

## · 论著 ·

## 巨噬源性泡沫细胞中 p62 蛋白上调作用和机制的研究

林张军<sup>1</sup>, 李倩<sup>2</sup>, 章越凡<sup>1</sup>, 芮耀诚<sup>1</sup> (1. 海军军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433; 2. 中国人民解放军联勤保障部队第九〇一医院药剂科, 安徽 合肥 230031)

**[摘要]** **目的** 探讨巨噬源性泡沫细胞中 p62 蛋白对脂质代谢相关的自噬以及炎症因子表达的影响, 为 p62 在抗动脉粥样硬化中的应用提供参考。**方法** 利用 Ox-LDL 刺激 RAW264.7 细胞的方法模拟巨噬源性泡沫细胞的形成, 通过 Western blot 及实时荧光定量 PCR 检测巨噬源性泡沫细胞中 p62 蛋白和 mRNA 水平。通过 Western blot 比较 p62 siRNA 组和对照组中 Ox-LDL 诱导的 LC3 剪切、脂滴相关蛋白 Plin2 和过氧化物酶体相关蛋白 PEX2 的蛋白水平, 通过实时荧光定量 PCR 比较 TNF $\alpha$  和 IL-6 mRNA 表达水平。**结果** Ox-LDL 对 RAW264.7 细胞中 p62 蛋白以及 mRNA 水平均有上调作用。干扰 p62 的表达之后, LC3-II 蛋白水平降低, Plin2 的蛋白水平并无明显变化, PEX2 的蛋白水平升高, TNF $\alpha$  和 IL-6 mRNA 表达升高。进一步研究发现, 干扰 Nrf2 后能明显抑制 Ox-LDL 对 p62 的上调作用。**结论** 巨噬源性泡沫细胞中 Ox-LDL 通过 Nrf2 介导 p62 蛋白的上调, p62 可能具有抗动脉粥样硬化的作用。

**[关键词]** 动脉粥样硬化; p62; 自噬; 巨噬细胞; 炎症因子

**[中图分类号]** R363; R541.4

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1006-0111(2019)05-0400-07

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.004

## A study on the role and mechanism of upregulated p62 protein in macrophage-derived foam cells

LIN Zhangjun<sup>1</sup>, LI Qian<sup>2</sup>, ZHANG Yuefan<sup>1</sup>, RUI Yaocheng<sup>1</sup> (1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, No. 901 Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA, Hefei 230031, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of p62 protein on the lipid autophagy and the expression of inflammatory cytokines in macrophage-derived foam cells. **Methods** RAW264.7 cells were stimulated by oxidized low density lipoprotein to mimic the formation of macrophage-derived foam cells. The levels of p62 protein and mRNA in macrophage-derived foam cells were detected by Western blot and real-time qPCR. The protein levels of LC3, Plin2 and PEX2 were measured by Western blot in Ox-LDL treated Raw264.7 cells to determine the effects of p62 on autophagy in macrophage-derived foam cells. The TNF $\alpha$  and IL-6 mRNA levels were detected by real-time PCR. **Results** Ox-LDL up-regulated both autophagy levels and p62 protein levels in RAW264.7 cells. After interfering the expression of p62, the level of LC3-II protein decreased, but the protein levels of lipid droplet-related protein Plin2 did not change significantly. The peroxisome-related protein PEX2 level increased. The expression of TNF $\alpha$  and IL-6 also increased. Further studies showed that Nrf2 interference significantly inhibited the up-regulation of p62 by Ox-LDL. **Conclusion** Ox-LDL mediates the upregulation of p62 through Nrf2 in macrophage-derived foam cells, and p62 may play a protective role in atherosclerosis.

**[Key words]** atherosclerosis; p62; autophagy; macrophage; inflammatory cytokines

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种慢性炎症反应, 其特征为大动脉和中动脉血管壁上形成的脂质斑块<sup>[1]</sup>。巨噬细胞是 AS 斑块的重要组成

部分, 在 AS 的进展中发挥重要作用。从早期斑块的巨噬细胞浸润、吞噬堆积的脂质和细胞碎片, 到最终形成泡沫细胞, 巨噬细胞的状态决定了斑块的发展<sup>[2]</sup>。

自噬现象在降解细胞内的长寿命蛋白、受损细胞器和堆积的脂滴中起关键作用<sup>[3]</sup>。自噬功能缺陷会诱发泡沫细胞形成, 从而促进 AS 的发展<sup>[4-5]</sup>。p62/SQSTM1 是一种多功能的支架蛋白, 它不仅参与自噬过程, 还涉及多个细胞信号转导通路<sup>[6-9]</sup>。在

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30672455)

