

家兔前体脂肪细胞分化不同时期基因表达谱分析

杜坤, 毛初阳, 任安勇, 吴雪梅, 李庆玲, 陈婷婷, 陈仕毅, 赖松家

四川农业大学, 畜禽遗传资源发掘与创新利用四川省重点实验室, 成都 611130

摘要: 脂肪的过度积累严重危害人类健康。前体脂肪细胞分化是脂肪发育的关键过程, 研究前体脂肪细胞分化相关基因的表达有助于认识脂肪沉积的机理。尽管家兔是一种理想的研究脂肪发育的动物模型, 但是针对其前体脂肪细胞分化不同时期基因表达谱的研究鲜见报道。本研究通过诱导家兔前体脂肪细胞分化, 在分化第 0 d、3 d 和 9 d 收集脂肪细胞, 利用转录组测序(RNA-seq), 在分化第 3 d 样本与第 0 d 样本的比较中筛选出 1352 个差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 在分化第 9 d 样本与第 3 d 样本的比较中筛选出 888 个 DEGs。GO (gene ontology)功能富集和 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes)通路分析发现, 0~3 d 分化期上调的 DEGs 显著富集在 *PPAR* 信号通路和 *PI3K-Akt* 信号通路上, 3~9 d 分化期上调的 DEGs 显著富集到与细胞周期调控有关的 GO 条目和 KEGG 信号通路, 0~3 d 和 3~9 d 阶段特异上调的 DEGs 可能分别作用于细胞质和细胞核。通过 DEGs 的蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络分析发现, 筛选出的核心节点(hub node)基因可能通过调控细胞周期而影响家兔前体脂肪细胞分化。

关键词: 脂肪细胞; 分化; 家兔; 前体脂肪细胞; RNA-seq

Analysis of gene expression profiles at different stages during preadipocyte differentiation in rabbits

Kun Du, Chuyang Mao, Anyong Ren, Xuemei Wu, Qingling Li, Tingting Chen, Shiyi Chen, Songjia Lai

Farm Animal Genetic Resources Exploration and Innovation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

Abstract: Excessive accumulation of fat is harmful to human health. The preadipocyte differentiation is a critical process of fat development. Studying the expression profiles of genes related to preadipocyte differentiation contributes to understanding of the mechanism of fat accumulation. Despite being considered an ideal animal model for studying adipogenesis, little is known about the gene expression profiles at different stages during preadipocyte differentiation in rabbits. In the present study, rabbit preadipocytes were cultured *in vitro* and induced for differentiation, and gene expression

收稿日期: 2019-09-04; 修回日期: 2019-12-11

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设项目(编号: CARS-44-A-2)资助[Supported by the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (No. CARS-44-A-2)]

作者简介: 杜坤, 硕士研究生, 专业方向: 动物遗传育种与繁殖。E-mail: 303160294@qq.com

通讯作者: 赖松家, 博士, 教授, 研究方向: 分子遗传与动物育种。E-mail: laisj5794@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.19-265

网络出版时间: 2020/1/14 10:19:28

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20200113.1723.002.html>

profiles of adipocytes collected at days 0, 3, and 9 of differentiation were analyzed by RNA-seq. We identified 1352 differentially expressed genes (DEGs) when comparing day 3 with day 0 and identified 888 DEGs when comparing day 9 with day 3. Gene Ontology (GO) enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis showed that the *PPAR* signaling pathway and *PI3K-Akt* signaling pathway were significantly enriched by the DEGs that up-regulated within the period of day 0 – day 3, and the GO terms and KEGG pathways that were associated with cell cycle were enriched by the DEGs that up-regulated within the period of day 3 – day 9. The DEGs that specifically up-regulated within the period of day 0 – day 3 might play roles in the cytoplasm, and the DEGs that specifically up-regulated within the period of day 3 – day 9 might act in the nucleus. The protein-protein interaction (PPI) network constructed by DEGs showed that hub node genes might modulate rabbit preadipocyte differentiation via regulating cell cycle.

Keywords: adipocytes; differentiation; rabbits; preadipocytes; RNA-seq

人体脂肪的过度积累与 2 型糖尿病和心脑血管疾病的形成密切相关^[1,2], 严重威胁人类健康。脂肪组织结构复杂, 具有高度的活性和内分泌功能, 其发育过程在细胞水平上主要体现为前体脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞^[3], 该过程伴随着脂肪细胞体积的增大和脂质的逐渐累积^[4], 是脂肪发育的关键过程。前体脂肪细胞分化过程十分复杂, 受多种激素、信号通路和细胞间通信等因素的综合调控^[5~7]。尽管目前对前体脂肪细胞分化过程的具体调控机理尚不完全清楚, 但是人们普遍认为 *PPARG* (peroxisome proliferator activated receptor gamma)^[8,9]、*CEBPA* (CCAAT/Enhancer binding protein alpha)^[10] 和 *FABP* (fatty acid binding protein)^[11] 等转录因子在前体脂肪细胞分化启动过程中发挥重要作用。脂肪的生成需要大量的基因参与, 研究前体脂肪细胞分化相关基因的表达对于认识脂肪沉积具有重要意义。近年来, 研究证实了一些基因如 *KLF10*、*Wnt5a* 和 *STAT3* 等可以在特定分化阶段调控脂肪细胞分化^[12~14], 表明这些参与调控前体脂肪细胞分化基因的表达可能具有时间特异性。

家兔(*Oryctolagus cuniculus*)是一种重要的经济动物, 为人类提供肉品和皮毛消费。由于家兔在生长阶段相对于猪、牛、羊等家养动物具有相对较低的脂肪沉积, 因此家兔也是一种理想的研究脂肪发育的动物模型^[15~17]。然而, 针对家兔前体脂肪细胞分化不同时期的基因表达谱的研究却鲜见报道。

为了研究家兔前体脂肪细胞分化不同时期的基因表达谱, 本研究通过经典的鸡尾酒法(IBM-DEX-insulin, MDI)诱导家兔前体脂肪细胞分化为成

熟脂肪细胞^[18], 收集分化第 0 d、3 d 和 9 d 的脂肪细胞总 RNA, 通过高通量转录组测序(RNA-seq)对基因的表达量进行了检测, 分别在 0~3 d 和 3~9 d 分化阶段筛选出差异常表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 然后利用生物信息学分析预测在对应阶段中表达上调的基因在家兔前体脂肪细胞分化过程中可能的功能和参与的信号通路。通过进一步分析 DEGs 在 0 d、3 d 和 9 d 表达量的变化, 分别筛选出在 0~3 d 分化阶段特异上调表达(0~3 d 表达显著上调, 而 3~9 d 表达显著下调)和 3~9 d 分化阶段特异上调表达(0~3 d 表达显著下调, 而 3~9 d 表达显著上调)的 DEGs, 并预测这些特异上调表达基因可能的功能和参与的信号通路。最后使用在线蛋白分析工具分别构建了家兔前体脂肪细胞在 0~3 d 和 3~9 d 分化阶段 DEGs 的蛋白-蛋白互作网络, 预测这两个分化阶段的核心节点(hub node)基因。本研究为更好地了解家兔前体脂肪细胞的分化提供转录数据参考。

1 材料与方法

1.1 家兔前体脂肪细胞的原代培养和诱导分化

本研究所用的新生幼年新西兰白兔来自四川农业大学雅安校区兔场。在无菌条件下, 从幼年兔(<3 d)的肾周部位取脂肪组织, 剔除其结缔组织和血管后, 将脂肪组织剪碎成碎末状, 使用 0.1% 的胶原蛋白酶(美国 ThermoFisher 公司)消化。待脂肪组织被消化成乳糜状, 使用孔径为 70 μm 的细胞筛过滤, 留下液体, 离心倒掉上清液后使用 PBS 清洗脂肪细胞 3

