文章编号:1000-5404(2014)09-0937-04

论著

表达谱芯片分析 KCTD15 对 3T3-L1 前体脂肪细胞的影响

张 鹏[1],金康宣[2],陈宇晟[2],徐梓辉[1,3] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院:内分泌科[1],中西医结合科[3];100029 北京,中国科学院北京基因组研究所重大疾病基因组和个体化医疗实验室[2])

[摘要] **目的** 通过筛选分析3T3-L1前体脂肪细胞中KCTD15基因敲低后的差异表达基因研究其细胞生物学功能,探讨KCTD15基因与肥胖发生的关联。**方法** ①运用RNA干扰技术在3T3-L1前体脂肪细胞中特异性敲低KCTD15基因表达,并用半定量RT-PCR技术检测KCTD15基因敲低效率。②用Illumina表达谱芯片检测基因表达。③筛选差异表达基因后,运用Gene Ontology(GO)和KEGG pathway进行功能聚类分析。④挑选部分差异表达基因进行半定量RT-PCR验证。**结果** ①KCTD15基因敲低后筛选到833个差异表达基因(差异倍数值≥2或≤0.5)。②GO功能分析显示差异表达基因主要富集在以下相关通路:细胞黏附(34个)、细胞骨架组装(26个)、生物膜组装(26个)、染色体组装(20个)、脂肪细胞分化(6个);KEGG pathway分析则显示半乳糖代谢和二羧酸代谢受到影响。③对MTHFD1、MDH1、VSP4B、CUX1、ABCA7 5个基因表达的半定量RT-PCR与芯片测试结果相符。**结论** KCTD15基因功能与生物膜和细胞骨架有关且能够影响细胞能量代谢过程。

[关键词] KCTD15基因;3T3-L1前体脂肪细胞;基因芯片;肥胖
[中图法分类号] R394-33; R394.3; R589.202 [文献标志码] A

Effect of KCTD15 gene on 3T3-L1 preadipocyte by global expression profile microarray

Zhang Peng[1], Jin Kangxuan[2], Chen Yusheng[2], Xu Zihui[1,3] ([1]Department of Endocrinology, [3]Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Laboratory of Major Disease Genomics and Personalized Medicine, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100029, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the cellular function of 3T3-L1 preadipocytes with normal and knockdown potassium channel tetramerisation domain containing 15 (KCTD15) and analyze the different expressed genes (DEGs) to explore the potential relationship between KCTD15 and obesity. **Methods** RNAi technology was used to specifically decrease KCTD15 gene expression in 3T3-L1 preadipocyte. Then semi-quantitative reverse transcriptase PCR was employed to confirm the KCTD15 knockdown efficiency. The expression of the genes at transcriptional level was detected by Mouse WG-6 V2.0 expression beadchip (Illumina). Based on the chip data, the DEGs were screened out according to fold change parameters. The obtained DEGs were further analyzed through 2 bio-informatic softwares, Gene Ontology (GO) analysis and KEGG pathway. Several DEGs were selected for verification by semi-quantitative reverse transcriptase PCR. **Results** A total of 833 DEGs were identified in KCTD15 knockdown RNA sample (Fold change ≥2 or ≤0.5). GO analysis suggested that DEGs were enriched in the following pathways: biological adhesion (34), cytoskeleton organization (26), membrane organization (26), chromosome organization (20) and fat cell differentiation (6). KEGG pathway analysis mapped DEGs into 2 pathway, galactose metabolism and glyoxylate and dicarboxylate metabolism. Finally, semi-quantitative reverse transcriptase PCR was used to verify the chip data on genes MTHFD1, MDH1, VSP4B, CUX1 and ABCA7. **Conclusion** KCTD15 gene is related to biomembrane and cytoskeleton, and affects energy metabolism process.

