

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 貝他型肌動蛋白與脂肪滴連結之研究

### Interaction between Beta-actin and Lipid Droplet

計畫編號：NSC 89-2320-B-038-071

執行期限：89年08月01日至91年01月31日

主持人：馮琮涵 助理教授

計劃參與人員：廖伊文 研究生

執行機構及單位名稱：私立台北醫學大學解剖學科

#### 一、中文摘要

細胞內脂肪滴表面的蛋白質，多數具有調節脂質代謝之功能。然而細胞內脂質代謝之機轉及運送途徑仍有許多未知，所以本研究擬探討是否仍有其他的脂肪滴表面蛋白質存在，以及其功能為何。本實驗取材自大白鼠腎上腺細胞與脂肪細胞，分別分離出細胞內之脂肪滴，利用電泳與免疫轉漬方法分析脂肪滴表面的蛋白質。結果發現，不論是從腎上腺細胞或脂肪細胞分離出的脂肪滴中皆有肌動蛋白存在。經二次電泳與免疫轉漬方法證實為貝他型肌動蛋白。進一步培養腎上腺皮質細胞，並利用免疫螢光染色法觀察細胞內貝他型肌動蛋白分佈的位置，結果顯示貝他型肌動蛋白除了架構成肌動蛋白絲之外，同時也分佈於脂肪滴表面。另以FITC-phalloidin標示法證實脂肪滴表面的肌動蛋白為顆粒狀。此外，利用藥物 dibutyryl cAMP 促使脂質水解，而後觀察脂肪滴的形態以及其表面肌動蛋白分佈位置的變化。實驗結果發現，以 dibutyryl cAMP 刺激，脂肪滴會隨著刺激時間的增加而變小，原本位於脂肪滴表面的肌動蛋白會脫落游離在胞質中。推測脂肪滴表面的貝他型肌動蛋白可能具有幫助脂質運送的功能。

**關鍵詞：**腎上腺皮質細胞、脂肪細胞、脂肪滴、貝他型肌動蛋白

#### Abstract

Several lipid droplet-associated proteins are involved in regulating intracellular lipid metabolism. However, the molecular basis of the acute hormonal regulation and mechanism of lipolysis in cells remains unclear. In this study, intracellular lipid droplets were isolated from rat adrenocortical cells and adipocytes. The lipid droplet-associated proteins were analyzed by electrophoresis and Western blotting. We found that actin was copurified with both lipid droplet preparations. According to the data of two dimensional electrophoresis and Western blot, lipid droplet-associated actin was confirmed as beta isoform. Immunofluorescence with anti-beta-actin antibody showed that beta-actin not only constructed the stress fibers, but also located on the surface of lipid droplet. In addition, FITC-phalloidin staining displayed lipid droplet-associated actin was globular type. To investigate the interaction between beta-actin and intracellular lipid droplets, the redistribution of beta-actin was examined by administration of dibutyryl cAMP. After treatment of dibutyryl cAMP to stimulate lipolysis, lipid droplets were decrease in size. Immunofluorescence revealed that the number of stress fibers was

decrease and beta-actin was translocated from the surface of lipid droplets into cytosol in cultured adrenocortical cells. These data demonstrated that lipid droplet-associated globular beta-actin might facilitate intracellular lipid transport during lipolysis.

**Keywords :** adrenocortical cells, adipocytes, lipid droplets, beta-actin

## 二、計畫緣由與目的

目前許多研究報告指出在細胞內脂肪滴表面有許多不同的蛋白質存在。這些脂肪滴表面的蛋白質具有調控脂質代謝的功能。例如 perilipin (62 KD) 為一種受荷爾蒙調控的磷酸化的蛋白質，已知存在於脂肪細胞 (Greenberg et al., 1991)、腎上腺皮質與睪丸間質細胞中 (Servetnick et al., 1995)。此外，若將 perilipin 的 cDNA 植入尚未分化的脂肪前身細胞 (3T3-L1 preadipocytes) 內，可以促進脂肪滴的生成與堆積，因此學者推測 perilipin 扮演調控脂肪滴分解與生成的角色 (Londos et al., 1995)。