次, 接种于生长培养基(90% DME/F12, 10% FBS) (DME/F12 购自美国 ThermoFisher 公司; FBS 购自美国 ZETA LIFE 公司)中并置于含 5%CO₂、37 的培养箱中培养, 2~3 d 后对细胞传代。待原代脂肪细胞生长密度达到 80%~90%时, 弃掉生长培养基, 加入诱导分化培养基(90% DME/F12, 10% FBS, 500 μmol/L 的 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤, 1.7 μmol/L 的胰岛素, 1 μmol/L 的地塞米松)(3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、胰岛素和地塞米松均购自北京索莱宝生物公司)诱导分化 72 h 后, 更换维持分化培养基(90% DME/F12, 10% FBS, 1.7 μmol/L 的胰岛素)继续分化培养 72 h, 最后使用生长培养基培养至细胞完全分化。

1.2 油红 O 染色、样本收集和甘油三酯测定

使用油红 O (美国 Sigma 公司)染色鉴定脂肪细胞的脂质累积状况, 之后使用异丙醇溶解染色后的细胞, 在 510 nm 波长下测定溶解液的吸光度(OD 值), OD 值用于对油红 O 染色的量化。根据家兔脂肪细胞油红 O 染色的 3 种不同表型(几乎没有脂滴, 出现花环状的脂滴, 以及出现成簇的大脂滴), 在诱导分化第 0 d (D0 组)、3 d (D3 组)和 9 d (D9 组)收获脂肪细胞, 每组设置 3 个生物学重复, 共 9 个样本, 提取总 RNA 用于转录组测序。使用甘油三酯(TG)测定试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)并按照其使用说明书, 测定家兔前体脂肪细胞分化第 0 d、3 d 和 9 d 的细胞 TG 含量, 每组设置 3 个生物学重复。

1.3 总 RNA 提取、文库构建及测序

使用 Trizol 试剂盒(美国 ThermoFisher 公司)并按照其操作说明书提取样本总 RNA。RNA 质量检测合格后, 在干冰(-80)保存下, 由江西海普洛斯生物科技有限公司构建去除核糖体 RNA 的链特异性文库。文库质量检测合格后, 在 Illumina Hiseq X 平台上对文库进行上机测序, 最终获得双端 150 bp 的原始读段。

1.4 基因的定量以及差异表达分析

使用 Fastp 软件^[19]对原始读段进行质量过滤, 然后使用 Hisat2^[20]将过滤后剩下的高质量读段比对

到家兔参考基因组上。使用 Stringtie 软件^[21]计算每个基因在每个样本中的表达量(fragment per kilobase of transcript per million mapped reads, FPKM)和比对到基因序列上的读段数目。基于每个基因序列比对上的读段数, 使用 DESeq2 软件^[22]检测 D3 vs. D0 和 D9 vs. D3 的 DEGs, 同时满足以下两个条件的基因被判定为 DEGs: (1)在组与组之间的比较中, log₂(fold-change)的绝对值大于 2; (2)在组与组之间的比较中, $P_{adj}<0.01$ 。基于 FPKM 值, 使用 R 软件对样本和差异表达基因进行聚类。

1.5 qRT-PCR 验证

本研究利用 qRT-PCR 对 RNA-seq 获得的 DEGs 进行表达量的验证。随机选取 6 个 DEGs, 根据 Ensemble (<http://asia.ensembl.org/index.html>)提供的 mRNA 序列, 使用在线的引物设计软件 primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)进行荧光定量引物的设计(附表 1)。使用反转录试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)将总 RNA 反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板在 Bio-Rad CFX 仪器上进行两步法 qRT-PCR 扩增。反应条件: 95°C 10 s; 95°C 5 s, 59°C 20 s, 40 个循环。扩增结束后在 55~95°C 区间以 0.5°C 为上升率绘制溶解曲线。以 GAPDH 为内参, 使用 2^{-ΔΔCt}法计算目的基因的相对表达量。

1.6 功能富集和通路分析

使用 DAVID 在线数据库^[23]进行 GO (gene ontology)功能富集和 KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)通路分析。对于富集到的 GO 条目和 KEGG 通路, $P<0.05$ 被视为具有统计学意义。

1.7 蛋白-蛋白互作分析

将得到的 DEGs 输入在线的 STRING 数据库^[24], 设置蛋白互作置信分数 0.7 作为阈值(置信分数>0.7), 分别构建 D3 vs. D0 和 D9 vs. D3 的 DEGs 蛋白-蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 网络。CytoHubba 插件^[25]用于筛选在 PPI 网络中的核心节点基因, 使用 Cytoscape 软件^[26]进行图形的可视化展示。

1.8 统计分析

统计分析由 R 程序实现, 两尾 t 检验, $*P<0.05$ 表示差异显著, $**P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 家兔前体脂肪细胞的诱导分化

在家兔前体脂肪细胞诱导分化第 0 d、3 d 和 9 d 进行油红 O 染色, 脂质累积在这 3 个时期出现明显的表型差异: 在分化的第 0 d 只观察到有少量的脂滴, 在分化的第 3 d 出现花环状的脂滴, 在分化的第 9 d 出现成簇的大脂滴(图 1A)。油红 O 染色的量化结果(图 1B)和甘油三酯测定结果(图 1C)也显示, 脂质累积在家兔前体脂肪细胞诱导分化后的第 3 d 和第 9 d 显著升高。

2.2 基因的定量分析及 DEGs 的筛选

通过诱导家兔前体脂肪细胞分化, 在分化的第 0 d、3 d 和 9 d 收集脂肪细胞总 RNA, 每组设置 3 个生物学重复(样本编号: D0-1、D0-2、D0-3、D3-1、D3-2、D3-3、D9-1、D9-2 和 D9-3), 进行 RNA-seq。对 RNA-seq 原始读段质量过滤后, 总共得到 155.03 Gb

(1 109 630 370 条读段)高质量的测序数据, 平均每个样本 17.22 Gb。对于每个样本的基因总体表达量, $\log_2(\text{FPKM}+1)$ 值集中在 0~3 (图 2A)。在家兔前体脂肪细胞分化 0~3 d 阶段检测到 665 个基因表达显著上调, 687 个基因表达显著下调(图 2B)。在分化 3~9 d 阶段检测到 515 个基因表达显著上调, 373 个基因表达显著下调(图 2C)。

2.3 DEGs 表达量的 qRT-PCR 验证

为了验证 RNA-seq 的分析结果, 本研究通过 qRT-PCR 验证了随机选取的 6 个 DEGs 的表达量。结果显示, 所有的 6 个 DEGs(*ENSOCUG00000005133*、*PPARG*、*FABP4*、*CSRP2*、*ADIPOR2* 和 *IL1R1*)的 qRT-PCR 定量结果与 RNA-seq 定量结果(FPKM)有相似的表达模式(图 3)。因此, 本研究通过 RNA-seq 得到的基因表达量有较高的可靠性。

2.4 上调基因的功能富集和信号通路分析

在 0~3 d 表达上调的 DEGs 显著富集到 603 个 GO 条目, 根据 GO 条目 P 值分别在生物过程(biological processes, BP)、细胞组分(cellular components, CC)和分子功能(molecular functions, MF)中均筛选出富集显著性最高的 10 个 GO 条目(图 4A)。在 BP

