

人脂肪干细胞脂向分化中长非编码RNA的差异表达

岳文峻, 王香梅, 张芹, 黄海华, 韦有万, 彭智(广东医学院附属医院, 广东省湛江市 524000)

文章亮点:

脂肪干细胞传代至第3代后诱导其脂向分化, 获取诱导过程中0, 5, 12 d总RNA。通过微阵列测序技术对不同诱导时期RNA进行高通量分析, 筛选出差异倍数明显的长非编码RNA。结合生物信息学报告进一步筛选出可能在脂向分化过程中发挥重要作用的长非编码RNA并通过实时荧光定量PCR进行验证, 为进一步实验提供依据。

关键词:

干细胞; 脂肪干细胞; 脂向分化; 长链非编码RNA 差异性表达; lncRNAs; 生物信息学报告; qRT-PCR

主题词:

腹内脂肪; 间质干细胞; 成脂分化; RNA

基金资助:

广东医学院建博科技创新团队培育型立项资助(TD1123), 课题名称: 长链非编码RNA在人脂肪干细胞脂向分化过程中的差异性表达分析

摘要

背景: 肥胖导致了包括高血压、冠心病、脂肪肝、高脂血症、2型糖尿病在内的诸多疾病, 因此深入理解脂肪细胞分化机制对于肥胖的防治具有深远意义。目前对于脂向分化机制的研究多集中在微小RNA上, 对于长非编码RNA在脂向分化过程中的作用尚且知之甚少。

目的: 获得脂向分化过程中差异倍数明显的长非编码RNA, 并进一步筛选在脂向分化过程中可能发挥重要作用的长非编码RNA进行验证。

方法: 取人腹部皮下脂肪, 采用组织块培养法获取脂肪干细胞, 传至第3代后进行成脂诱导分化, 通过微阵列技术对脂向分化过程中0, 5, 12 d长非编码RNA及mRNA差异性表达量进行统计, 并结合生物信息学报告筛选出呈现明显差异性表达的长非编码RNA, 通过qRT-PCR进行验证。

结果与结论: 脂向分化过程中以差异倍数1.5($P < 0.05$)为标准, 上调长非编码RNA的数量5 d vs. 0 d 748个, 12 d vs. 0 d 847个, 12 d vs. 5 d 593个; 下调长非编码RNA的数量5 d vs. 0 d 828个, 12 d vs. 0 d 1 113个, 12 d vs. 5 d 750个; 结合生物信息学分析结果, 在与脂类代谢有关的28个长非编码RNA中根据诱导0, 5, 12 d差异表达倍数较高且其靶基因可能是已知的与成脂相关的基因中, 筛选出3个长非编码RNA: AK304548、BP216319、DA852857。通过PCR验证结果显示AK304548、BP216319及其靶基因表达量呈现先下调后上调的趋势, 与微阵列测序结果相符, 预示其在脂向分化过程中起到调控作用。

岳文峻, 王香梅, 张芹, 黄海华, 韦有万, 彭智. 人脂肪干细胞脂向分化中长非编码RNA的差异表达[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(28):4491-4497.

Differentially expressed long non-coding RNAs in adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells

Yue Wen-jun, Wang Xiang-mei, Zhang Qin, Huang Hai-hua, Wei You-wan, Peng Zhi (Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524000, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: The obesity has led to a plenty of diseases including hypertension, coronary heart disease, fatty liver, hyperlipidemia, and type 2 diabetes. Therefore, understanding the mechanism of adipocyte differentiation is of far-reaching significance to the prevention and treatment of obesity. For the current studies of the mechanism of adipocyte differentiation pay more attention to microRNA, rather than long non-coding RNAs (lncRNAs).

OBJECTIVE: To obtain the lncRNAs whose fold change was apparent during adipogenic differentiation, and to further screen the lncRNAs that possibly play a crucial role in adipogenic differentiation for verification.