[**Key words**] KCTD15 gene;3T3-L1 preadipocytes;expression profile chip; obesity

Corresponding author: Xu Zihui, E-mail: zihuixu@yeah.net

[通信作者] 徐梓辉, E-mail:zihuixu@yeah.net
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140219.1111.001.html(2014-02-19)

肥胖作为引起2型糖尿病、心血管疾病、高血压病、心理疾病、癌症等慢性疾病发生的主要危险因素之一，已成为全世界的公共卫生问题。学者普遍认为肥胖的发病率逐年快速提高除与环境、行为、生活方式等因素相关外，遗传因素也扮演了重要的角色，其相关研究逐渐成为各国学者关注的焦点。最新的统计数据表明，超过1 000个基因位点的突变与异常和肥胖相关[1]；2009年基于大量人群的全基因组关联研究（genome-wide association studies，GWAS）表明potassium channel tetramerisation domain containing 15（KCTD15基因）与肥胖相关[2]。大量的人群调查也证实了KCTD15基因与肥胖的相关性[3-4]。已知KCTD15基因编码的蛋白含有283个氨基酸。KCTD15蛋白的N端包含BTB/POZ结构域，保守的C末端可能存在选择性剪切形式。然而有关KCTD15基因参与肥胖发生的分子机制还不清楚。因此，本研究将通过表达谱芯片检测KCTD15基因敲低后细胞转录组水平的变化，结合生物信息学分析筛选差异表达基因，从而进一步探究KCTD15基因与肥胖相关性的分子机制，为寻找新的肥胖症治疗的靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠3T3-L1前体脂肪细胞系购于中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所。DMEM培养基、OPTI-MEM培养基均购于美国Gibco公司；胰蛋白酶（trypsin）购于Sigma-Aldrich公司；新生小牛血清（newborn calf serum，NBCS）购于HyClone公司；转染试剂购于Invitrogen公司；TRI-Reagent购于Ambion公司；KCTD15基因及阴性对照siRNA为上海吉玛公司合成；逆转录试剂盒购于Fermentas公司；引物由华大基因公司合成。

1.2 方法

1.2.1 小鼠3T3-L1前体脂肪细胞的培养 将3T3-L前体脂肪细胞接种于DMEM完全培养基中（DMEM培养基原+10%新生小牛血清+青霉素100 U/mL+链霉素100 mg/mL），在37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。当细胞密度约90%时即可进行细胞传代。

1.2.2 瞬时转染实验 KCTD15基因特异siRNA序列和非特异siRNA序列均为上海吉玛公司设计合成；总共设计了3条针对KCTD15基因的RNA oligo，序列如下所示：①5′-GACGUCAAAACUGCUGCUUTT-3′；②5′-CAACUGCUGUCCGGAUAAATT-3′；③5′-GGCUACUGUAGACUCAACUTT-3′；非特异siRNA作为阴性对照，序列为：5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′。挑选生长状态良好的3T3-L1前体脂肪细胞以30%的密度接种于6 cm培养皿中。培养24 h后，按照Invitrogen公司说明书方法瞬时转染细胞，培养48 h后收集细胞，并用TRI-Reagent试剂提取总RNA用于PCR和基因芯片实验。

1.2.3 半定量RT-PCR法检测基因表达量 用取1 μg RNA以Oligo（dT）为引物进行逆转录合成cDNA，逆转录反应体系为20 μL。按照逆转录试剂盒（Fermentas，K1611）说明书要求混合各组分后条件反应如下：42 ℃ 60 min；72 ℃ 10 min；10 ℃ 10 min。取逆转录所得的1 μL cDNA为模板进行半定量RT-PCR反应，反应体系为30 μL。引物序列及PCR产物大小如表1所示；RT-PCR反应试剂购自北京艾德莱公司。反应循环条件为：95 ℃ 预变性5 min；95 ℃变性30 s；55 ℃退火30 s；72 ℃延伸30 s；共计40个循环（KCTD15）/30个循环（MTHFD1、MDH1、ABCA7、CUX1、VPS4B）/25个循环（β-actin）；终末延伸72 ℃ 10 min。PCR产物经3%琼脂糖凝胶电泳后，用美国Bio-Rad公司GDS-800型凝胶成像系统扫描。