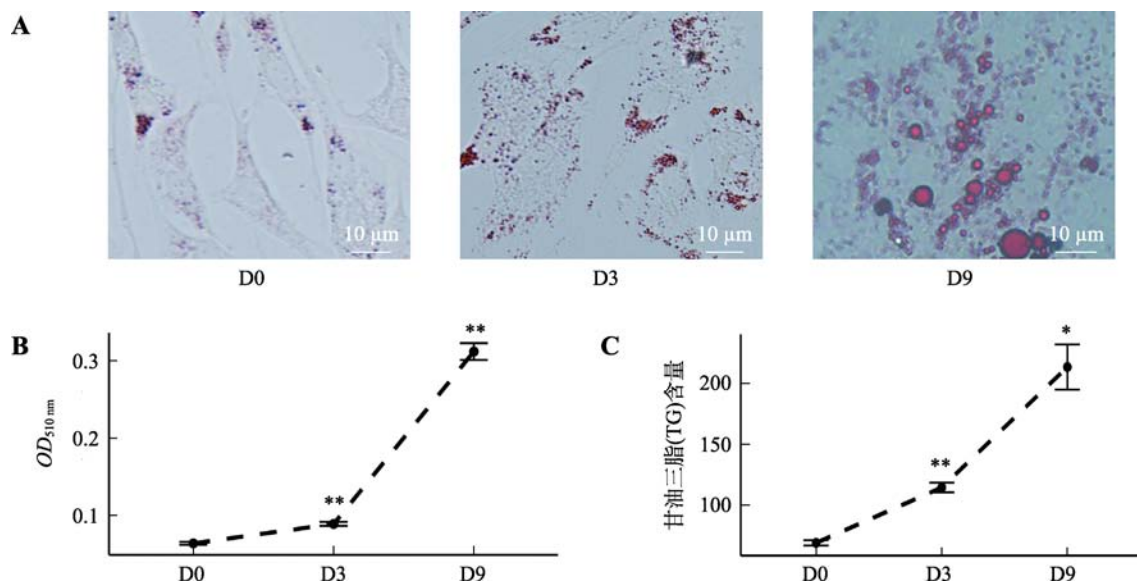


图 1 家兔前体脂肪细胞的分化

Fig. 1 Differentiation of rabbit preadipocytes

A: 诱导分化第 0 d、3 d 和 9 d 细胞油红 O 染色结果; B: 油红 O 染色量化结果; C: 甘油三酯测定结果。D0: 分化第 0 d 样本; D3: 分化第 3 d 样本; D9: 分化第 9 d 样本。*表示与 D0 比较差异显著($P<0.05$), **表示与 D0 比较差异极显著($P<0.01$)。

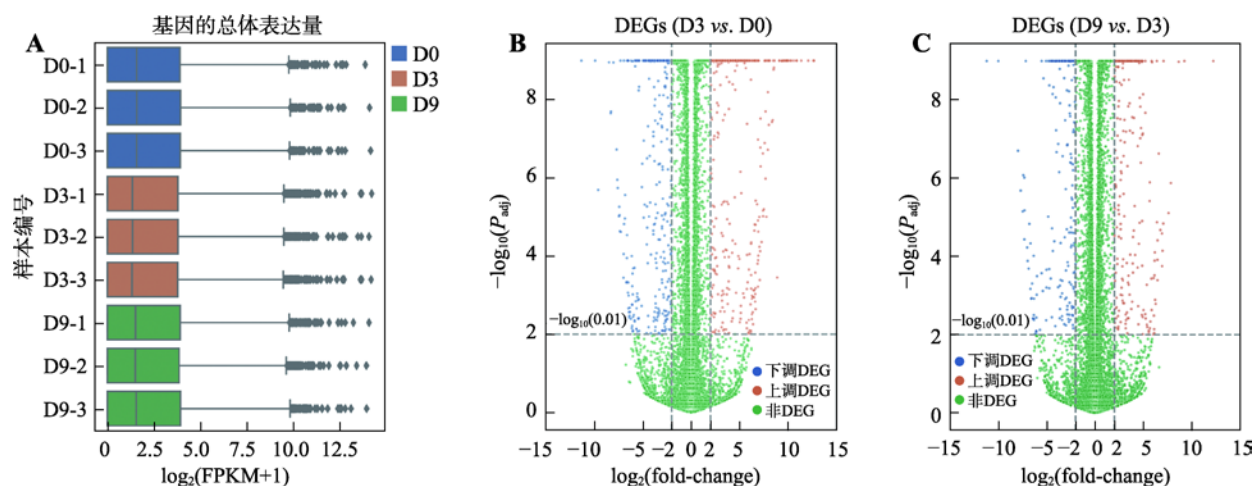


图2 基因的定量和差异表达分析

Fig. 2 Quantitative and differential expression analysis of genes

A: D0、D3、D9 各样本基因的总表达量; B: D3 vs. D0 基因差异表达分析; C: D9 vs. D3 基因差异表达分析。D0: 分化第 0 d 样本; D3: 分化第 3 d 样本; D9: 分化第 9 d 样本。

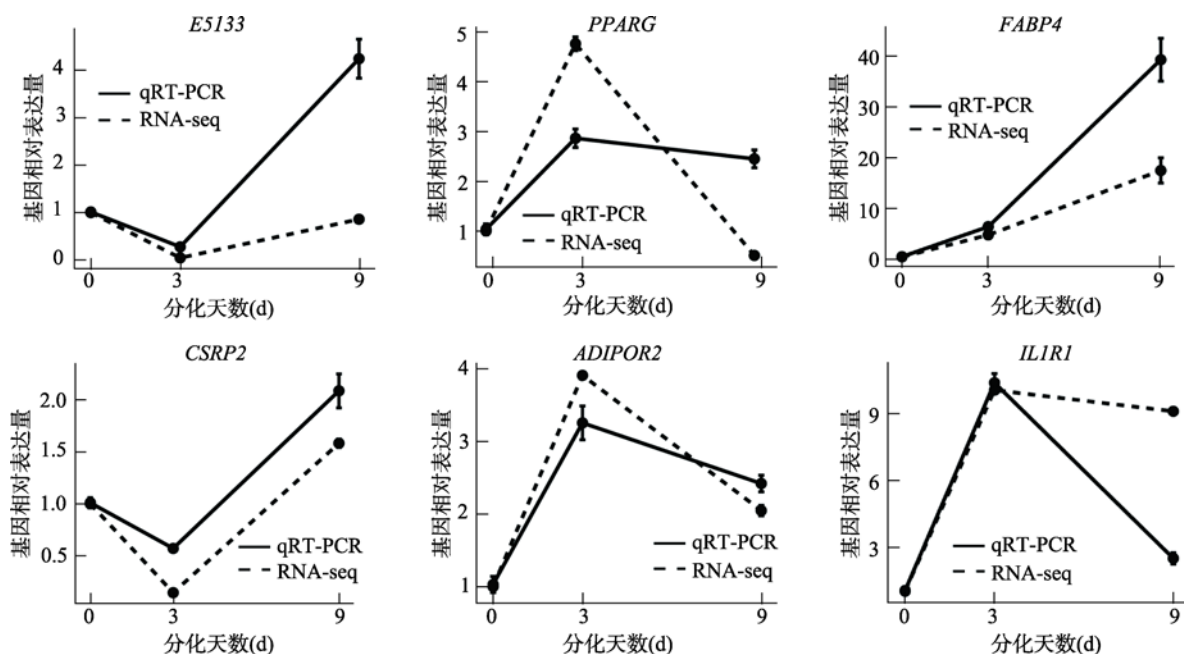


图3 qRT-PCR 对随机选取的 6 个 DEGs 的表达量验证

Fig. 3 Expression validation of six randomly selected DEGs using qRT-PCR

E5133: ENSOCUG00000005133。

分类中显著性最高的 3 个 GO 条目为细胞的化学刺激反应、细胞对有机物质的反应和酶联受体蛋白信号通路; 在 CC 分类中显著性最高的 3 个 GO 条目为细胞外间隙、细胞外区域和细胞外区部分; 在 MF 分类中显著性最高的 3 个 GO 条目为激素结合、硫化物结合和跨膜受体蛋白激酶激活。KEGG 信号