METHODS: Subcutaneous fat was obtained from human abdomen. Adipose-derived stem cells were collected using tissue culture method. The third passage of adipose-derived stem cells was used for adipogenic differentiation. Through microarray technology, the expression levels of lncRNAs and mRNA were analyzed at 0, 5 and 12 days in adipogenic differentiation. Combining with bioinformatics report, lncRNAs apparently presented fold change were screened and verified by qRT-PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: Fold change 1.5 ($P < 0.05$) was considered as a criterion during adipogenic differentiation. The number of up-regulated lncRNAs was 748 for 5 days versus 0 day, 847 for 12 days versus 0 days, 593 for 12 days versus 5 days. At the same time, the down-regulated number was 828 for 5 days versus 0 day, 1 113 for 12 days versus 0 day, 750 for 12 days versus 5 days during adipogenic differentiation. In

岳文峻, 男, 1988年生, 山东省枣庄市人, 汉族, 广东医学院在读硕士, 主要从事长链非编码RNA在脂肪干细胞脂向分化过程中的差异表达研究, 以及ACE2、VEGF在婴幼儿血管瘤及血管畸形中表达方面的研究。

通讯作者: 彭智, 主任医师, 硕士研究生导师, 广东医学院附属医院, 广东省湛江市 524000

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.28.011

[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2014)28-04491-07

稿件接受:2014-04-25

Yue Wen-jun, Studying for master's degree, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524000, Guangdong Province, China

Corresponding author: Peng Zhi, Chief physician, Master's supervisor, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524000, Guangdong Province, China

Accepted: 2014-04-25

combination with bioinformatics analysis results, 3 of 28 lncRNAs were related to lipid metabolism: AK304548, BP216319 and DA852857, according to the standard that fold change in 0, 5 and 12 days was higher, and the target genes were known to be associated with adipogenesis-related genes. PCR results showed that the expression of AK304548 and BP216319 and its target gene presented an up-down trend, which is consistent with the microarray sequencing results. These results indicated that lncRNA plays a critical regulatory role in the adipogenic differentiation.

Subject headings: intra-abdominal fat; mesenchymal stem cells; adipogenesis; RNA

Funding: the Foster-Type Technological Innovation Team Project of Guangdong Medical University, No. TD1123

Yue WJ, Wang XM, Zhang Q, Huang HH, Wei YW, Peng Z. Differentially expressed long non-coding RNAs in adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(28):4491-4497.

0 引言 Introduction

肥胖已经成为亟待解决的世界性问题, 作者试图通过微阵列芯片测序技术获得人脂肪间充质干细胞脂向分化过程中长非编码RNA(Long non-coding RNAs, lncRNAs)差异表达谱, 筛选出在分化过程中可能发挥重要意义的lncRNAs进行进一步验证, 初步建立lncRNAs的相关调控基因、细胞因子表达网络, 为肥胖的治疗提供新的思路。近年来对于脂向分化调控取得了一定进展^[1-9], 已证实大量的蛋白编码基因、mRNAs和microRNAs与脂类代谢和脂肪细胞分化有关, 尤其是对于microRNAs的研究, 已有大量文献提及其在脂类代谢和脂肪细胞分化中起着重要作用。

但是lncRNAs在脂向分化过程中的全基因表达谱以及功能鲜有报道。2013年Sun等^[10]通过对小鼠肩胛间的褐色脂肪组织、附睾的脂肪垫进行培养、诱导分化, 并发现1734个编码基因及175个lncRNAs在褐色及白色脂肪细胞分化过程中显著上调或者下调2倍以上, 并最终确定10个lncRNAs在前脂肪细胞分化过程中发挥着关键的作用。目前对于长非编码RNA在人脂肪干细胞脂向分化的差异表达分析尚未见报道, lncRNAs对脂向分化调节的机制和通路的研究还处于初级阶段。

本研究预期能够筛选出人脂肪间充质干细胞脂向分化过程中发挥重要作用的lncRNAs, 为肥胖的治疗及早期诊断提供新的思路。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学体外观察实验。

时间及地点: 实验于2011年11月至2013年11月在广东医学院附属医院整形外科研究所完成。

实验方法:

脂肪源性干细胞培养: 组织块培养法分离人脂肪源性干细胞并进行体外培养, 参照文献^[11], 不再赘述。

RNA提取及微阵列芯片扫描(上海康成公司): 收集3例腹部脂肪标本获得脂肪干细胞, 分别传至第3代后进行成脂诱导分化, 诱导分化0, 5, 12 d各作为一个细胞样本, 分别提取9个细胞样本的RNA并进行质量检测, 合成ds-cDNA, 利用Axon GenePix 4000B微阵列扫描仪扫描芯片荧光强度、NimbleScan软件(2.5版本)进行数据表达分

析。为进一步对数据进行分析, 通过Agilent GeneSpring GX (11.5.1)软件, 过滤较低信号强度的lncRNAs, 筛选出标准化值 ≥ 100 的lncRNAs。对过滤后的lncRNAs进行数据质量评估及差异表达谱筛查。

