各相应组相比, 脂肪酸培养细胞模型各组的脂滴计数和面积均显著增加 (图 2、表 1); 无论在脂肪酸培养细胞模型还是对照模型中, 同一模型的 *S100a16* 过表达组细胞中的脂滴计数和面积最多, 其次 Vector 组, 最少的是 *S100a16* shRNA 组 (图 2、表 1)。

细胞中 TG 浓度结果显示, 与对照模型各相应组相比, 脂肪酸培养细胞模型各组 TG 均显著增加 (表 1); 无论在脂肪酸培养细胞模型还是对照模型中, 同一模型的 *S100a16* 过表达组细胞中 TG 浓

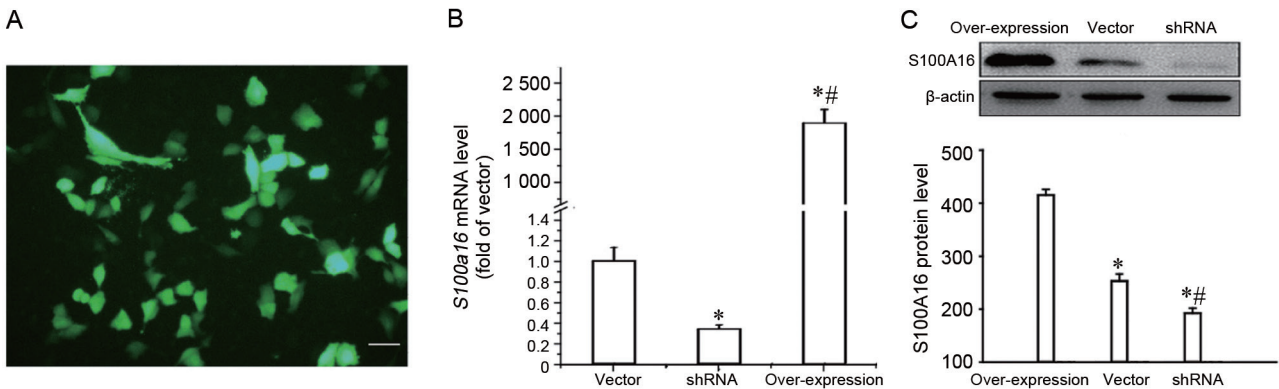


图 1. 各组HepG2细胞S100A16表达情况

Fig. 1. *S100A16* expression in HepG2 cells of different groups. A: Representative picture of cellular immunofluorescence after transfection of *S100a16* overexpression plasmid for 24 h. The positive cells were stained green. Scale bar, 20 μ m. B: *S100a16* mRNA expression level detected by qRT-PCR. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.01$ vs Vector group; # $P < 0.01$ vs shRNA group. C: Protein expression level of S100A16 detected by Western blot. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.01$ vs Overexpression group; # $P < 0.01$ vs Vector group.