**[作者简介]** 林张军, 硕士研究生, 研究方向: 动脉粥样硬化防治研究, Email: zjlinen@163.com

**[通讯作者]** 芮耀诚, 教授, 博士生导师, 研究方向: 心脑血管药理学, Email: ruiyc163@163.com

选择性自噬中, p62 将泛素化的蛋白携带到自噬小体内降解, 同时自身也被降解<sup>[6]</sup>。然而, 在小鼠和人类的 AS 斑块中检测到了大量堆积的 p62 蛋白<sup>[10-11]</sup>, 这是一种自噬功能缺陷导致的病理现象, 还是一种抗 AS 的应激反应, 目前尚存在争议<sup>[12]</sup>。并且, p62 是否参与了脂滴的自噬性降解暂无定论<sup>[13]</sup>。因此, 本研究拟在氧化低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, Ox-LDL) 诱导的巨噬源性泡沫细胞中探讨 p62 蛋白对脂质代谢相关的自噬以及炎症因子表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞

Raw264.7 细胞购自 ATCC, GFP-LC3B 稳转 RAW264.7 细胞系由本研究室参照文献方法构建<sup>[14]</sup>。

### 1.2 试剂及仪器

DMEM 培养基 (Hyclone 公司), 胎牛血清、青链双抗、胰蛋白酶 (Gibco); 兔抗小鼠 p62 抗体、兔抗小鼠 LC3B 抗体、兔抗小鼠 Nrf2 抗体 (Cell Signaling Technology), CF555 标记的驴抗兔二抗 (Biotium), 兔抗小鼠 PEX2 抗体 (Abgent), 兔抗小鼠 Plin2 抗体 (Abcam), HRP (辣根过氧化酶) 标记的二抗和  $\beta$ -Actin 抗体 (上海康成生物工程有限公司); 低密度脂蛋白 (Low density lipoprotein, LDL)、乙酰化低密度脂蛋白 (acetylated lipoprotein low density, Ac-LDL)、Ox-LDL 和 DiI 标记的 Ox-LDL (北京协生生物技术有限公司); DAPI (上海碧云天生物技术有限公司), 抗淬灭封片剂 (Thermo Fisher); siRNA 转染试剂 INTERFERin<sup>R</sup> (Polyplus); Nrf2 siRNA (Santa Cruz), p62 siRNA (5'-GCUAUGUCCUAUGUGAAAGAU-3') 和对照 siRNA (5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3') 由苏州吉玛基因股份有限公司合成; RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒以及 qPCR 检测试剂 (Takara); 雷帕霉素、氯喹和巴佛洛霉素 A1 (Sigma); 玻底培养皿 (无锡耐思生物技术有限公司)。

Real-time qPCR 仪 (Thermo Fisher ABI7500), 激光共聚焦显微镜 (蔡司 LSM700), CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (美国 Forma Scientific)。

### 1.3 细胞培养及 siRNA 转染

Raw264.7 细胞培养于 DMEM 培养基中, 内含 10% 灭活胎牛血清及 100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素, 置于 37 °C、5.0% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱

中培养。

RAW264.7 细胞按  $1 \times 10^5$  个/孔的密度加到 12 孔板中培养过夜, 按照 INTERFERin<sup>®</sup> 说明书进行转染。转染 36 h 后给予终浓度为 40 mg/L 的 Ox-LDL 刺激, 24 h 后提取细胞总蛋白; 或转染 48 h 后给予终浓度为 40 mg/L 的 Ox-LDL 刺激, 4 h 后提取细胞总 RNA。

### 1.4 巨噬源性泡沫细胞模型的建立

参照文献中泡沫细胞模型的建立方法<sup>[15-16]</sup>, 使用终浓度为 40 mg/L Ox-LDL 刺激 Raw264.7 细胞 24 h, 建立巨噬源性泡沫细胞模型。

### 1.5 细胞中 LC3 和 p62 斑点的观察

稳转 GFP-LC3B 的 RAW264.7 细胞按  $2 \times 10^5$  个/孔的密度加到玻底培养皿中培养过夜, 24 h 后更换含终浓度为 40 mg/L Ox-LDL 的培养基继续培养 24 h; 取出玻底培养皿, 弃去培养基, 加 PBS 洗涤 2 次; 再加 4% 的多聚甲醛溶液进行固定 30 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 用封闭液 (1 × PBS/5% 正常驴血清/0.3% Triton<sup>™</sup> X-100) 室温封闭 60 min; 吸去封闭缓冲液, 加入稀释后的 p62 一抗 (1 : 250), 4 °C 孵育过夜; 取出用 1 × PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加入荧光二抗 (1 : 500), 室温下避光孵育标本 1 ~ 2 h; 用 1 × PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 滴上抗淬灭封片剂, 于激光共聚焦显微镜下观察 LC3 和 p62 斑点。