表1 RT-PCR所用引物序列信息

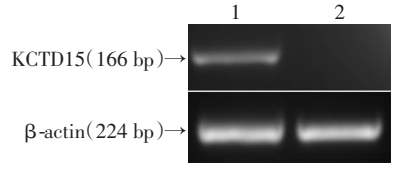
引物	引物序列	产物大小（bp）
KCTD15	5′-ATGGGGAGATTTTCCGCTAC-3′	166
	5′-GGGGCTCCTGCTTTATCC-3′	
β-actin	5′-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3′	224
	5′-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3′	
MTHFD1	5′-CATTGAGAAGACTGACCCC-3′	475
	5′-TACCAGCTTGAGTGCAATCC-3′	
MDH1	5′-ATCATTCTTGTGCTGTTGG-3′	433
	5′-ATTCTTTACATCATCAGCGG-3′	
ABCA7	5′-GCCTGTCCCTCAATTGGTAC-3′	428
	5′-CAGAAAGTCTTTGATAGCC-3′	
CUX1	5′-TTAAGGGAACAGCTCTCATCG-3′	308
	5′-TTCACTTCTTCATAGTCAGCC-3′	
VPS4B	5′-ACCATCGTGTTATTTCAATG-3′	325
	5′-AGCCAAAAGTAGGTTATAGC-3′	

1.2.4 表达谱芯片检测基因表达量 为了保证结果的客观性、准确性及可重复性，在相同条件下重复2次KCTD15基因敲低实验，分别提取2组RNA标本用于芯片检测；实验所用试剂及步骤参照illumina Mouse WG-6 V2.0 expression beadchip芯片配套的使用说明，主要步骤包括：RNA样品稀释、第一链cRNA合成、第二链cDNA合成、双链cDNA纯化、体外转录合成cRNA、cRNA纯化/定量、芯片过夜杂交、芯片清洗染色、扫描。通过芯片扫描软件Beadarray Reader（illumina）对芯片灰度扫描，对扫描结果使用Genomestudio（illumina）进行分析，得到芯片上每个基因点的原始信号值。用Average方法将对照组与敲低组样品分别均一化后得到Avg_Signal，Detection Pval等数据进行筛选分析：将实验组与对照组的数据比较，若其中任何一组中Detection Pval < 0.05即为有效基因。使用Fold change方法：≥2或≤0.5为筛选比例得到的基因即为差异表达基因（DEG）。芯片实验和分析部分均由北京怡美通德科技发展有限公司完成。

2 结果

2.1 3T3-L1前体脂肪细胞KCTD15基因敲低效率检测

使用针对KCTD15基因的特异siRNA转染细胞（实验组），48 h后收集细胞提取RNA。与使用非特异性siRNA转染细胞（对照组）相比，实验组中的3T3-L1前体脂肪细胞中KCTD15基因表达明显降低（图1）。使用此有KCTD15敲低效果的RNA样品进行下一步的表达谱芯片分析。



1：对照组；2：实验组

图1 RT-PCR检测KCTD15基因敲低后2组细胞中KCTD15的mRNA表达水平

2.2 表达谱芯片检测结果

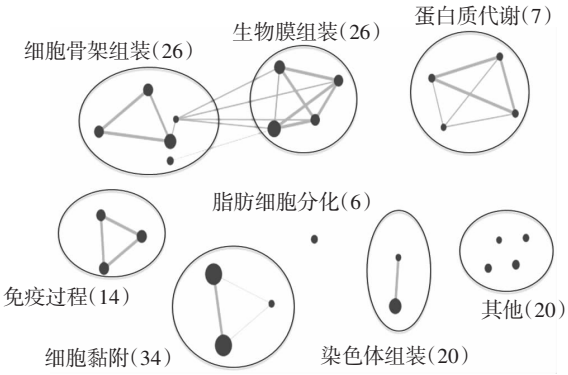
通过上述方法总共筛选到 453 个上调基因和 386 个下调基因。除去针对同一基因的不同探针间的矛盾结果，总共筛选到的差异表达基因有 833 个。表 2 分别列出了 5 个有代表性的上调/下调基因。

表 2 分别选取的 5 个上调和下调基因差异倍数值

基因名称	基因 ID	差异倍数值
CLN8	26889	4.18
CNN1	12797	3.17
ABCA7	10347	2.46
KCNN4	16534	2.08
DLC1	50768	2.06
G6PC	14377	0.46
VPS4B	20479	0.34
MDH1	17449	0.27
MTHFD1	108156	0.24
AKR1B3	11677	0.15