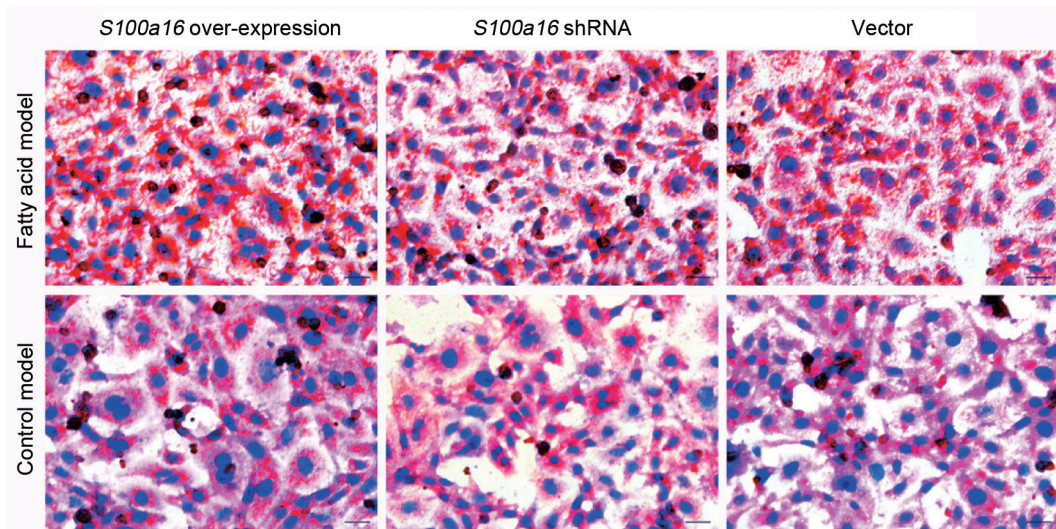


图 2. *S100A16*对HepG2细胞脂质合成的作用

Fig. 2. Effect of *S100A16* on lipid synthesis in HepG2 cells detected by oil red O staining. Scale bar, 20 μ m.

度最高, 其次 Vector 组, 最少的是 *S100a16* shRNA 组 (表 1)。

2.3 S100A16与HSPA5之间存在互相作用

用 S100A16 抗体进行免疫沉淀, 由于 S100A16 蛋白被 S100A16 抗体富集起来, 那些跟 S100A16 结合在一起的蛋白, 也一起被富集并沉淀, 然后利用质谱仪对这些富集、沉淀下来的蛋白质进行质谱分析, 结果显示 HSPA5 被 S100A16 抗体富集并沉淀下来 (图 3A、B 分别是 HSPA5 和 S100A16 的质谱

图)。HSPA5 是内质网应激途径重要蛋白, HSPA5 和 S100A16 之间的免疫共沉淀结果显示, 在自然状态的 HepG2 细胞中, S100A16 与 HSPA5 之间存在相互作用 (图 3C)。

2.4 S100A16调节内质网应激的HSPA5/IRE1α-XBP1通路活性, 促进脂肪合成相关基因的表达

Western blot 结果显示, 和对照模型相比, 在脂肪酸培养模型相应各组 HSPA5、IRE1α 和 pIRE1α 蛋白表达水平均上调。脂肪酸培养模型各组 HSPA5

表1. 各组HepG2细胞油红O染色结果和甘油三酯(TG)浓度

Table 1. Oil red O staining results and cellular triglyceride (TG) concentration in different groups

	Vector		<i>S100a16</i> shRNA		<i>S100a16</i> over-expression		
	Control	OA+PA	Control	OA+PA	Control	OA+PA	
Lipid droplet	Count	2 110.7 ± 72.8	3 401.7 ± 123.8	1 791.0 ± 46.1*	2 988.3 ± 87.3*	2 645.7 ± 131.2 ^{###} *	3 895.3 ± 56.4 ^{###} *
	Area fraction	21.6 ± 3.4	36.9 ± 3.9	15.5 ± 4.1*	32.1 ± 3.4*	28.6 ± 2.4 ^{###} *	44.4 ± 4.3 ^{###} *
TG (mmol/L)	0.36 ± 0.03	0.61 ± 0.04	0.30 ± 0.03*	0.52 ± 0.04*	0.43 ± 0.03 [#] *	0.83 ± 0.03 ^{###} *	

Mean ± SD, n = 3. Compared with the corresponding groups of the control model, every group of the fatty acid culture model showed increased lipid drop count, area fraction and cellular triglyceride (TG) concentration (all P < 0.05). *P < 0.05, **P < 0.01 vs vector group of the same culture model; #P < 0.05, ###P < 0.01 vs shRNA group of the same culture model. OA: oleic acid; PA: palmitic acid.