长链非编码RNA在人脂肪干细胞脂向分化的差异表达分析主要试剂和仪器:

试剂和仪器	来源
低糖 DMEM 培养基、PBS、标准胎牛血清	Gibico 公司
0.25%胰蛋白酶(含 EDTA)、地塞米松、抗坏血酸盐、吡嗪美辛、异丁基甲基黄嘌呤(IBMX)、油红 O 染色剂	Sigma 公司
青霉素钠、链霉素	华北制药厂
β -甘油磷酸钠	Amresco 公司
100 g/L 多聚甲醛溶液	武汉康斯泰德生物公司
TRIzol [®] Reagen, FITC 标记的山羊抗小鼠二抗, 鼠抗人: CD106, CD105, CD90, CD45, CD44, CD34, CD29; 双链 cDNA 合成试剂盒, 无 RNA 酶的糖原	Invitrogen 公司
Real Envision 显色检测系统(DAB 方法)	香港基因公司
单色 DNA 标记试剂盒、杂交试剂盒、清洗缓冲液试剂盒、核糖核酸酶 A	Nimblegen 公司
RNA 酶抑制剂、MMLV 反转录酶、10 \times RT 缓冲液	Epicentre
Gold View 染料	上海赛百胜基因技术有限公司
2.5 mmol/L dNTP 混合液	HyTest 有限公司
2 \times PCR master mix	Superarray
超低温冰箱	美国 Harris 公司
恒温水浴箱	天津艾维欧公司
石蜡切片机	英国 Shandon 公司
可控微量移液器、Eppendorf 5415R 冷冻离心机	德国 Eppendorf 公司
MILLI-Q-BIOCEl 超纯水器	美国 Millipore 公司
防脱磨砂载玻片	北京中衫金桥生物技术公司
光学显微镜、显微照相系统	日本 Olympus 公司
ND-1000 紫外分光光度计	美国 NanoDrop 公司
GenePix 4000B 芯片扫描分析系统、GenePix Pro 6.0 图像分析软件	美国 Axon 公司
Cluster3.0 聚类分析软件	北京博奥生物
ABI PRISM7900 system	Applied Biosystems

芯片测序数据生物信息学分析(由广州莱德尔公司代完成):对来自3个标本的9个细胞样本芯片扫描数据进行生物信息学分析。通过计算芯片测序数据的离群值, 平均值, 标准值, 空值对初始数据进行检查, 进而通过样本的相关性分析和层次聚类分析进行数据质量检测。按照差异倍数大于2倍, $P < 0.01$ 的原则挑选Induce 5 d vs. 0 d, Induce 12 d vs. 0 d, Induce 12 d vs. 5 d 3组差异表达数据用于后续分析。根据芯片数据得到诸如细胞信号通路、细胞周期、小分子代谢等一系列生物过程相关信号通路及分子网络图, 并根据网络图进一步筛选相关的LncRNAs。

总RNA提取及引物合成:首先进行细胞均一化调整, 每份样品为 $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ 细胞, 然后经过相分离法、RNA沉淀、RNA清洗、弃上清、室温晾干、RNA再溶解获得RNA。然后通过NanoDrop® ND-1000测定RNA在分光光度计260 nm、280 nm和230 nm的吸收值, 以计算浓度并评估纯度。通过变性琼脂糖凝胶电泳并照相, 检测RNA有无降解, RNA纯度及完整性。挑选出3个LncRNA, 由上海康成生物技术有限公司设计并合成上下游引物。基因名称、上下游引物序列、退火温度及产物长度见表1。

主要观察指标:微阵列芯片测序在成脂诱导过程中0, 5, 12 d LncRNAs的差异表达变化倍数; 生物信息学报告对于所筛选LncRNAs靶基因的预测分析; qRT-PCR验证所筛选的LncRNAs在成脂诱导过程中0, 5, 12 d的变化趋势及倍数。

统计学分析:采用SPSS 17.0软件进行统计、分析与处理。实验数据为计量资料, 对数据进行非参数检验, 符合正态分布, 实验设计符合配对设计。各样本LncRNAs在0, 5, 12 d的差异表达应用配对t检验进行统计分析。 $P > 0.05$ 为差异无显著性意义, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义, 检验水准 $\alpha = 0.05$; 样本相关性分析采用Person相关性分析方法。