2.3 差异表达基因的生物信息学分析

为进一步探索受 KCTD15 基因敲低影响的差异表达基因参与哪些细胞功能，我们通过 DAVID 网站将这些基因按生物学过程（Biological Process）进行了分类。图 2 为 GO 分析的结果，表明差异表达基因功能主要富集在细胞骨架组装、生物膜组装、细胞黏附以及染色体组装等 4 类，但对于脂肪细胞分化相关的基因影响较小。按照差异表达基因的细胞定位分类后，发现绝大多数差异表达基因编码的蛋白位于细胞膜和细胞骨架上。



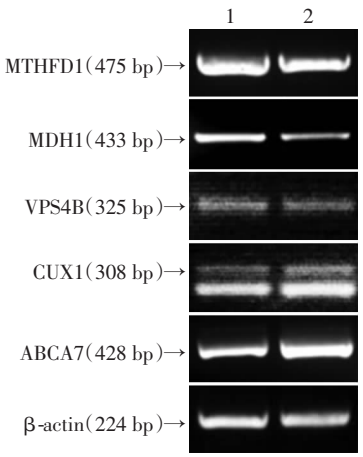
每个点表示 1 个富集的 GO 结点，结点的大小与结点中包含的基因数量成正比；点与点之间的边越粗表示两个结点之间重合的基因越多；具有类似功能的 GO 结点被划分为一类，并用圆圈包围显示

图 2 DAVID GO 分析按生物学过程分类的结果

KEGG 通路分析表明受 KCTD15 基因影响的基因主要可以富集到半乳糖代谢（$P=0.025$）和二羧酸代谢 2 条通路中（$P=0.065$）。富集到二羧酸代谢通路的基因包括 3 个，分别是 MTHFD1、CSL、MDH1；富集到半乳糖代谢通路的也包括 3 个，分别是 B4GALT1、G6PC、AKR1B3。

2.4 半定量 RT-PCR 验证部份差异表达基因的表达变化

根据芯片检测分析结果，选取部分差异表达基因进行半定量 PCR 验证。如图 3 所示，MTHFD1、MDH1 和 VPS4B 的表达量降低，CUX1 和 ABCA7 的表达量升高，与芯片测试结果一致。验证的结果进一步证明了芯片检测结果真实可靠。



1：对照组；2：实验组

图 3 半定量 RT-PCR 验证基因 MTHFD1、MDH1、VPS4B 、CUX1、ABCA7 的 mRNA 表达水平

3 讨论

到目前为止，虽然对于 KCTD15 基因的功能研究主要集中在斑马鱼[5-6]、非洲蟾蜍[7]等低等生物中，但小鼠模型的研究结果证实了 KCTD15 在不同组织中的表达量受到饮食因素的影响[8-9]。2013 年，以小鼠 3T3-L1 前体脂肪细胞为模型的最新研究结果表明 KCTD15 基因在脂肪细胞分化前期有重要作用，敲低 KCTD15 基因将抑制小鼠 3T3-L1 前体脂肪细胞的分化[10]。本研究通过表达谱芯片检测和生物信息学分析在 3T3-L1 细胞中总共筛选到 833 个受 KCTD15 基因影响的差异表达基因。GO 功能聚类分析的结果显示主要是与膜组装和细胞骨架组装相关的基因受到影响；与脂肪细胞分化相关的经典基因只有 6 个受到影响，该结果提示 KCTD15 的基因功能并不完全依赖于已知的经典脂肪分化机制。KEGG 通路分析结果则显示差异表达基因主要参与二羧酸代谢通路和半乳糖代谢通路。这说明 KCTD15 基因能通过影响细胞能量代谢过程调节脂肪细胞分化乃至肥胖的发生。对这些基因已知的功能进行分析将为阐释 KCTD15 基因的细胞功能提供有力依据。