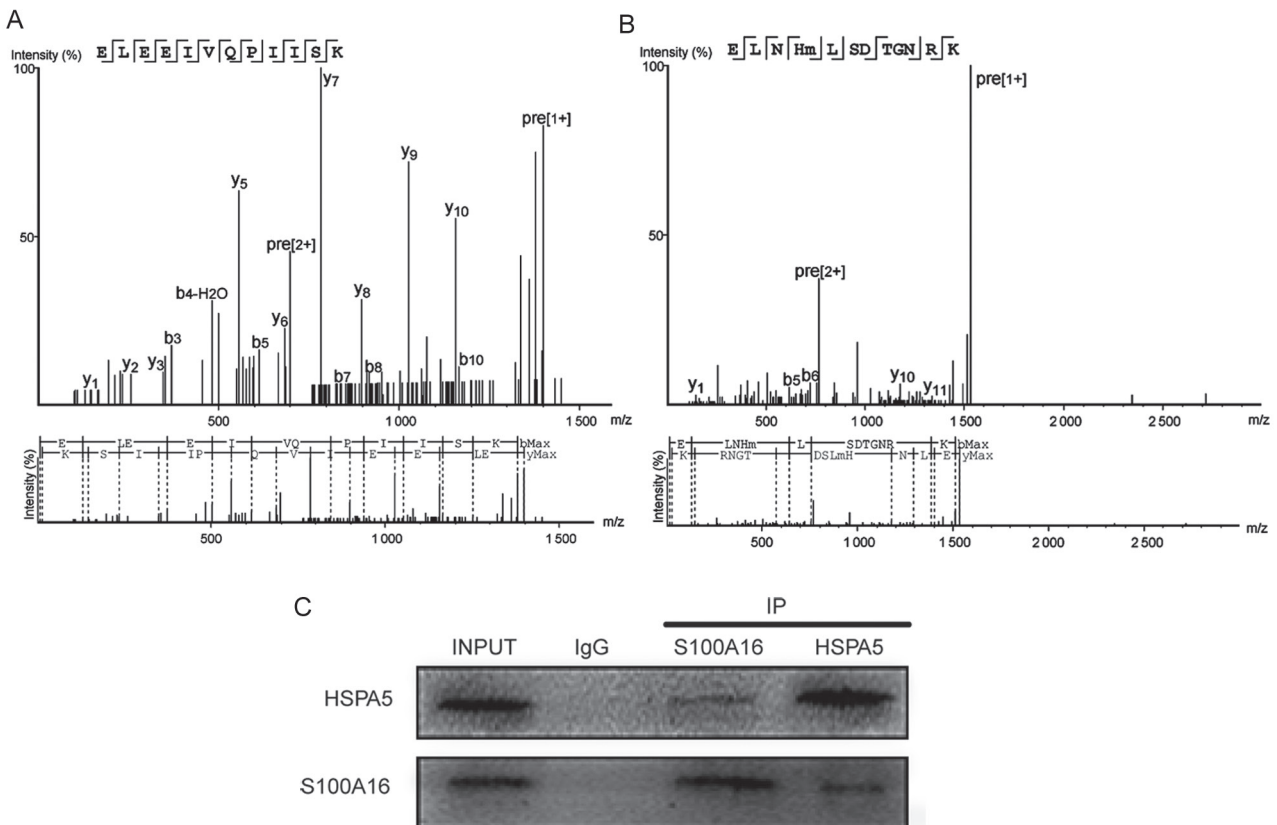


图 3. S100A16与热休克蛋白A5 (HSPA5)之间存在互相作用

Fig. 3. Interaction between S100A16 and heat shock protein A5 (HSPA5). A: HSPA5 mass spectrum. B: S100A16 mass spectrum. Immunoprecipitation with S100A16 antibody following protein mass spectrometry revealed that HSPA5 was precipitated by S100A16 antibody. C: Co-immunoprecipitation result.

的表达之间无明显区别, 对照模型各组之间也是如此; 而在脂肪酸培养模型各组间, IRE1 α 和 pIRE1 α 的表达量大小顺序均为 *S100a16* 过表达组 > Vector 组 > *S100a16* shRNA 组, 在对照模型中, 虽然各组表达量均较低, 但大小顺序和脂肪酸培养模型相应各组一致; 就 XBP1u 和 XBP1s 而言, 在脂肪酸干预模型和对照模型各组中, 其表达量的变化趋势和 IRE1 α 相同 (图 4)。

qRT-PCR 结果显示, HepG2 细胞 *Srebp1c*、*Acc* 和 *Fas* mRNA 表达水平, 无论在脂肪酸培养模型还是对照模型内, 和 Vector 组比较, 在 *S100a16* 过表达组中明显增高, 在 *S100a16* shRNA 转染组中显著降低。脂肪酸模型各组的 *Srebp1c*、*Acc* 和 *Fas* mRNA 表达水平显著高于对照模型相应各组 (图 5)。