通路分析发现在 0~3 d 表达上调的 DEGs 显著富集到 24 个 KEGG 信号通路。在富集显著性最高的 10 个 KEGG 信号通路中(图 4B), 显著性最高的 3 个 KEGG 信号通路为细胞色素 P450 对外源物的代谢的影响、PPAR 信号通路和 PI3K-Akt 信号通路。

在 3~9 d 表达上调的 DEGs 显著富集到 310 个

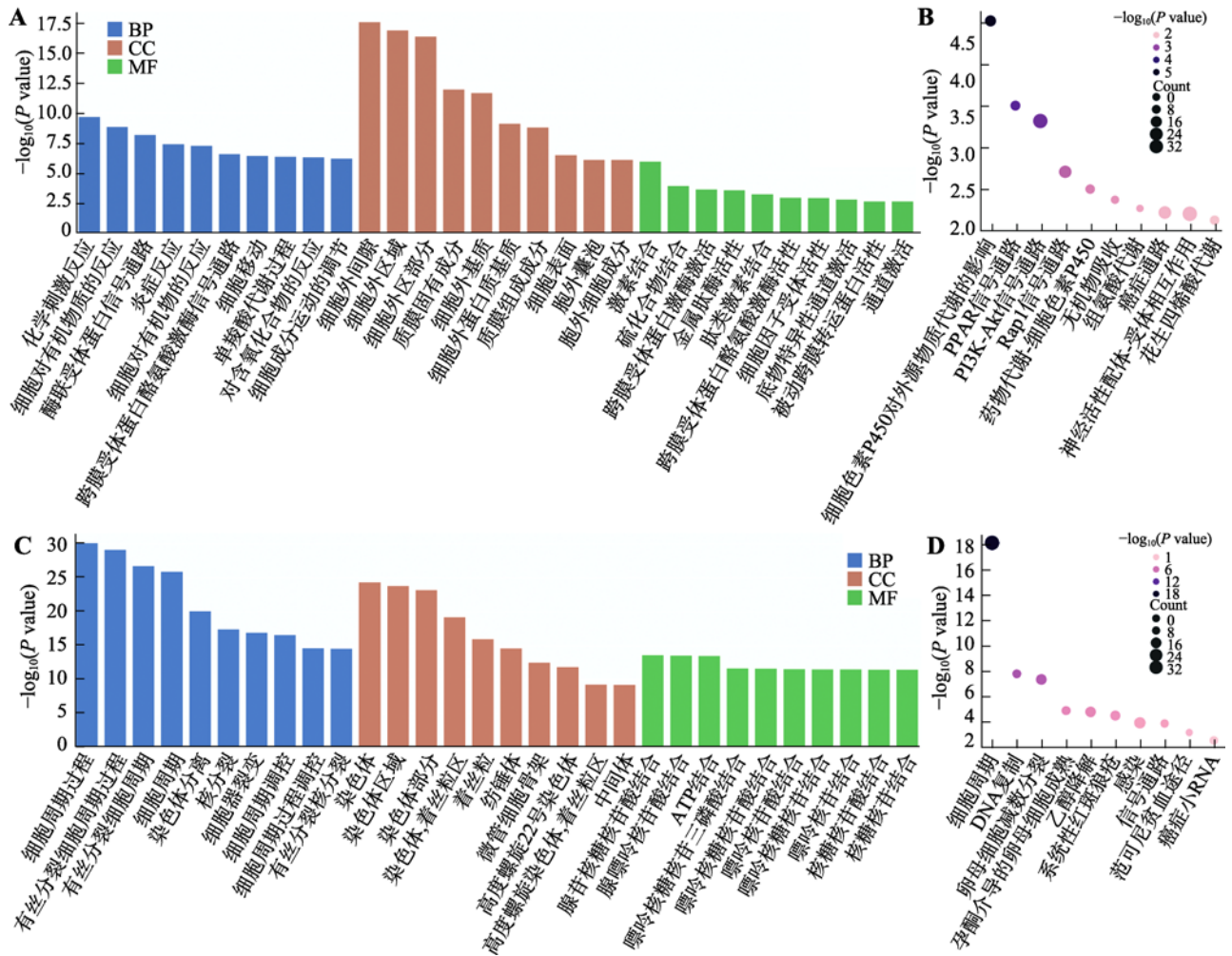


图 4 表达上调 DEGs 的 GO 功能富集和 KEGG 通路分析

Fig. 4 GO functional enrichment and KEGG pathway analysis of up-regulated DEGs

A: 0~3 d 上调的 DEGs 分别在 BP、CC 和 MF 中富集显著性最高的 GO 条目(每个分类各 10 个); B: 0~3 d 上调的 DEGs 富集显著性最高的 10 个 KEGG 通路; C: 3~9 d 上调的 DEGs 分别在 BP、CC 和 MF 中富集显著性最高的 GO 条目(每个分类各 10 个); D: 3~9 d 上调的 DEGs 富集显著性最高的 10 个 KEGG 通路。

GO 条目, 根据 GO 条目 P 值分别在 BP、CC 和 MF 中均筛选出富集显著性最高的 10 个 GO 条目(图 4C)。在 BP 分类中显著性最高的 3 个 GO 条目为细胞周期过程、有丝分裂细胞周期过程和有丝分裂细胞周期; 在 CC 分类中显著性最高的 3 个 GO 条目为染色体、染色体区域和染色体部分; 在 MF 分类中显著性最高的 3 个 GO 条目为腺苷核糖核苷酸结合、腺嘌呤核苷酸结合和 ATP 结合。KEGG 通路分析发现 3~9 d 表达显著上调的 DEGs 显著富集到 19 个信号通路, 在富集显著性最高的 10 个 KEGG 信号通路中(图 4D), 显著性最高的 3 个 KEGG 信号通路为细胞周期、DNA 复制和卵母细胞减数分裂。

2.5 DEGs 的表达量分析

对家兔前体脂肪细胞分化过程中所有 DEGs 进行表达量聚类分析, 发现分化第 0 d 的 3 个样本 D0-1、D0-2 和 D0-3 形成独立的簇, 分化第 3 d 的 3 个样本 D3-1、D3-2 和 D3-3 形成独立的簇, 分化第 9 d 的 3 个样本 D9-1、D9-2 和 D9-3 形成独立的簇(图 5A), 说明同组样品间的基因表达相关性很高。在 1352 个 0~3 d 分化阶段的 DEGs 中, 有 601 个在 3~9 d 阶段也呈现差异表达(图 5B), 统计每个基因在各阶段的表达量, 可以将这 601 个 DEGs 分为 3 类: 第一类是表达量在 0~3 d 和 3~9 d 中都显著上调, 或者 0~3 d