Adipose differentiation-related protein (ADRP) 是另一種位於初形成的脂肪滴表面的蛋白質。在脂肪前身細胞、MA-10 Leydig cells, chinese hamster ovary (CHO) fibroblasts 及 human hepatoma (Hep G2) cells 等細胞的脂肪滴表面也被發現有 ADRP，學者們推測可能具有保護新形成的脂肪滴之功能 (Brasaemle et al., 1997)。

另外，在大白鼠的腎上腺皮質細胞與倉鼠的睪丸間質細胞中發現的被囊蛋白質 (capsular proteins)，也是位於脂肪滴表面。進一步發現當細胞受到脂質分解的荷爾蒙刺激時，被囊蛋白質會藉由分佈位置的改變而調控脂質之水解 (Wang and Fong, 1995; Fong et al., 1996; Fong and Wang, 1997)。在

脂肪前身細胞中也有被囊蛋白質的存在，可能負責穩定初生成的脂肪滴 (Wang et al., 1997)。目前對脂質分子如何進出脂肪滴的機轉尚未明瞭，可能還有其他的脂肪滴表面蛋白質存在 (Londos et al., 1999)。

肌動蛋白普遍存在於真核細胞內，是構成細胞骨架中肌動蛋白絲的主要蛋白。已知肌肉組織中為 alpha 型；其他種類細胞以 beta 或 gamma 型為主要 (Vandekerckhove and Weber, 1978)。根據先前許多的研究顯示，肌動蛋白絲會與細胞膜連結，因此具有維持細胞形狀、參與細胞運動及細胞間連結的功能 (Geiger, 1983; Jacoson, 1983)。而肌動蛋白質連結細胞膜的方式可能經由一些連結蛋白質 (actin-binding proteins)，如 alpha-actinin (Rotman et al., 1982)、vinculin (Otto, 1990) 與 talin (Burrige and Cornell, 1983)；或是直接與脂質連結 (Gicquaud, 1995; Bouchard et al., 1998)。同樣由脂質構成的細胞內脂肪滴而言，肌動蛋白是否與其連結則尚未有文獻報導。

歸納以上所述理由，我們推測脂肪滴表面可能有肌動蛋白存在。因此本實驗選用大白鼠副睪旁的脂肪組織及腎上腺皮質為材料，因為這兩種組織的細胞內含豐富脂肪滴，並且易於分離純化。首先分離出細胞內之脂肪滴，以生化方式檢測是否有肌動蛋白並存。進一步做細胞培養，利用免疫螢光染色觀察細胞內肌動蛋白的分佈位置。並分別利用藥物 dibutyryl cAMP 促使脂質水解，而後觀察脂肪滴的形態以及其表面肌動蛋白分佈位置的變化。相信對脂質代謝的機轉能有更深入的了解。

## 三、結果

在顯微鏡下觀察從腎上腺皮質細胞中分離出來的脂肪滴比從脂肪細胞中分離出的脂肪滴小 (圖 1)。以抗肌動蛋白的多株抗

體進行免疫染色顯示脂肪滴周邊出現明亮的螢光反應(圖 1B 與 D)。推測兩種細胞分離出的脂肪滴表面皆有肌動蛋白附著。

利用電泳及免疫轉漬分析肌動蛋白的型式。已知肌原纖維內的肌凝蛋白(200 KD)與肌動蛋白(43 KD)含量非常豐富(圖 2A 中 lane 1)；腎上腺皮質細胞及脂肪細胞內有許多的蛋白質伴隨脂肪滴一起被分離出(圖 2A 中 lane 2 及 lane 3)，其中皆有一分子量為 43 KD 的蛋白質(圖 2A 中星號)。免疫轉漬結果顯示此蛋白質被抗貝他型肌動蛋白抗體標示；而肌原纖維內的 alpha 型肌動蛋白則未被標示(圖 2B)。未加一級抗體的對照組則皆無免疫反應(圖 2C)。