RAW264.7 细胞按  $1 \times 10^5$  个/孔的密度加到玻底培养皿中培养过夜, 使用终浓度均为 40 mg/L 的 LDL、Ac-LDL 或 Ox-LDL 刺激 24 h。取出玻底皿, p62 抗体孵育过程同前所述, 在荧光二抗孵育结束后, 滴加 DAPI 染液室温孵育 5 min, 用 1 × PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; 滴上抗淬灭封片剂, 于激光共聚焦显微镜下观察 p62 斑点。

### 1.6 Western blot

使用碧云天 RIPA 试剂盒提取细胞内总蛋白, 经 BCA 法测定蛋白浓度后进行蛋白变性。提取的蛋白用 SDS-PAGE 法分离, 使用半干转法将分离的蛋白转移到硝酸纤维素膜上。用含 5% 的脱脂奶粉常温封闭 2 h 后, 进行 p62、LC3、PEX2 和 Nrf2 一抗 (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜, 取出后使用 TBST 洗涤 3 次后, HRP 标记的二抗 (1 : 5 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 滴加 ECL 发光液后于 Tanon5200 成像系统上成像。使用 Quantity One 软件分析灰度值。

## 1.7 Real-time qPCR

使用 RNAiso Reagent 提取总 RNA, 采用逆转录酶试剂盒将 mRNA 逆转录成 cDNA。使用 qPCR 检测试剂以及 p62、IL-6、TNF $\alpha$  和  $\beta$ -Actin 引物进行扩增, 其中,  $\beta$ -Actin 作为内参。详细序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

引物	序列(5' to 3')
p62	F:CGGCTGATTGAGTCCCTCTC
	R:TTCTGGACTGCTGGTGAAT
IL-6	F:GGACCAAGACCATCCAATTC
	R:ACCACAGTGAGGAATGTCCA
TNF $\alpha$	F:AAGCCTGTAGCCCACGTCGTA
	R:GGCACCAGTAGTTGGTTGTCTTTG
$\beta$ -Actin	F:AGTGTGACGTTGACATCCGT
	R:GCAGCTCAGTAACAGTCCGC

## 1.8 数据统计

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析。数据均采用( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间比较采用  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Ox-LDL 同时上调巨噬细胞中自噬水平和 p62 蛋白水平

在激光共聚焦显微镜下观察发现, 与对照组相比, Ox-LDL 处理组的细胞中出现更多的 LC3 和 p62 斑点, 并且存在共定位(图 1A)。LC3 斑点增多说明 Ox-LDL 诱导的泡沫细胞中自噬体数量增多, p62 斑点增多有可能是自噬溶酶体降解途径受到影响导致的。利用自噬抑制剂氯喹与 Ox-LDL 共刺激或分别刺激 Raw264.7 细胞 24 h 后, Western blot 结果显示 Ox-LDL 提高了巨噬细胞中 LC3-II / ACTB 比值, 与氯喹共刺激后能进一步升高该比值(图 1B), 说明 Ox-LDL 上调了巨噬细胞的自噬水平。为了研究 Ox-LDL 对 p62 蛋白水平的影响是否通过了自噬途径, 将 Ox-LDL 与自噬诱导剂(雷帕霉素)或自噬抑制剂(巴佛洛霉素 A1、氯喹)共刺激巨噬细胞 24 h, 通过 Western blot 检测细胞中 p62 蛋白水平。结果显示雷帕霉素能抑制 Ox-LDL 对 p62 蛋白的上调作用, 巴佛洛霉素 A1 和氯喹均能增加 Ox-LDL 对 p62 蛋白的上调作用(图 1C)。这说明 Ox-LDL 对 p62 蛋白的上调作用并不是抑制自噬溶酶体降解途径导致的。