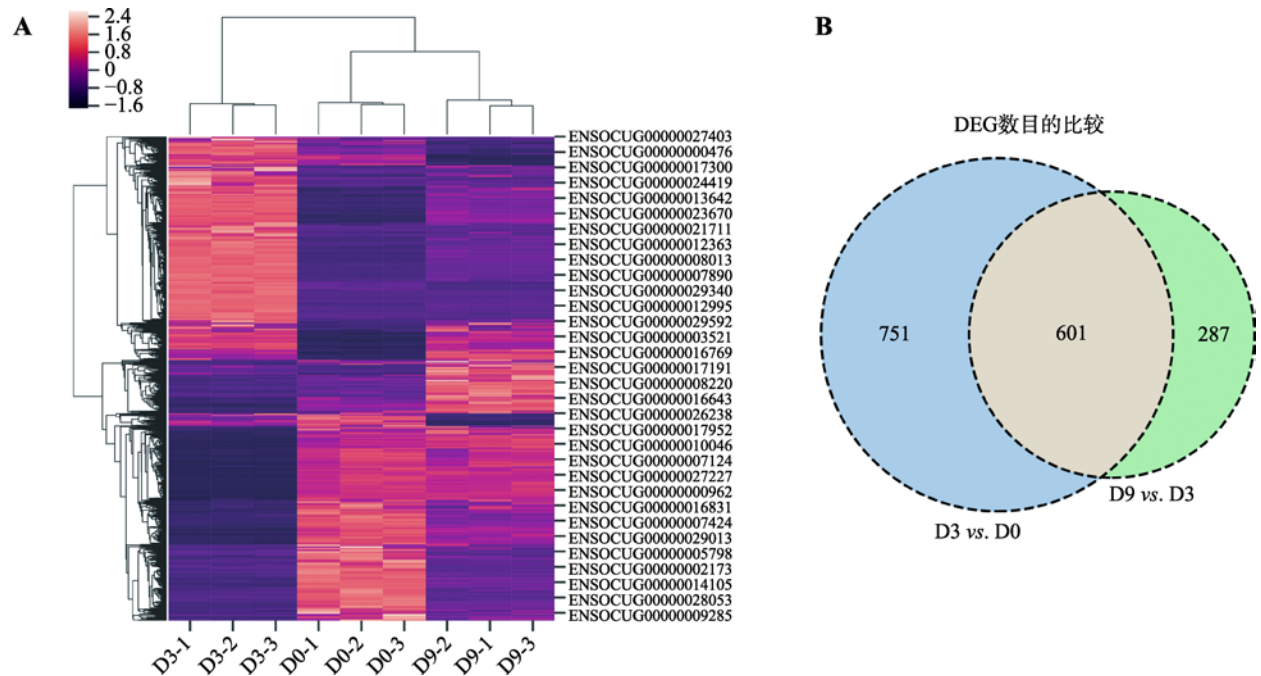


图 5 聚类分析和不同阶段 DEGs 数量比较

Fig. 5 Clustering analysis and the comparing of DEGs number at different stages

A: 基于 FPKM 值对样本和差异表达基因进行聚类分析(颜色由暗到亮表示表达量由低到高); B: D3 vs. D0 和 D9 vs. D3 差异基因数目的比较。

和 3~9 d 都显著下调的 DEGs (8 个); 第二类是在分化 0~3 d 表达量显著上调而在分化 3~9 d 表达量显著下调的 DEGs (212 个); 第三类是在分化 0~3 d 表达量显著下调而在 3~9 d 表达量显著上调的 DEGs (381 个)。

2.6 特异上调表达基因的功能富集和信号通路分析

对 0~3 d 表达显著上调, 而在 3~9 d 表达显著下调的 212 个 DEGs 进行 GO 富集分析, 发现这些基因显著富集到 177 个 GO 条目, 根据 GO 条目 *P* 值分别在 BP、CC 和 MF 中均筛选出富集显著性最高的 10 个 GO 条目(图 6A)。在 BP 分类中显著性最高的 3 个 GO 条目为脂肪生物合成过程、小分子生物合成过程和单羧酸代谢过程; 在 CC 分类中显著性最高的 3 个 GO 条目为细胞外基质、细胞外区域部分和细胞外区域; 在 MF 分类中显著性最高的 3 个 GO 条目为金属肽酶活性、过渡金属离子结合和 GTP 结合。KEGG 通路分析发现这些基因显著富集到 12 个信号通路, 在富集显著性最高的 10 个 KEGG 信

号通路中(图 6B), 显著性最高的 3 个 KEGG 信号通路为络氨酸代谢、组氨酸代谢和代谢通路。

对 0~3 d 表达显著下调, 而在 3~9 d 表达显著上调的 381 个 DEGs 进行 GO 富集分析, 发现这些基因显著富集到 304 个 GO 条目, 根据 GO 条目 *P* 值分别在 BP、CC 和 MF 中均筛选出富集显著性最高的 10 个 GO 条目(图 6C)。在 BP 分类中显著性最高的 3 个 GO 条目为细胞周期过程、有丝分裂细胞周期过程和有丝分裂细胞周期; 在 CC 分类中显著性最高的 3 个 GO 条目为染色体、染色体区域和染色体部分; 在 MF 分类中显著性最高的 3 个 GO 条目为 ATP 结合、腺苷核糖核苷酸结合和嘌呤核糖核苷三磷酸结合。KEGG 信号通路分析发现这些基因显著富集到 15 个信号通路, 在富集显著性最高的 10 个信号通路中(图 6D), 显著性最高的 3 个通路为细胞周期、DNA 复制和卵母细胞减数分裂。

2.7 蛋白-蛋白互作分析

将 1352 个 0~3 d 分化阶段筛选出的 DEGs 提交到 STRING 数据库, 得到家兔前体脂肪细胞在分化

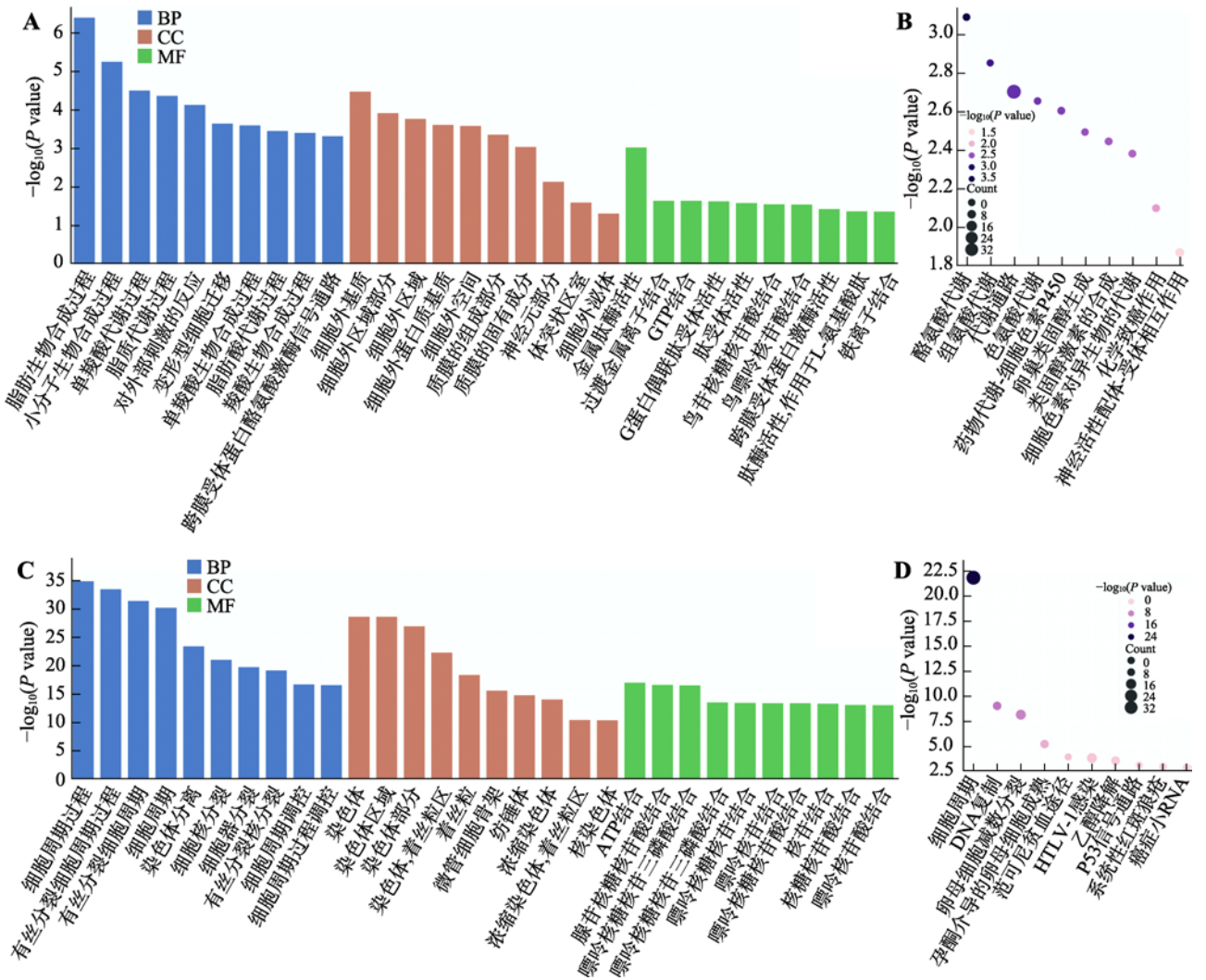


图 6 特异上调表达基因的 GO 功能富集和 KEGG 通路分析

Fig. 6 GO functional enrichment and KEGG pathway analysis of specifically up-regulated genes