3 讨论

目前对 S100A16 的研究较少, 对其功能仍有许多盲区, 在机体中的作用没有引起足够重视, 本研究试图探讨 S100A16 在肝细胞中的作用, 在实验中, 我们观察到, 无论是对照组还是模型组, *S100a16* 过表达 HepG2 细胞的脂滴数明显增多, 而 *S100a16* shRNA 细胞的脂滴数减少; 定量分析结果显示, 模型组脂滴面积分数均高于对照组; 检测细胞中 TG 的浓度, 发现模型组细胞中 TG 的浓度均高于对照组, 且在相同培养模式下, *S100a16* 过表达组细胞中 TG 的浓度高于 Vector 组, Vector 组细胞中 TG 的浓度高于 *S100a16* shRNA 组。这些结果说明 S100A16 对脂肪酸合成有重要影响, S100A16 浓度越高, 脂肪酸合成越多, 当脂肪酸供应充足时, 细胞内脂肪合成显著增加。

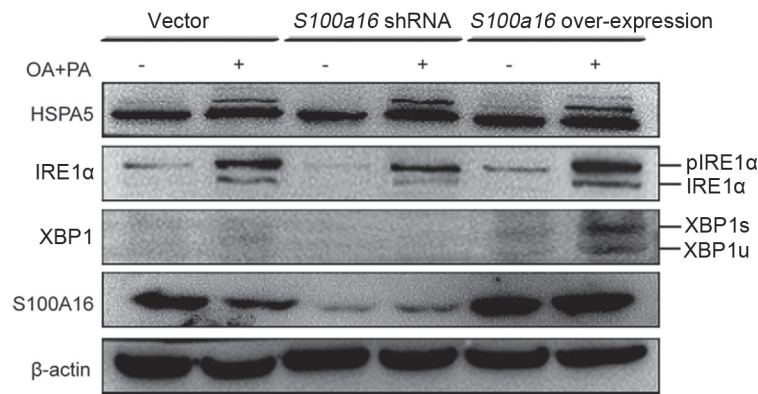


图 4. S100A16 对内质网应激热休克蛋白 A5 (HSPA5)/肌醇依赖酶 1 α -X 结合蛋白 1 (IRE1 α -XBP1) 通路蛋白表达的作用

Fig. 4. Effects of S100A16 on endoplasmic reticulum stress heat shock protein A5 (HSPA5)/inositol-requiring enzyme 1 α -X binding protein 1 (IRE1 α -XBP1) pathway related protein expression levels detected by Western blot.