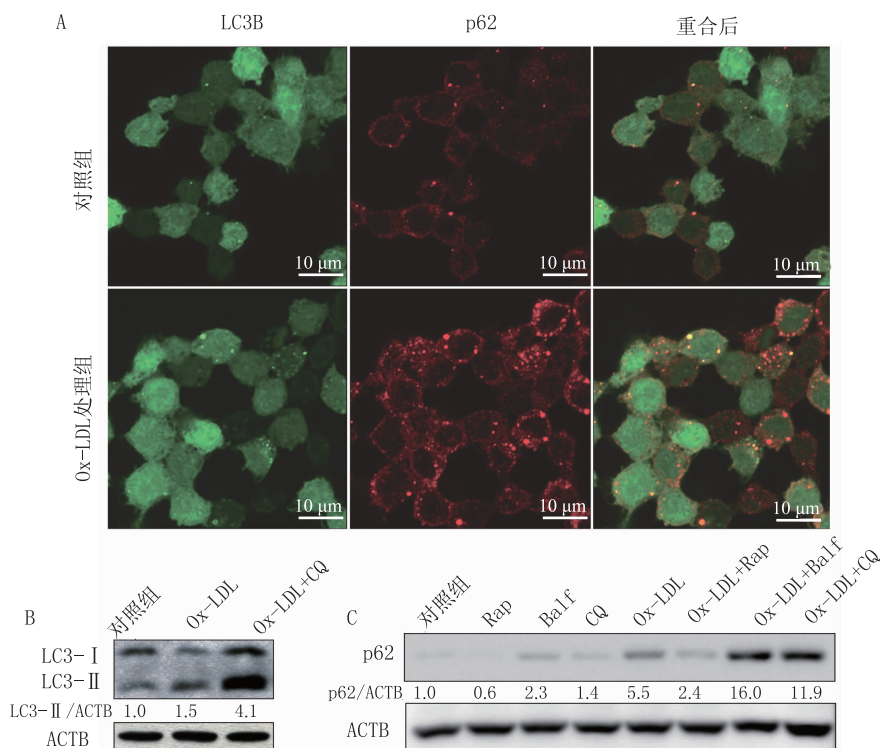


图 1 Ox-LDL 对巨噬细胞中自噬水平和 p62 蛋白水平的影响

A. 共聚焦显微镜下观察 LC3(绿色)和 p62(红色)斑点; B. Ox-LDL 上调 Raw264.7 细胞自噬水平; C. 不同处理组细胞中 p62 蛋白水平; Ox-LDL(40 mg/L)、雷帕霉素(Rap)100 nmol/L、氯喹(CQ)50  $\mu$ mol/L 和巴佛洛霉素 A1(Baf A1)100 nmol/L; ACTB( $\beta$ -actin)

## 2.2 LDL、Ac-LDL 和 Ox-LDL 上调巨噬细胞中 p62 蛋白和 mRNA 水平

在激光共聚焦显微镜下观察到, LDL、Ac-LDL 或 Ox-LDL 刺激后, 细胞内 p62 斑点均增多(图 2A)。Western blot 结果显示: LDL、Ac-LDL 和 Ox-LDL 均能上调 p62 蛋白水平, 其中 Ox-LDL 的上调能力最强(图 2B)。分别使用终浓度均为

40 mg/L LDL、Ac-LDL 和 Ox-LDL 刺激 2、4、6 h 后, 用 Real-time qPCR 检测 p62 mRNA 水平, 结果显示: 3 种低密度脂蛋白均能使 p62 mRNA 水平呈现时间依赖性上调, 其中 Ox-LDL 上调作用最强, 与 LDL 组(4、6 h,  $P < 0.01$ ) 和 Ac-LDL 组(4 h,  $P < 0.05$ ; 6 h,  $P < 0.01$ ) 相比, 均有统计学差异(图 2C)。

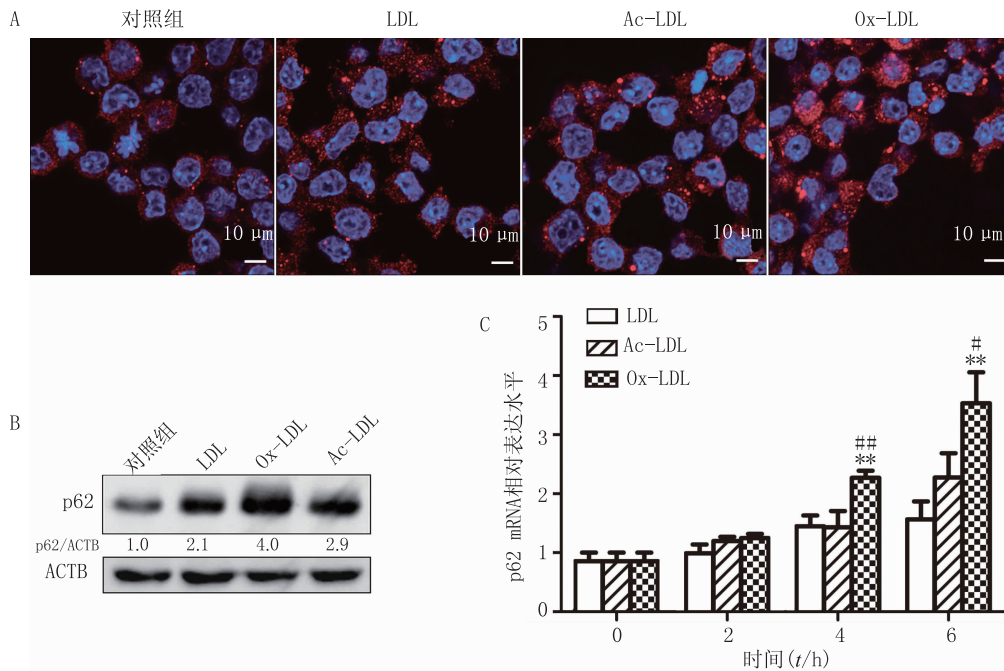


图 2 LDL、Ac-LDL 和 Ox-LDL 对巨噬细胞中 p62 蛋白和 mRNA 水平的影响

A. 共聚焦显微镜下观察 p62(红色), 细胞核(蓝色); B. LDL、Ac-LDL 和 Ox-LDL 对 Raw264.7 细胞中 p62 蛋白水平的影响,

ACTB( $\beta$ -actin); C. LDL、Ac-LDL 和 Ox-LDL 对 p62 mRNA 水平的影响( $n=3$ )