A: 0~3 d 特异上调的 DEGs 分别在 BP、CC 和 MF 中富集显著性最高的 GO 条目(每个类别各 10 个); B: 0~3 d 特异上调的 DEGs 富集显著性最高的 10 个 KEGG 通路; C: 3~9 d 特异上调的 DEGs 分别在 BP、CC 和 MF 中富集显著性最高的 10 个 GO 条目(每个类别各 10 个); D: 3~9 d 特异上调的 DEGs 富集显著性最高的 10 个 KEGG 通路。

0~3 d 的蛋白互作网络 PPI_{03} , PPI_{03} 包含 1352 个节点 (node) 和 4427 条边 (edge)。使用 CytoHubba 筛选出在 PPI_{03} 中排名 (degree) 前 10 的核心节点, 这些核心节点基因包括 *TOP2A*、*KIF11*、*BUB1*、*CDC20*、*CDCA8*、*AURKB*、*CDK1*、*CCNB2*、*PLK1* 和 *CCNB1* (图 7A)。

同样, 本研究得到 3~9 d 分化阶段 DEGs 的蛋白互作网络 PPI_{39} , PPI_{39} 包含 888 个节点和 3475 条边。在 PPI_{39} 中排名前 10 的核心节点基因包括 *CCNB1*、*CCNB2*、*CDK1*、*KIF11*、*BUB1B*、*BUB1*、

NDC80、*CDC20*、*ASPM* 和 *AURKA* (图 7B)。

3 讨论

肥胖是一种慢性疾病, 严重影响人类的身体健康和生活。研究前体脂肪细胞分化有助于理解肥胖成因。目前, RNA-seq 已被广泛用于分析全基因组范围的基因时空表达^[27]。本研究使用经典的 MDI 法诱导家兔前体脂肪细胞成脂分化^[18], 油红 O 染色结果和 TG 测定结果显示随着分化天数增加, 脂质

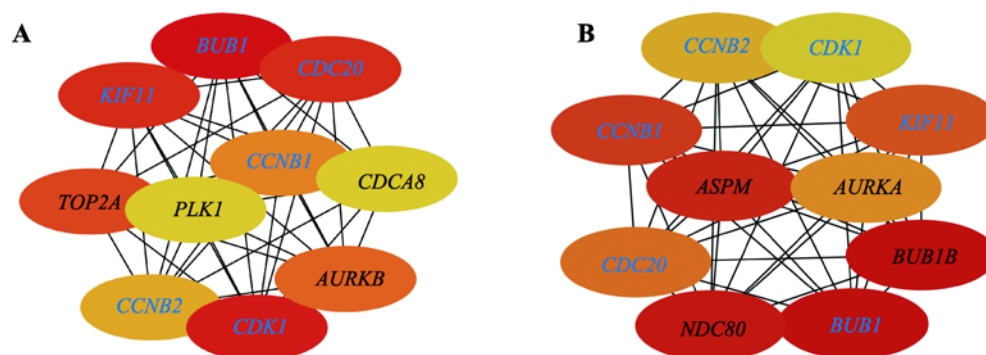


图7 PPI网络核心节点基因的筛选

Fig. 7 Hub genes screening from the PPI network

A: PPI₀₃筛选的核心节点基因; B: PPI₃₉筛选出的核心节点基因。在两个PPI网络中都能筛选到的基因用蓝色字体表示。

累积显著上升。在分化第9 d,能观察到许多成簇的大脂滴,表明得到了成熟脂肪细胞。通过生物信息学分析,在分化第0、3和9 d,获得了家兔前体脂肪细胞的基因表达谱,基于严格的过滤,分别在分化0~3 d和3~9 d筛选出1352个和888个DEGs。

本研究中,通过对家兔前体脂肪细胞分化0~3 d显著上调基因的GO富集,发现这些上调基因参与到细胞对外源刺激的响应、分化过程的正调节和与脂质合成相关的多个生物过程。在前体脂肪细胞增殖融合后,通过MDI法诱导前体脂肪细胞成脂分化,MDI主要成分为胰岛素、地塞米松和3-异丁基-1-甲基黄嘌呤,细胞在接收到这些有机物信号后,被诱导进入到分化阶段。在0~3 d富集到分化过程正调节生物过程的DEGs有*IGF1*和*GDF5*在内的34个基因,其中*IGF1*被报道可以通过多种途径调节细胞分化^[28~30]。*GDF5*被称为生长分化因子5,被报道不仅可以促进棕色脂肪细胞,而且也是促进3T3-L1脂肪细胞分化的关键基因^[31]。*IGF1*和*GDF5*在家兔前体脂肪细胞分化0~3 d表达显著上调,表明*IGF1*和*GDF5*也可能是调控家兔前体脂肪细胞分化的关键基因。脂肪发育伴随着脂质合成、脂肪酸合成和脂肪酸代谢等过程,本研究中,与这些生物过程相关的基因在0~3 d表达显著上调,说明家兔前体脂肪细胞在0~3 d被成功诱导进入到分化期。在分子功能上,0~3 d表达上调的DEGs显著富集到细胞信号传导有关的GO条目,如跨膜受体蛋白激酶激活、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、被动跨膜转运蛋白活性和G蛋白偶联受体活性。细胞信号转导是膜蛋白的重要功能,膜蛋白的激活可能和家兔前体脂

肪细胞分化过程中富集到的一些活跃的信号通路有关。在KEGG信号通路方面,0~3 d表达上调的DEGs显著富集到PPAR信号通路和PI3K-Akt信号通路,这两条信号通路在人和小鼠上被多次报道与脂肪发育相关^[32~34],说明家兔前体脂肪细胞在0~3 d分化期与其他动物的脂肪发育有一定相似性。细胞周期的调控与脂肪沉积关系密切^[29],3~9 d分化期上调的DEGs显著富集到的GO条目包括细胞周期过程、有丝分裂细胞周期过程和有丝分裂周期,以及KEGG细胞周期信号通路,富集到这些条目和信号通路的DEGs包括*CDK1*、*PLK1*和*BUB1*等。其中*CDK1*和*PLK1*被报道在高脂饲养的肉鸡的腹脂中表达上调,参与鸡的脂质累积^[35]。推测家兔前体脂肪细胞在3~9 d分化期可能通过促进调控细胞周期蛋白的基因表达来维持脂肪细胞分化。

通过表达量的分析,本研究筛选出在0~3 d中特异上调表达的基因为212个,在3~9 d特异上调表达的基因为381个。对0~3 d特异上调表达基因进行GO功能富集,发现这些基因显著富集到脂质合成、脂质代谢过程和脂肪酸代谢过程等GO条目,注释到这些条目的基因如*FGF-1*在人前体脂肪细胞中可以促进脂肪的生成^[32,36],而*FGF-1*是否可以促进家兔前体脂肪细胞的分化需要相关的实验进行验证。在GO富集结果的细胞组分分类中,0~3 d分化期特异上调的基因富集到如细胞外基质、细胞外区域和细胞外的外泌体等GO条目,而在3~9 d分化期特异上调的基因富集到染色体、染色体区域、着丝粒区域和染色质等核区相关的GO条目。因此,推测一些0~3 d分化期特异上调的基因在细胞中作用