MTHFD1 编码一种分布在细胞质中参与叶酸代谢的酶。MTHFD1 具有 3 种酶活性催化由四氢叶酸至 5,10-亚甲基四氢叶酸的转化，MTHFD1 催化的反应在胸腺苷酸和甲硫氨酸的合成中起重要作用[11]。MTHFD1 功能的异常将引起多种疾病，其中 MTHFD1 基因 G1958A 的突变被报道与多种癌症相关，包括胃癌、乳腺癌、肺癌等[12]。叶酸代谢通路的异常也能导致胸腺苷酸合成降低，增加尿苷酸被错误加入合成 DNA 的几率，引起突变甚至 DNA 双链断裂等，此外甲硫氨酸的减少会降低细胞内 AdoMet 水平，引起 DNA 甲基化模式的改变，在表观遗传层面影响细胞功能[13]。MTHFD1 表达量在 KCTD15 敲低之后表现为下降，这一结果提示 KCTD15 能够影响 MTHFD1 介导的叶酸代谢

途径,从而影响 DNA 合成以及甲基化模式。

MDH1 编码的是一种苹果酸脱氢酶。MDH1 在细胞中广泛分布,MDH1 可以利用 NAD 或 NADH 作为辅酶催化草酰乙酸与苹果酸之间的可逆转化,主要参与三羧酸(TCA)循环、光合作用、C4 循环等重要代谢途径[14]。因此,MDH1 的功能缺失将极大地影响细胞的正常能量代谢。2012 年,Kim 等[15]研究显示 MDH1 的乙酰化修饰能够促进 3T3-L1 细胞成脂分化过程:乙酰化的 MDH1 酶活性增强,促使柠檬酸穿梭循环向合成甘油三酯方向倾斜,促进脂肪分化,并且细胞中过表达 MDH1 也能够促进成脂相关基因 PPARγ 的表达。相反,KCTD15 敲低之后 MDH1 的表达量下降,显示甘油三酯的合成和脂肪细胞分化受到抑制。该结果提示 KCTD15 基因能够影响 MDH1 参与的脂质合成调节 3T3-L1 细胞分化。

VPS4B 编码的蛋白属于 AAA 家族,在溶酶体降解途径中重要作用,而溶酶体的功能是介导配体引发的膜受体降解过程。有关 VPS4B 的功能机制还不明确,有文章报道 VPS4B 中的 MIT 结构域能够介导蛋白-蛋白相互作用[16],VPS4B 也参与细胞分裂的调控[17]。也有报道称 VPS4B 表达的降低会引起许多糖酵解酶的降低[18]。因此,KCTD15 基因敲低之后 VPS4B 表达量下降表明其能间接的影响糖代谢途径或细胞分裂。

CUX1 编码一种转录调控因子,能结合 DNA 上序列为 CCAAT 的转录调控元件,存在多种形式的 Isoform。CUX1 被认为与瘦素受体信号通路和肥胖症相关,CUX1 调控的靶基因包括与肥胖相关的 RPGRIP1L 和 FTO,据推测 cathepsin L 可能通过将 CUX1 降解为 p110 CUX1 Isoform 后激活 RPGRIP1L 和 FTO 的表达[19]。CUX1 表达量的变化提示 KCTD15 基因可以通过调节转录因子参与肥胖症的发生。

ABCA7 编码的蛋白属于 ABCA 亚家族,与 ABCA1 具有很高的同源性。有关 ABCA7 的功能主要集中在研究其与阿尔兹海默证的关系,但也有的报道显示 ABCA7 参与细胞内的脂质和胆固醇运输[20]。这也提示了 KCTD15 基因能够通过影响脂质运输影响脂肪细胞分化。

综上所述,我们发现 KCTD15 能够影响与脂质合成、运输,DNA 合成,DNA 甲基化以及转录因子的基因表达。这些结果不仅为阐释 KCTD15 功能提供了证据,也为建立 KCTD15 与肥胖发生相关性的分子机制提供了重要依据,但 KCTD15 蛋白的细胞定位和在脂肪前体细胞中的互作蛋白还不清楚,因此,有关 KCTD15 更具体的机制还有待进一步的研究。

参考文献:

[1] Kunej T, Jevsinek Skok D, Zorc M, *et al*. Obesity gene atlas in mammals[J]. J Genomics, 2012, 1: 45 - 55.

[2] Willer C J, Speliotes E K, Loos R J, *et al*. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation[J]. Nat Genet, 2009, 41(1): 25 - 34.