\*\*  $P < 0.01$ , 与同一时间点中 LDL 组比较; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , 与同一时间点中 Ac-LDL 组比较

## 2.3 沉默 p62 对巨噬源性泡沫细胞中自噬的影响

使用 p62 siRNA 转染 RAW 264.7 细胞 36 h 后, 再给予终浓度为 40 mg/L 的 Ox-LDL 刺激 24 h, Western blot 检测到 p62 siRNA 组 LC3II/ $\beta$ -actin 比值低于对照组(图 3A), 而脂滴相关蛋白 Plin2 蛋白水平没有明显变化(图 3B), 提示下调 p62 虽然削弱了 Ox-

LDL 诱导的自噬水平, 但是未对细胞中脂滴自噬性降解产生明显影响。另外, Western blot 结果还显示 Ox-LDL 刺激后的 p62 siRNA 组 PEX2 蛋白水平高于对照组(图 3A)。PEX2 主要位于过氧化物酶体膜上<sup>[17]</sup>, PEX2 水平的变化提示沉默 p62 可能影响了泡沫细胞中过氧化物酶体的自噬性降解。

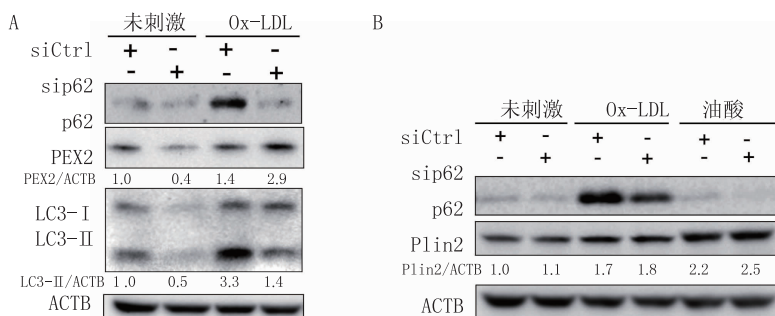


图 3 沉默 p62 对巨噬源性泡沫细胞中自噬的影响

A. 沉默 p62 对 LC3、PEX2 蛋白水平的影响; B. 沉默 p62 对 Plin2 的影响; 油酸 200  $\mu$ mol/L; ACTB( $\beta$ -actin)

### 2.4 p62 抑制 Ox-LDL 诱导的炎症因子表达

为了确认 p62 是否影响了 Ox-LDL 诱导的炎症因子的表达,本研究中对比了 p62 siRNA 组和对照组 Raw264.7 细胞经 Ox-LDL 刺激 4 h 后胞内的

TNF $\alpha$  和 IL-6 mRNA 水平。Real-time qPCR 结果显示,p62 siRNA 组 TNF $\alpha$ ( $P < 0.05$ )和 IL-6 mRNA( $P < 0.01$ )表达明显升高(图 4),说明沉默 p62 促进了 Ox-LDL 诱导的炎症因子的表达。