由二次電泳及免疫轉漬的結果發現腎上腺皮質細胞(圖 3A 與 C)或是脂肪細胞(圖 3B 與 D)中附著於脂肪滴的確實為貝他型肌動蛋白(43 KD)。

培養的腎上腺皮質細胞經甲醇固定後，脂肪滴成空泡狀(圖 4A 中箭頭)。抗貝他型肌動蛋白的抗體標示出絲狀的 stress fibers(圖 4B 中箭號)，同時也染到脂肪滴周邊(圖 4B 中箭頭)。未加入一級抗體的對照組沒有螢光反應(圖 4C 與 D)。

另外再以 FITC-phalloidin 標示，染出絲狀的 stress fibers (圖 5B 中箭號)，脂肪滴表面卻沒有被標示。此結果顯示脂肪滴表面的肌動蛋白應為顆粒狀而非絲狀構造。

以藥物 dibutyryl cAMP 刺激細胞二小時與四小時後，發現隨著時間增長，脂肪滴有逐漸變小的情形(圖 6 中箭頭)。絲狀的 stress fibers 有變少及變短且集中在細胞邊緣的現象，脂肪滴週邊皆沒有明顯的螢光反應(圖 6B 與 D)。

#### 四、討論

先前已有研究報導腎上腺皮質細胞及睪丸間質細胞內脂肪滴以及富含脂質代謝

酵素的粒線體皆會與 vimentin 中間絲的細胞骨架相連結(Almahbobi et al., 1992; 1993)。若是以藥物 acrylamide 破壞 vimentin 中間絲時，固醇物的產量會上升。學者推測因為脂肪滴與粒線體兩者的距離縮短所致(Shiver et al., 1992)。此外，在脂肪前身細胞分化轉變成脂肪細胞時，細胞內初生成的脂肪滴有被 vimentin 中間絲圍繞的情形(Franke et al., 1987)。這些研究顯示屬於細胞骨架的 vimentin 蛋白質似乎也會與脂肪滴連結，並且影響脂質代謝。

另一方面的研究指出，以藥物 cytochalasins 破壞腎上腺細胞內的肌動蛋白絲時，ACTH 所引發的固醇物合成作用也會被抑制。進一步發現是脂肪滴中釋出的膽固醇無法運送到粒線體內轉化成固醇物所致。此報告顯示肌動蛋白絲可能參與脂質之運送(Mrotek et al., 1977; Hall et al., 1981)。此外以抗肌動蛋白抗體或 DNase I 干擾細胞內舊有或新生成之肌動蛋白時，膽固醇運送到粒線體的現象也會被抑制(Hall, 1995; 1997)。這結果則顯示細胞內必須維持一定數量的肌動蛋白來幫助脂質的運送。

我們的研究發現不論是腎上腺皮質細胞或脂肪細胞的脂肪滴表面皆有顆粒狀的貝他型肌動蛋白附著。此兩種細胞的生理功能不同，脂質代謝的機制相似，因此推測肌動蛋白可能廣泛存在於各種組織細胞的脂肪滴表面。

以藥物 dibutyryl cAMP 促進脂質分解時，脂肪滴被分解變小，且位於脂肪滴表面的貝他型肌動蛋白會離開脂肪滴表面游離在胞質中。推測游離的肌動蛋白可能幫助從脂肪滴中分解釋出的脂質運送至粒線體或其他胞器以利脂質代謝的進行。至於脂質與肌動蛋白之間是直接或間接連結則需進一步實驗證實。

## 五、計畫成果自評

本次研究內容與原計畫相符，發現兩種不同種類的細胞其脂肪滴表面皆有貝他型肌動蛋白存在。此項發現對細胞內脂質的運送機制或代謝方式的探討極具學術價值。這一部份成果已發表在 BBRC 289: 1168-1174, Dec. 2001。

另一方面，利用藥物刺激細胞後的變化也顯示與脂肪滴連結的貝他型肌動蛋白可能具有調節脂質代謝之功能。目前正積極從事其他藥物刺激的結果分析(如 cytochalasin D)，相信不久將有更進一步的成果展現。