2 结果 Results

2.1 体外培养人脂肪来源干细胞生物学特性、成脂肪诱导分化 人脂肪来源干细胞原代培养细胞形态、流式细胞仪检测鉴定脂肪干细胞表型、成脂诱导分化0, 5, 12 d细胞形态及生长曲线参见已发表文章^[11]。

2.2 RNA质量检测 LncRNAs及mRNAs的总RNA采用Trizol法提取, 紫外分光光度计定量, 根据RNA在 A_{260}/A_{280} 值1.80-2.10之间、 $A_{260}/A_{230} \geq 1.8$ 。变性琼脂糖凝胶电泳28S、18S RNA条带比值 ≥ 1.5 , 鉴定RNA纯度及其完整性。结果显示各RNA样品 A_{260}/A_{280} 比值均位于2.0左右, $A_{260}/A_{230} > 2.0$; RNA样品电泳条带清晰, 28S与18S相比, RNA条带亮度接近2:1, RNA完好无降解, 质量符合LncRNAs微阵列的质量要求(图1, 表2)。

2.3 原始数据标准化、过滤及LncRNAs数据质量评估

2.3.1 LncRNAs数据质量评估 直方图(Box Plot)可方便快捷看出数据组的分布, 广泛应用于比较样本之间的强度

分布, 图2表示来自于3个标本的9个脂肪干细胞样本成脂诱导0, 5, 12 d LncRNAs标准化后的表达值分布(统计学 $P < 0.05$, 差异有显著性意义, 可认为成脂诱导LncRNAs在成脂诱导0, 5, 12 d存在不同的表达水平)(图2)。

2.3.2 LncRNAs标准化后表达谱扫描筛选 散点图(Scatter Plot)可应用于评估芯片之间的变异度, 图3是3个脂肪干细胞标本分成3组(诱导0, 5, 12 d), 共9个细胞样本, 进行样本两两之间比较的扫描结果, X轴表示控制数据值, Y轴表示表达值。最上面的直线以外的散点为上调2倍以上的差异基因表达谱; 最下面的直线以外的散点为下调2倍以上的差异基因表达谱。离直线越远, 表达的倍数越高。

2.3.3 分层聚类分析图 聚类分析按样本的表达水平将样本分组, 图4显示3个脂肪干细胞标本成脂诱导0, 5, 12 d共9个细胞样本扫描出差异表达谱后进行聚类分析验证, 结果显示样本之间的基因表达谱有差异。颜色较浅的为高表达, 颜色较深的为低表达。

2.3.4 差异表达的LncRNAs分析 LncRNAs在脂肪干细胞诱导0, 5, 12 d的微阵列芯片差异表达阈值定义为上调和下调(Fold Change ≥ 1.5), $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。诱导分化不同时期上调或下调的LncRNAs数量(表3), 为了确定这些差异表达的LncRNAs是否在脂肪干细胞成脂诱导分化中起作用, 并筛选出目的LncRNAs还需要对数据进行进一步的处理分析。

2.4 芯片数据的生物信息学分析

2.4.1 样本层次聚类分析及热图绘制 热图中每一行代表一个基因, 每一列代表样品, 通过层次聚类, 可以将相似表达基因归类到一起, 相似表达样品聚类一起, 这样就能很形象地观察到哪些基因在不同样品中表达发生变化。图5中从左到右分别是, Induce 5 d vs. 0 d, Induce 12 d vs. 5 d, Induce 12 d vs. 0 d的热图。表明人脂肪干细胞成脂诱导分化的0, 5, 12 d存在差异表达。

2.4.2 根据生物信息学分析筛选数据 结合数据及样本相关性分析得出标本1不同于标本2、3, 数据偏离明显, 遂取图标本2、3的芯片数据进行统计分析。在与脂类代谢相关的28个LncRNAs中, 根据诱导0, 5, 12 d差异表达倍数较高或(和)其靶基因可能是已知的与成脂相关的基因, 筛选出3个LncRNAs, 其在0, 5, 12 d的表达值、差异表达倍数、变化趋势及可能的靶基因如表4所示。

2.5 实时荧光定量PCR结果及统计分析 对目的LncRNAs的qRT-PCR结果测得各样本的相对含量进行统计, 求得目的LncRNAs各组均数及差异表达倍数如表5、图6所示, 结合数据及图表结果, AK304548、BP216319和DA852857在脂肪间充质干细胞成脂分化诱导0, 5, 12 d呈现先下调后上调的趋势, 差异倍数波动于1.60-4.25。数据符合正态分布, 应用配对t检验进行统计学分析, 其差异表达具有显著性意义(t值波动于-10.335至-5.163, 4.949至31.414; P值波动于0.001-0.038, $P < 0.05$)。