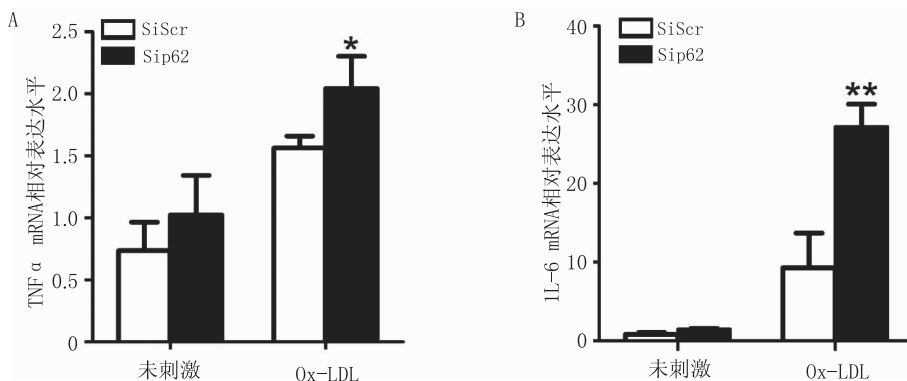


图 4 沉默 p62 对 Ox-LDL 诱导的炎症因子表达的影响

A. 对 Ox-LDL 诱导的 TNF $\alpha$  mRNA 水平的影响;B. 对 Ox-LDL 诱导的 IL-6 mRNA 水平的影响( $n=3$ )

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ,与 Ox-LDL 刺激后的对照组比较

### 2.5 Ox-LDL 在巨噬细胞中通过 Nrf2 介导 p62 上调

当细胞应对氧化应激时,腹腔巨噬细胞中 p62 可以被 Nrf2 诱导表达,敲除 Nrf2 显著抑制 p62 的表达水平<sup>[18]</sup>。为了进一步探讨 Ox-LDL 对 Raw264.7 细胞中 p62 蛋白的上调是否与 Nrf2 相关,使用 Nrf2 siRNA 转染 Raw264.7 细胞 36 h 后,再给予终浓度为 40 mg/L 的 Ox-LDL 刺激 24 h,Western blot 结果显示,Nrf2 siRNA 组中 Ox-LDL 对 p62 蛋白的上调受到了明显抑制(图 5)。这说明 Ox-LDL 诱导巨噬细胞中 p62 蛋白水平上调是通过 Nrf2 介导的。

活<sup>[19-23]</sup>。本研究发现了 Ox-LDL 具有极强的上调 p62 蛋白的作用。虽然 Ox-LDL 对 p62 蛋白的上调作用已有文献报道<sup>[10,24]</sup>,但是通过本研究发现,LDL 和 Ac-LDL 也有上调 p62 蛋白作用,并且探索了 Ox-LDL 上调 p62 表达的机制,为 p62 在抗 AS 中的应用研究提供了理论基础。

本研究还发现 Ox-LDL 刺激后的巨噬细胞中自噬功能没有明显改变,但 p62 的转录水平有显著的上调,说明 Ox-LDL 主要在转录水平上调 p62,同时也提示 p62 蛋白水平升高不是自噬溶酶体功能受损的充分依据。研究同时发现沉默 p62 后能够影响炎症因子的表达,推测在巨噬源性泡沫细胞中 p62 上调可能是一种保护机制,即 p62 通过抑制 IL-6 和 TNF $\alpha$  mRNA 的表达避免可能继发的更强的炎症反应,这与既往文献报道一致<sup>[25]</sup>。

p62 可以结合细胞器表面泛素化的蛋白,将这些细胞器拖入自噬小体中,利用自噬溶酶体途径实现细胞器的更新<sup>[6]</sup>。与 p62 功能类似的还有 NBR1<sup>[26]</sup>。脂滴通过 p62 或 NBR1 途径降解目前还缺乏充分的证据,没有报道发现脂滴上存在 p62 或 NBR1 蛋白<sup>[27-28]</sup>。已有研究发现,在脂质负荷时自噬小体优先与脂滴结合<sup>[29]</sup>,但具体机制还不明确。本研究发现,沉默 p62 对巨噬细胞中脂质负荷的程度无明显影响,也提示 p62 不是巨噬细胞中脂滴自噬性降解的必需蛋白。过氧化物酶体是胞内脂肪酸代谢的重要场所,过氧化物酶体的数量与细胞内氧化应激水平密切相关,细胞可以通过自噬来调节过

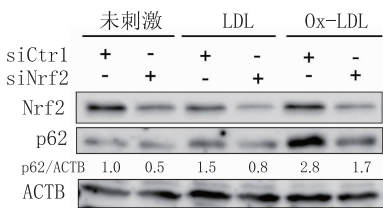


图 5 Nrf2 介导 Ox-LDL 诱导的巨噬源性泡沫细胞中 p62 蛋白的上调

### 3 讨论

修饰的低密度脂蛋白是一类重要的致 AS 因子,包括 Ac-LDL、Ox-LDL 等。巨噬细胞通过 CD36 受体摄取修饰的低密度脂蛋白后,大量的脂质以胆固醇酯的形式储存在于脂滴中<sup>[19]</sup>。过量的脂质负荷能够触发脂滴的自噬性降解,内质网应激和过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  等通路激

氧化物酶体数量从而控制细胞内活性氧水平<sup>[30]</sup>。当 p62 被沉默后,过氧化物酶体的自噬性降解会受到影响,表现为细胞内过氧化物酶体数量增多<sup>[30]</sup>。本研究还发现沉默 p62 会上调 Ox-LDL 处理组细胞中 PEX2 蛋白水平,提示 p62 与过氧化物酶体自噬性降解存在相关性。PEX2 作为一种 E3 泛素连接酶,可以增强对底物蛋白的泛素化作用,从而提高经 NBR1 途径的自噬性降解<sup>[31]</sup>。推测沉默 p62 后出现的 PEX2 蛋白上调可能是一种代偿机制。

Keap-Nrf2 通路是细胞内主要的抗氧化反应途径之一。上调的 p62 蛋白与 Nrf2 竞争性结合 Keap1,导致更多的 Nrf2 游离出来进入细胞核,从而介导 p62 的转录<sup>[32]</sup>。p62 既是该通路的诱导产物,又能反作用于该通路,促进细胞内活性氧的清除和 DNA 修复等。推测在 AS 斑块区细胞中,大量表达的 p62 蛋白参与泛素化的蛋白和受损细胞器的降解,从而维持细胞内部稳态,这种 p62 的上调是否一种自我保护机制,还需要进一步的研究。

### 【参考文献】

[1] HANSSON G K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(16):1685-1695.