## 六、參考文獻

- [1] Almahbobi G, Williams LJ and Hall PF. *Attachment of steroidogenic lipid droplets to intermediate filaments in adrenal cells.* J. Cell Sci 101:383-393, 1992.
- [2] Almahbobi G, Williams LJ, Han XG and Hall PF. *Binding of lipid droplets and mitochondria to intermediate filaments in rat Leydig cells.* J. Reproduc. Fertil. 98: 209-217, 1993.
- [3] Bouchard M, Pare C, Dutasta JP, Gicquaud C and Auger M. *Interaction between G-actin and various types of liposomes: A 19F, 31P, and 2H nuclear magnetic resonance study.* Biochemistry. 37:3149-3155, 1998.
- [4] Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ and Londos C. *Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein.* J. of Lipid Res. 38:2249-2263, 1997.
- [5] Burrridge K and Cornell L. *Talin: a cytoskeletal component concentrated in adhesion plaques and other sites of actin-membrane interaction.* Cell Motil. 3: 405-417, 1983.
- [6] Fong TH, Wang SM and Lin HS. *Immunocytochemical demonstration of a lipid droplet-specific capsule in cultured Leydig cells of the golden hamsters.* J. Cell. Biochem. 63:366-373, 1996.
- [7] Fong TH, Wang SM. *Dissection of the signaling mechanism for capsule detachment of lipid droplets in rat adrenocortical cells.* J. Cell. Biochem. 65:67-74, 1997.
- [8] Franke WW, Hergt M and Grund C. *Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules.* Cell 49: 131-141.
- [9] Geiger B. *Membrane-cytoskeleton interaction.* Biochim. Biophys. Acta. 737:305-341, 1983.
- [10] Gicquaud C. *Does actin bind to membrane lipids under condition compatible with those existing in vivo?* Biochem. & Biophys. Res. Commun. 208:1154-1158, 1995.
- [11] Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. *Perilipin: a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets.* J. Biol. Chem. 266:11341-11346, 1991.
- [12] Hall PF, Masahisa N and Mortek JJ. *The actions of various cytochalasins on mouse adrenal tumor cells in relation to trophic stimulation of steroidogenesis.* Biochim. Biophys. Acta 676: 338-344, 1981.
- [13] Hall PF. *The roles of microfilaments and intermediate filaments in the regulation of steroid synthesis.* J. of Steroid Biochem. & Mol. Biol. 55:601-605, 1995.
- [14] Hall PF. *The roles of calmodulin, actin, and vimentin in steroid synthesis by adrenal cells.* Steroids. 62:185-189, 1997.
- [15] Jacobson BS. *Interaction of the plasma membrane with the cytoskeleton: an overview.* Tissue & Cell. 15:829-852, 1983.
- [16] Londos C, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, Servetnick DA, Schultz , Levin DM, Kimmel AR. *Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells.* Biochem. Society Transactions 23:611-615, 1995.
- [17] Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR. *Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells.* Seminars in Cell & Developmental Biol. 10:51-58, 1999.
- [18] Mrotek JJ and Hall PF. *Response of adrenal tumor cells to adrenocorticotropin: site of inhibition by cytochalasin B.* Biochemistry. 16:3177-81, 1977.
- [19] Otto JJ. *Vinculin [Review]* Cell Motil. & Cytoskel. 16:1-6, 1990.
- [20] Rotman A, Heldman J and Linder S. *Association of membrane and cytoplasmic proteins with the cytoskeleton in blood platelets.* Biochemistry 21: 1713-1719, 1982.
- [21] Servetnick DA, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, Kimmel AR, Wolff J, Londos C. *Perilipins are associated with cholesterol ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells.* J. Biol. Chem. 70:16970-16973, 1995.
- [22] Shiver TM, Sackett DL, Knipling L and Wolff J. *Intermediate filaments and steroidogenesis in adrenal Y-1 cells: acrylamide stimulation of steroid production.* Endocrinology 131:201-207, 1992.
- [23] Vandekerckhove J and Weber K. *At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide.* J. Mol. Biol. 126: 783-802, 1978.
- [24] Wang SM and Fong TH. *A lipid droplet-specific capsule is present in rat adrenal cells: evidence from a monoclonal antibody.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 217:81-88, 1995.

[25] Wang SM, Fong TH, Hsu SY, Chien CL and Wu JC. *Reorganization of a novel vimentin-vimentin-associated protein in 3T3-L1 cells during adipose conversion*. J. Cell. Biochem. 67:84-91, 1997.