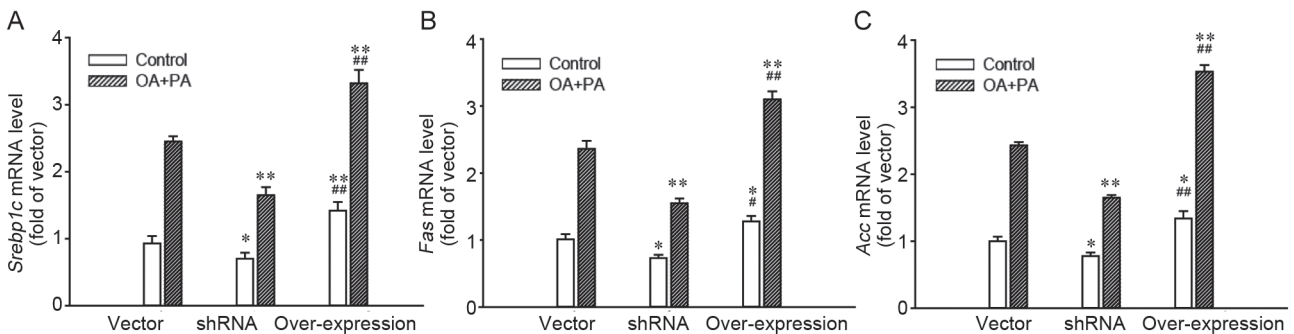


图 5. S100A16 促进脂肪合成相关基因的表达

Fig. 5. S100A16 promotes expression of genes involved in fat synthesis. A: *Srebp1c* mRNA expression; B: *Fas* mRNA expression; C: *Acc* mRNA expression. Compared with the corresponding groups of the control model, every group of the fatty acid culture model showed increased *Srebp1c*, *Acc*, and *Fas* mRNA expression levels (all $P < 0.05$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Vector group of the same culture model. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs shRNA group of the same culture model.

为了解 S100A16 对脂肪合成的作用机制, 我们试图找到与 S100A16 相互作用的蛋白, 为此, 用 S100A16 抗体进行免疫沉淀, 对沉淀下来的蛋白质进行质谱分析, 从细胞复苏、培养到提取细胞蛋白, 整个实验过程没有任何干预措施, 结果观察到 HSPA5 被 S100A16 抗体富集并沉淀下来, 并经过免疫共沉淀实验验证, 显示 HSPA5 和 S100A16 在自然状态下相互作用, 而 HSPA5 是内质网应激的核心功能蛋白, 因此我们认为, S100A16 可能对内质网应激产生重要作用, 从而最终影响脂肪酸合成。

HSPA5/IRE1 α -XBP1 通路是内质网应激性肝脂肪变性的重要途径, 敲除 HSPA5 基因可诱发小鼠肝脂肪变性和肝脏损伤^[10]。而 HSPA5 和 IRE1 α 则与内质网状膜结合, 形成稳定的状态。高脂饮食诱导的内质网应激导致 HSPA5 和 IRE1 α 分离, 并由此产生生物学效应: 正常情况下内质网应激导致 HSPA5 和 IRE1 α 分离, IRE1 α 自磷酸化为 pIRE1 α 而被激活, 并且暴露核糖核酸内切酶位点, pIRE1 α 执行一个非常规的 RNA 剪接活动, 从非剪切型 XBP1 (XBP1u) mRNA 中剪去内含子使之成为 XBP1s mRNA, 剪接后的 mRNA 发生翻译框移, 最终翻译成剪切型 XBP1 (XBP1s), 最终翻译成 XBP1s 蛋白, XBP1s 蛋白具有广泛的转录活性, 是多个脂肪合成相关基因的转录因子, 促进脂质合成^[11]。当 XBP1s 蛋白显著降低的时候, 血清 TG 浓度下降^[12-15]。

本研究结果显示, 无论在脂肪酸培养细胞模型还是在对照模型中, S100a16 过表达组细胞中的脂滴最多, 其次 Vector 组, 最少的是 S100a16 shRNA 组, 而这种变化和 HSPA5、IRE1 α /pIRE1 α 和 XBP1u/XBP1s 的表达变化完全一致, 并且脂肪合成相关基因 *Srebp1c*、*Acc* 和 *Fas* mRNA 表达变化也是如此, 说明细胞脂肪合成和内质网应激 HSPA5/IRE1 α -XBP1 通路相关, 而影响这条通路蛋白表达变化的原因是 S100A16 表达水平的变化。当 S100A16 高表达时, 它与 HSPA5 结合较多, 导致 HSPA5 与 IRE1 α 分离增加, pIRE1 α 增多, XBP1s 表达增多, 产生生物学效应, 脂肪合成基因表达增加, 脂肪合成增多; 反之, 当 S100A16 表达减少的时候, 它与 HSPA5 结合减少, HSPA5 与 IRE1 α 不易分离, pIRE1 α 减少, XBP1s 表达减少, 脂肪合成基因表达下降, 脂肪合成减少。