[2] LEVINE B, KROEMER G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. *Cell*, 2008, 132(1):27-42.

[3] EVANS T D, SERGIN I, ZHANG X Y, et al. Target acquired; Selective autophagy in cardiometabolic disease[J]. *Sci Signal*, 2017, 10(468):eaag2298.

[4] OUIMET M, FRANKLIN V, MAK E, et al. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase[J]. *Cell Metab*, 2011, 13(6):655-667.

[5] LIAO X H, SLUIMER J C, WANG Y, et al. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis[J]. *Cell Metab*, 2012, 15(4):545-553.

[6] LIPPAI M, LÖW P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:832704.

[7] MANLEY S, WILLIAMS J A, DING W X. Role of p62/SQSTM1 in liver physiology and pathogenesis[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2013, 238(5):525-538.

[8] BITTO A, LERNER C A, NACARELLI T, et al. P62/SQSTM1 at the interface of aging, autophagy, and disease[J]. *Age (Dordr)*, 2014, 36(3):9626.

[9] BURDELSKI C, REISWICH V, HUBE-MAGG C, et al. Cytoplasmic accumulation of sequestosome 1 (p62) is a predictor of biochemical recurrence, rapid tumor cell proliferation, and genomic instability in prostate cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(15):3471-3479.

[10] SERGIN I, BHATTACHARYA S, EMANUEL R, et al. Inclusion bodies enriched for p62 and polyubiquitinated proteins in macrophages protect against atherosclerosis[J]. *Sci Signal*, 2016, 9(409):ra2.

[11] SERGIN I, EVANS T D, ZHANG X Y, et al. Exploiting macrophage autophagy-lysosomal biogenesis as a therapy for atherosclerosis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8:15750.

[12] GROOTAERT M O J, ROTH L, SCHRIJVERS D M, et al. Defective autophagy in atherosclerosis: to die or to senesce? [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018:7687083.

[13] JEONG S J, ZHANG X Y, RODRIGUEZ-VELEZ A, et al. P62/SQSTM1 and selective autophagy in cardiometabolic diseases[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31(6):458-471.

[14] HU D, WU J, XU L F, et al. A method for the establishment of a cell line with stable expression of the GFP-LC3 reporter protein[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(4):783-786.

[15] LIU N, WU C M, SUN L Z, et al. Sesamin enhances cholesterol efflux in RAW<sub>264.7</sub> macrophages[J]. *Molecules*, 2014, 19(6):7516-7527.

[16] GUPTA N, GOSWAMI R, ALHARBI M O, et al. TRPV 4 is a regulator in *P. gingivalis* lipopolysaccharide-induced exacerbation of macrophage foam cell formation[J]. *Physiol Rep*, 2019, 7(7):e14069.

[17] BIERMANN S, VON LAAR J, BROSIUS U, et al. The peroxisomal membrane targeting elements of human peroxin 2 (PEX2)[J]. *Eur J Cell Biol*, 2003, 82(4):155-162.

[18] ISHII T, ITOH K, TAKAHASHI S, et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(21):16023-16029.

[19] PARK Y M. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis[J]. *Exp Mol Med*, 2014, 46:e99. DOI: 10.1038/emmm.2014.38.

[20] CHOROMANSKA B, MYSLIWIEC P, CHOROMANSKA K, et al. The role of CD36 receptor in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Adv Clin Exp Med*, 2017, 26(4):717-722.

[21] JEONG S J, LEE M N, OH G T. The role of macrophage lipophagy in reverse cholesterol transport[J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2017, 32(1):41-46.

[22] SANDA G M, DELEANU M, TOMA L, et al. Oxidized LDL-exposed human macrophages display increased MMP-9 expression and secretion mediated by endoplasmic reticulum stress[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(4):661-669.

[23] YAO S T, MIAO C, TIAN H, et al. Endoplasmic reticulum stress promotes macrophage-derived foam cell formation by up-regulating cluster of differentiation 36 (CD36) expression[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(7):4032-4042.

[24] NING H F, LIU D, YU X C, et al. Oxidized low-density lipoprotein-induced p62/SQSTM1 accumulation in THP-1-derived macrophages promotes IL-18 secretion and cell death[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(6):5417-5423.

[25] KIM J Y, OZATO K. The sequestosome 1/p62 attenuates cytokine gene expression in activated macrophages by inhibiting IFN regulatory factor 8 and TNF receptor-associated factor 6/NF-kappaB activity [J]. *J Immunol*, 2009, 182(4):2131-2140.