[3] Ng M C, Tam C H, So W Y, *et al*. Implication of genetic variants near NEGR1, SEC16B, TMEM18, ETV5/DGKG, GNPDA2, LIN7C/BDNF, MTCH2, BCDIN3D/FAIM2, SH2B1, FTO, MC4R, and KCTD15 with obesity and type 2 diabetes in 7705 Chinese[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(5): 2418 - 2425.

[4] Paternoster L, Evans D M, Nohr E A, *et al*. Genome-wide population-based association study of extremely overweight young adults—the GOYA study[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24303.

[5] Dutta S, Dawid I B. Kctd15 inhibits neural crest formation by attenuating Wnt/beta-catenin signaling output[J]. Development, 2010, 137(18): 3013 - 3018.

[6] Zarelli V E, Dawid I B. Inhibition of neural crest formation by Kctd15 involves regulation of transcription factor AP-2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(8): 2870 - 2875.

[7] Takahashi C, Suzuki T, Nishida E, *et al*. Identification and characterization of Xenopus kctd15, an ectodermal gene repressed by the FGF pathway[J]. Int J Dev Biol, 2012, 56(5): 393 - 402.

[8] Gutierrez-Aguilar R, Kim D H, Woods S C, *et al*. Expression of new loci associated with obesity in diet-induced obese rats: from genetics to physiology[J]. Obesity (Silver Spring), 2012, 20(2): 306 - 312.

[9] Yoganathan P, Karunakaran S, Ho M M, *et al*. Nutritional regulation of genome-wide association obesity genes in a tissue-dependent manner [J]. Nutr Metab (Lond), 2012, 9(1): 65.

[10] 徐景, 赵旭, 杨莹, 等. KCTD15 基因调控 3T3-L1 脂肪前体细胞分化的研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(11): 1115 - 1118.

[11] MacFarlane A J, Perry C A, Girnary H H, *et al*. Mthfd1 is an essential gene in mice and alters biomarkers of impaired one-carbon metabolism[J]. J Biol Chem, 2009, 284(3): 1533 - 1539.

[12] Krajinovic M. MTHFD1 gene: role in disease susceptibility and pharmacogenetics[J]. Pharmacogenomics, 2008, 9(7): 829 - 832.

[13] Stover P J. Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease [J]. Nutr Rev, 2004, 62(6 Pt 2): S3 - S13.

[14] Minarik P, Tomaskova N, Kollarova M, *et al*. Malate dehydrogenases—structure and function [J]. Gen Physiol Biophys, 2002, 21(3): 257 - 265.

[15] Kim E Y, Kim W K, Kang H J, *et al*. Acetylation of malate dehydrogenase 1 promotes adipogenic differentiation *via* activating its enzymatic activity[J]. J Lipid Res, 2012, 53(9): 1864 - 1876.

[16] Takasu H, Jee J G, Ohno A, *et al*. Structural characterization of the MIT domain from human Vps4b[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(2): 460 - 465.

[17] Liu Y, Lv L, Xue Q, *et al*. Vacuolar protein sorting 4B, an ATPase protein positively regulates the progression of NSCLC via promoting cell division[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 381(1/2): 163 - 171.

[18] Liao Z, Thomas S N, Wan Y, *et al*. An Internal Standard-Assisted Synthesis and Degradation Proteomic Approach Reveals the Potential Linkage between VPS4B Depletion and Activation of Fatty Acid beta-Oxidation in Breast Cancer Cells[J]. Int J Proteomics, 2013, 2013: 291415.

[19] Stratigopoulos G, LeDuc C A, Cremona M L, *et al*. Cut-like homeobox 1 (CUX1) regulates expression of the fat mass and obesity-associated and retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein-1-like (RPGRIP1L) genes and coordinates leptin receptor signaling [J]. J Biol Chem, 2011, 286(3): 2155 - 2170.

[20] Wu C A, Wang N, Zhao D H. An evaluation of the mechanism of ABCA7 on cellular lipid release in ABCA7-HEC293 cell[J]. Chin Med J (Engl), 2013, 126(2): 306 - 310.

(**收稿**:2013-12-15;**修回**:2014-01-23)

(编辑 栾 嘉)