的位置可能是细胞质, 而 3~9 d 分化期特异上调的基因在细胞中作用的位置可能是细胞核。在 3~9 d 分化期特异上调的基因富集到 *p53* 信号通路, 有研究报道 *p53* 基因的敲除可以促进脂肪生成和脂肪标志基因的表达^[37], 但 *p53* 信号通路与家兔前体脂肪细胞的后期分化的关联机制需要进一步的实验验证。

通过 PPI_{03} 网络的构建, 筛选出家兔前体脂肪细胞分化 0~3 d 的 10 个核心节点基因, 包括 *TOP2A*、*KIF11*、*BUB1*、*CDC20*、*CDCA8*、*AURKB*、*CDK1*、*CCNB2*、*PLK1* 和 *CCNB1*。其中, *CDK1* 被称为细胞周期蛋白依赖性激酶 1。*TOP2A* 被称为 DNA 拓扑异构酶, 在转录过程中控制和改变 DNA 拓扑状态。*BUB1* 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。*PLK1* 被称为 Polo 样激酶 1, 是一种广泛存在于真核生物中, 具有高度保守性的丝氨酸/苏氨酸激酶。*CDC20* 是细胞分裂的必须调节因子。*CDCA8* 被称为细胞分裂周期蛋白 8, 在有丝分裂中扮演重要角色。*AURKB* 被称为极光激酶 B, 是一类重要的丝氨酸/苏氨酸激酶。*CCNB1* 和 *CCNB2* 分别被称为细胞周期蛋白 1 和细胞周期蛋白 2。这些基因都是调控细胞周期的关键基因, 而细胞周期的调控与细胞的命运密切相关^[38], 且可以影响干细胞的多能性和分化潜能^[39,40], 如 Lee 等^[41]报道 *CDK1* 基因表达被抑制可以使得 MDI 诱导的 3T3-L1 细胞脂肪形成受阻。*PLK1* 被报道可以通过 *CEBPA* 的抑制表达而介导癌症细胞的分化^[42], 本研究中, *PLK1* 在 0~3 d 的表达显著下调, *CEBPA* 表达显著上调, 推测 *PLK1* 可能被 *CEBPA* 抑制, 从而调控家兔前体脂肪细胞分化。在 PPI_{39} 网络中的 10 个核心节点基因包括 *CCNB1*、*CCNB2*、*CDK1*、*KIF11*、*BUB1B*、*BUB1*、*NDC80*、*CDC20*、*ASPM* 和 *AURKA*。其中, *ASPM* 被称为异常纺锤状小头畸形相关蛋白, 其被证实对神经干细胞的增殖和分化至关重要^[43], 但 *ASPM* 对前体脂肪细胞的增殖和分化是否具有调控作用仍需要通过相关的研究才能得以被证实。从 PPI 网络分析来看, 家兔前体脂肪细胞分化的 0~3 d 阶段和 3~9 d 阶段在 PPI 网络的核心节点基因上差异不大, 都可以通过调控细胞周期来促进家兔前体脂肪细胞的分化进程。然而, 目前关于这些核心节点基因的研究大多数建立在非脂肪细胞上, 它们调控家兔前体脂肪细胞分化的机理需要更深入地进行探索和验证。

附录:

附表 1 详见文章电子版 www.chinagene.cn。

参考文献(References):

- [1] Saxena A, Tiwari P, Wahi N, Soni A, Bansiwala RC, Kumar A, Sharma B, Punjabi P, Gupta N, Malik B, Medicherla KM, Suravajhala P, Mathur SK. Transcriptome profiling reveals association of peripheral adipose tissue pathology with type-2 diabetes in Asian Indians. *Adipocyte*, 2019, 8(1): 125–136. [DOI]
- [2] Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu CY, Vasan RS, Murabito JM, Meigs JB, Cupples LA, D'Agostino RB Sr, O'Donnell CJ. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: Association with metabolic risk factors in the framingham heart study. *Circulation*, 2007, 116(1): 39–48. [DOI]
- [3] Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(6): 2548–2556. [DOI]
- [4] Zhang T, Zhang XQ, Han KP, Zhang GX, Wang JY, Xie KZ, Xue Q. Genome-Wide analysis of lncRNA and mRNA expression during differentiation of abdominal preadipocytes in the chicken. *G3 (Bethesda)*, 2017, 7(3): 953–966. [DOI]
- [5] Zhang JW, Luo Y, Wang YH, He LJ, Li MZ, Wang X. MicroRNA regulates animal adipocyte differentiation. *Hereditas(Beijing)*, 2015, 37(12): 1175–1184. 张进威, 罗毅, 王宇豪, 何刘军, 李明洲, 王讯. MicroRNA 调控动物脂肪细胞分化研究进展. *遗传*, 2015, 37(12): 1175–1184. [DOI]
- [6] Lee MJ. Hormonal regulation of adipogenesis. *Compr Physiol*, 2017, 7(4): 1151–1195. [DOI]
- [7] Sarjeant K, Stephens JM. Adipogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(9): a008417. [DOI]
- [8] Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 1994, 79(7): 1147–1156. [DOI]
- [9] Wang L, Na W, Wang YX, Wang YB, Wang N, Wang QG, Li YM, Li H. Characterization of chicken PPAR γ expression and its impact on adipocyte proliferation and differentiation. *Hereditas(Beijing)*, 2012, 34(4): 454–464. 王丽, 那威, 王宇祥, 王彦博, 王宁, 王启贵, 李玉茂, 李辉. 鸡 PPAR γ 基因的表达特性及其对脂肪细胞增殖分化的影响. *遗传*, 2012, 34(4): 454–464. [DOI]
- [10] Lin FT, Lane MD. CCAAT/enhancer binding protein alpha