[26] KIRKIN V, LAMARK T, JOHANSEN T, et al. NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets[J]. *Autophagy*, 2009, 5(5):732-733.

- (4);11-14.
- [6] PADMANABHAN V, VEIGA-LOPEZ A. Animal models of the polycystic ovary syndrome phenotype[J]. *Steroids*, 2013, 78(8):734-740.
- [7] 牡丹峰, 李雪莲. 多囊卵巢综合征动物模型的胰岛素抵抗表现[J]. *国际妇产科学杂志*, 2013, 40(1):24-26, 39.
- [8] PAIXAO L, RAMOS R B, LAVARDA A, et al. Animal models of hyperandrogenism and ovarian morphology changes as features of polycystic ovary syndrome: a systematic review [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2017, 15(1):12.
- [9] PAIXAO L, RAMOS R B, LAVARDA A, et al. Animal models of hyperandrogenism and ovarian morphology changes as features of polycystic ovary syndrome: a systematic review [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2017, 15:12.
- [10] MANNERAS L, CAJANDER S, HOLMANG A, et al. A new rat model exhibiting both ovarian and metabolic characteristics of polycystic ovary syndrome[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(8):3781-3791.
- [11] GOZUKARA I, DOKUYUCU R, ÖZGÜR T, et al. Histopathologic and metabolic effect of ursodeoxycholic acid treatment on PCOS rat model [J]. *Gynecolog Endocrinol*, 2016, 32(6):492-497.
- [12] MALIQUEO M, SUN M, JOHANSSON J, et al. Continuous administration of a P450 aromatase inhibitor induces polycystic ovary syndrome with a metabolic and endocrine phenotype in female rats at adult age[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(1):434-445.
- [13] SKARRA D V, HERNANDEZ-CARRETERO A, RIVERA A J, et al. Hyperandrogenemia induced by letrozole treatment of pubertal female mice results in hyperinsulinemia prior to weight gain and insulin resistance[J]. *Endocrinology*, 2017, 158(9):2988-3003.
- [14] 韩静, 余俊达, 潘秋, 等. 四种高脂饲料诱发胰岛素抵抗的实验研究[J]. *江西中医学院学报*, 2010, 22(4):64-66.
- [15] 张涛, 刘源, 赵爽, 等. 不同高能饮食诱发胰岛素抵抗大鼠模型比较[J]. *实验动物科学*, 2011, 28(3):29-33.
- [16] RESSLER I B, GRAYSON B E, ULRICH-LAI Y M, et al. Diet-induced obesity exacerbates metabolic and behavioral effects of polycystic ovary syndrome in a rodent model[J]. *Am J Physiol-Endocrin Metab*, 2015, 308(12):E1076-E1084.
- [17] 朱磊, 路瑛丽, 冯连世, 等. 不同配方高脂饲料构建 SD 大鼠肥胖模型的实验研究[J]. *中国运动医学杂志*, 2016, 35(7):642-647.
- [18] BALASUBRAMANIAN P, JAGANNATHAN L, MAHAL-EY R E, et al. High fat diet affects reproductive functions in female diet-induced obese and dietary resistant rats [J]. *J Neuroendocrinol*, 2012, 24(5):748-755.
- [19] REZVANFAR M A, SHOJAEI SAADI H A, GOOSHE M, et al. Ovarian aging-like phenotype in the hyperandrogenism-induced murine model of polycystic ovary [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014:1-10.

【收稿日期】 2018-12-15 【修回日期】 2019-04-22

【本文编辑】 李睿旻

(上接第 405 页)

- [27] NIAN Z Q, SUN Z Q, YU L X, et al. Fat-specific protein 27 undergoes ubiquitin-dependent degradation regulated by triacylglycerol synthesis and lipid droplet formation [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(13):9604-9615.
- [28] FUJIMOTO T, OHSAKI Y. Proteasomal and autophagic pathways converge on lipid droplets [J]. *Autophagy*, 2006, 2(4):299-301.
- [29] OUMET M, MARCEL Y L. Regulation of lipid droplet cholesterol efflux from macrophage foam cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(3):575-581.
- [30] TILL A, LAKHANI R, BURNETT S F, et al. Pexophagy: the selective degradation of peroxisomes [J]. *Int J Cell Biol*, 2012, 2012:512721.
- [31] SARGENT G, VAN ZUTPHEN T, SHATSEVA T, et al. PEX2 is the E3 ubiquitin ligase required for pexophagy during starvation [J]. *J Cell Biol*, 2016, 214(6):677-690.
- [32] JAIN A, LAMARK T, SJØTTEM E, et al. P62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(29):22576-22591.

【收稿日期】 2019-06-23 【修回日期】 2019-07-23

【本文编辑】 李睿旻