综上所述, 本研究结果提示, S100A16 可能通过内质网应激 HSPA5/IRE1 α -XBP1 通路促进 HepG2

细胞脂肪合成。这将有助于全面了解肝细胞脂代谢乃至 NAFLD 的病理机制, 为开发 NAFLD 等脂代谢疾病治疗药物提供实验资料。但是由于机体内环境比较复杂, 单纯细胞实验不能反映机体内全部情况, S100A16 对人和动物肝脏脂代谢的调节机制仍然需要更多研究来揭示。

参考文献

- 1 Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1965; 19(6): 739-744.
- 2 Babini E, Bertini I, Borsi V, Calderone V, Hu X, Luchinat C, Parigi G. Structural characterization of human S100A16, a low-affinity calcium binder. *J Biol Inorg Chem* 2011; 16(2): 243-256.
- 3 Sapkota D, Bruland O, Parajuli H, Osman TA, Teh MT, Johannessen AC, Costea DE. S100A16 promotes differentiation and contributes to a less aggressive tumor phenotype in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2015; 15: 631.
- 4 Tanaka M, Ichikawa-Tomikawa N, Shishito N, Nishiura K, Miura T, Hozumi A, Chiba H, Yoshida S, Ohtake T, Sugino T. Co-expression of S100A14 and S100A16 correlates with a poor prognosis in human breast cancer and promotes cancer cell invasion. *BMC Cancer* 2015; 15: 53.
- 5 Zhu W, Xue Y, Liang C, Zhang R, Zhang Z, Li H, Su D, Liang X, Zhang Y, Huang Q, Liu M, Li L, Li D, Zhao AZ, Liu Y. S100A16 promotes cell proliferation and metastasis via AKT and ERK cell signaling pathways in human prostate cancer. *Tumour Biol* 2016; 37(9): 12241-12250.
- 6 Liu Y, Zhang R, Xin J, Sun Y, Li J, Wei D, Zhao AZ. Identification of S100A16 as a novel adipogenesis promoting factor in 3T3-L1 cells. *Endocrinology* 2011; 152(3): 903-911.
- 7 Li D, Zhang R, Zhu W, Xue Y, Zhang Y, Huang Q, Liu M, Liu Y. S100A16 inhibits osteogenesis but stimulates adipogenesis. *Mol Biol Rep* 2013; 40(5): 3465-3473.
- 8 Zhang R, Su D, Zhu W, Huang Q, Liu M, Xue Y, Zhang Y, Li D, Zhao A, Liu Y. Estrogen suppresses adipogenesis by inhibiting S100A16 expression. *J Mol Endocrinol* 2014; 52(3): 235-244.
- 9 Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004; 40(1): 185-194.
- 10 Chen WT, Zhu G, Pfaffenbach K, Kanel G, Stiles B, Lee AS. GRP78 as a regulator of liver steatosis and cancer progression mediated by loss of the tumor suppressor PTEN. *Oncol*

- gene 2013; 33(42): 4997–5005.
- 11 Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 2008; 320(5882): 1492–1496.
 - 12 Glimcher LH, Lee AH. From sugar to fat: How the transcription factor XBP1 regulates hepatic lipogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1173 Suppl 1: E2–E9.
 - 13 Liu X, Henkel AS, LeCuyer BE, Schipma MJ, Anderson KA, Green RM. Hepatocyte X-box binding protein 1 deficiency increases liver injury in mice fed a high-fat/sugar diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; 309(12): G965–G974.
 - 14 Shao M, Shan B, Liu Y, Deng Y, Yan C, Wu Y, Mao T, Qiu Y, Zhou Y, Jiang S, Jia W, Li J, Li J, Rui L, Yang L, Liu Y. Hepatic IRE1alpha regulates fasting-induced metabolic adaptive programs through the XBP1s-PPARalpha axis signalling. *Nat Commun* 2014; 5: 3528.
 - 15 Zhang K, Wang S, Malhotra J, Hassler JR, Back SH, Wang G, Chang L, Xu W, Miao H, Leonardi R, Chen YE, Jackowski S, Kaufman RJ. The unfolded protein response transducer IRE1alpha prevents ER stress-induced hepatic steatosis. *EMBO J* 2011; 30(7): 1357–1375.