- is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(19): 8757–8761. [DOI]
- [11] Deng TM, Wang YH, Wang CC, Yan H. FABP4 silencing ameliorates hypoxia reoxygenation injury through the attenuation of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis by activating PI3K/Akt pathway. *Life Sci*, 2019, 224: 149–156. [DOI]
- [12] Liu Y, Peng WQ, Guo YY, Liu Y, Tang QQ, Guo L. Krüppel-like factor 10 (KLF10) is transactivated by the transcription factor C/EBP β and involved in early 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 2018, 293(36): 14012–14021. [DOI]
- [13] Tang Q, Chen C, Zhang Y, Dai MJ, Jiang YC, Wang H, Yu M, Jing W, Tian WD. Wnt5a regulates the cell proliferation and adipogenesis via MAPK-independent pathway in early stage of obesity. *Cell Biol Int*, 2018, 42(1): 63–74. [DOI]
- [14] Yuan YY, Xi Y, Chen JY, Zhu P, Kang JY, Zou ZQ, Wang FY, Bu SZ. STAT3 stimulates adipogenic stem cell proliferation and cooperates with HMGA2 during the early stage of differentiation to promote adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(4): 1360–1366. [DOI]
- [15] Desando G, Cavallo C, Sartoni F, Martini L, Parrilli A, Veronesi F, Fini M, Giardino R, Facchini A, Grigolo B. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Res Ther*, 2013, 15(1): R22. [DOI]
- [16] Gong LL, Wang C, Li YR, Sun QZ, Li GZ, Wang DR. Effects of human adipose-derived stem cells on the viability of rabbit random pattern flaps. *Cytotherapy*, 2014, 16(4): 496–507. [DOI]
- [17] Maneschi E, Vignozzi L, Morelli A, Mello T, Filippi S, Cellai I, Comeglio P, Sarchielli E, Calcagno A, Mazzanti B, Vettor R, Vannelli GB, Adorini L, Maggi M. FXR activation normalizes insulin sensitivity in visceral preadipocytes of a rabbit model of MetS. *J Endocrinol*, 2013, 218(2): 215–231. [DOI]
- [18] Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem*, 2012, 425(1): 88–90. [DOI]
- [19] Chen SF, Zhou YQ, Chen YR, Gu J. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884–i890. [DOI]
- [20] Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 357–360. [DOI]
- [21] Pertea M, Kim D, Pertea GM, Leek JT, Salzberg SL. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, stringtie and ballgown. *Nat Protoc*, 2016, 11(9): 1650–1667. [DOI]
- [22] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, 2014, 15(12): 550. [DOI]
- [23] Huang Da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44–57. [DOI]
- [24] Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P, Jensen LJ, von Mering C. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D362–D368. [DOI]
- [25] Chin CH, Chen SH, Wu HH, Ho CW, Ko MT, Lin CY. CytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Syst Biol*, 2014, 8 (Suppl.4): S11. [DOI]
- [26] Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498–2504. [DOI]
- [27] Huang WL, Zhang XX, Li A, Miao XY. Identification of differentially expressed genes between subcutaneous and intramuscular adipose tissue of large white pig using RNA-seq. *Hereditas(Beijing)*, 2017, 39(6): 501–511. 黄万龙, 张秀秀, 李媛, 苗向阳. 利用 RNA-seq 技术筛选大白猪皮下和肌内脂肪组织差异表达基因. *遗传*, 2017, 39(6): 501–511. [DOI]
- [28] Chang HR, Kim HJ, Xu X, Ferrante AW Jr. Macrophage and adipocyte IGF1 maintain adipose tissue homeostasis during metabolic stresses. *Obesity (Silver Spring)*, 2016, 24(1): 172–183. [DOI]
- [29] Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem*, 2012, 81: 715–736. [DOI]
- [30] Hu L, Yang GD, Hägg D, Sun GM, Ahn JM, Jiang N, Ricupero CL, Wu J, Rodhe CH, Ascherman JA, Chen LL, Mao JJ. IGF1 promotes adipogenesis by a lineage bias of endogenous adipose stem/progenitor cells. *Stem Cells*, 2015, 33(8): 2483–2495. [DOI]
- [31] Pei Z, Yang Y, Kiess W, Sun CJ, Luo FH. Dynamic profile and adipogenic role of growth differentiation factor 5 (GDF5) in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 560: 27–35. [DOI]

- [32] Mota de Sá P, Richard AJ, Hang H, Stephens JM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Compr Physiol*, 2017, 7(2): 635–674. [DOI]
- [33] Świdarska E, Podolska M, Strycharz J, Szwed M, Abramczyk H, Brożek-Pluska B, Wróblewski A, Szemraj J, Majsterek I, Drzewoski J, Śliwińska A. Hyperglycemia changes expression of key adipogenesis markers (C/EBP α and PPAR γ) and morphology of differentiating Human visceral adipocytes. *Nutrients*, 2019, 11(8): E1835. [DOI]
- [34] Cai R, Tang GR, Zhang Q, Yong WL, Zhang WR, Xiao JY, Wei CS, He C, Yang GS, Pang WJ. A Novel lnc-RNA, Named lnc-ORA, Is identified by RNA-Seq analysis, and its knockdown inhibits adipogenesis by regulating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Cells*, 2019, 8(5): E477. [DOI]
- [35] Chen JH, Ren XY, Li LM, Lu SY, Cheng T, Tan LT, Liang SD, He DL, Luo QB, Nie QH, Zhang XQ, Luo W. The cell cycle pathway regulates chicken abdominal fat deposition as revealed by transcriptome sequencing. *Hereditas (Beijing)*, 2019, 41(10): 962–973.
陈家辉, 任学义, 李丽敏, 卢诗意, 程湉, 谭量天, 梁少东, 何丹林, 罗庆斌, 聂庆华, 张细权, 罗文. 转录组测序揭示细胞周期通路参与鸡腹脂沉积. *遗传*, 2019, 41(10): 962–973. [DOI]
- [36] He J, Chen DL, Samocha-Bonet D, Gillinder KR, Barclay JL, Magor GW, Perkins AC, Greenfield JR, Yang G, Whitehead JP. Fibroblast growth factor-1 (FGF-1) promotes adipogenesis by downregulation of carboxypeptidase A4 (CPA4) - a negative regulator of adipogenesis implicated in the modulation of local and systemic insulin sensitivity. *Growth Factors*, 2016, 34(5–6): 210–216. [DOI]
- [37] Huang Q, Liu ML, Du XL, Zhang RH, Xue Y, Zhang YY, Zhu WD, Li D, Zhao AL, Liu Y. Role of p53 in preadipocyte differentiation. *Cell Biol Int*, 2014, 38(12): 1384–1393. [DOI]
- [38] Dalton S. Linking the cell cycle to cell fate decisions. *Trends Cell Biol*, 2015, 25(10): 592–600. [DOI]
- [39] Soufi A, Dalton S. Cycling through developmental decisions: how cell cycle dynamics control pluripotency, differentiation and reprogramming. *Development*, 2016, 143(23): 4301–4311. [DOI]
- [40] Wu RF, Liu YH, Yao YX, Zhao YL, Bi Z, Jiang Q, Liu Q, Cai M, Wang FQ, Wang YZ, Wang XX. FTO regulates adipogenesis by controlling cell cycle progression via m⁶A-YTHDF2 dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018, 1863(10): 1323–1330. [DOI]
- [41] Lee Y, Yang H, Hur G, Yu J, Park S, Kim JH, Yoon Park JH, Shin HS, Kim JE, Lee KW. 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone, a metabolite of procyanidins in cacao, suppresses MDI-induced adipogenesis by regulating cell cycle progression through direct inhibition of CDK2/cyclin O. *Food Funct*, 2019, 10(5): 2958–2969. [DOI]
- [42] Dasgupta N, Thakur BK, Ta A, Das S, Banik G, Das S. Polo-like kinase 1 expression is suppressed by CCAAT/enhancer-binding protein α to mediate colon carcinoma cell differentiation and apoptosis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017, 1861(7): 1777–1787. [DOI]
- [43] Fujimori A, Itoh K, Goto S, Hirakawa H, Wang B, Kokubo T, Kito S, Tsukamoto S, Fushiki S. Disruption of *Aspm* causes microcephaly with abnormal neuronal differentiation. *Brain Dev*, 2014, 36(8): 661–669. [DOI]

(责任编辑: 李明洲)

附表 1 qRT-PCR 引物序列

Supplementary Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR in this study

序号	基因名	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
1	<i>GAPDH</i>	CTTCGGCATTGTGGAGGG	GGAGGCAGGGATGATGTTCT
2	<i>E5133</i>	GTAGCTTGAAAGAGCTCCACC	GTGCAGGATACTTCAGGAGC
3	<i>PPARG</i>	GAGGACATCCAGGACAACC	GTCCGTCTCCGTCTTCTTT
4	<i>FABP4</i>	GGCCAGGAATTTGATGAAGTC	AGTTTATCGCCCTCCCGTT
5	<i>CSRP2</i>	CGGGAGGACCGTGTACCAT	TGAGGCTGAACATGCATAGGA
6	<i>ADIPOR2</i>	GTTGCTGGGATACAGCCCTT	AGGTTCGAGTGTGCAGGAAG
7	<i>IL1R1</i>	AGCTTCCAGAACGGTGGATG	AGGCGCGAACACCTATTCA