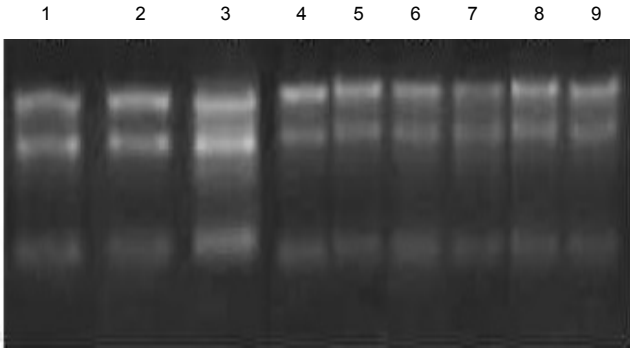


图1 标本1, 2, 3中细胞的总RNAs变性琼脂糖凝胶电泳图谱
Figure 1 Denaturing agarose gel electrophoresis pattern of total RNAs in cells of samples 1, 2 and 3
图注: Lane 1、2、3为标本1在诱导0, 5, 12 d的总RNA量; Lane 4、5、6为标本2在诱导0, 5, 12 d的总RNA量; Lane 7、8、9为标本3在诱导0, 5, 12 d的总RNA量。

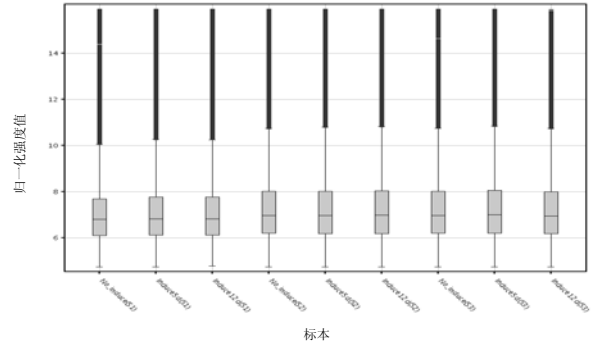


图2 成脂诱导0, 5, 12 d的lncRNAs强度分布
Figure 2 Intensity distribution of long non-coding RNAs at 0, 5 and 12 days of adipogenic induction
图注: 标准化后的表达值分布, 统计学显示差异有显著性意义($P < 0.05$), 可认为成脂诱导lncRNAs在成脂诱导0, 5, 12 d存在不同的表达水平。

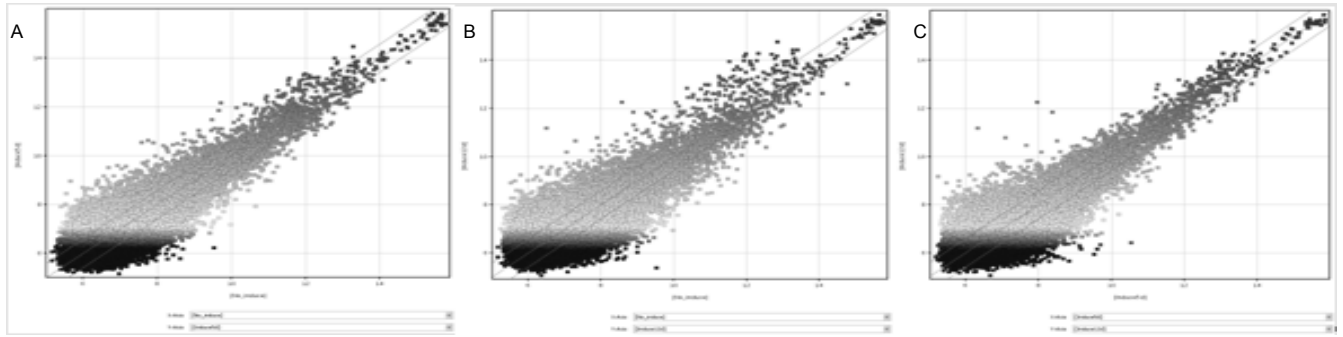


图3 差异表达的lncRNAs的散点图
Figure 3 Scatterplot of long non-coding RNAs differentially expressed
图注: 图中A为lncRNAs诱导5 d vs.诱导0 d; B为诱导12 d vs.诱导0 d; C为诱导12 d vs.诱导5 d。

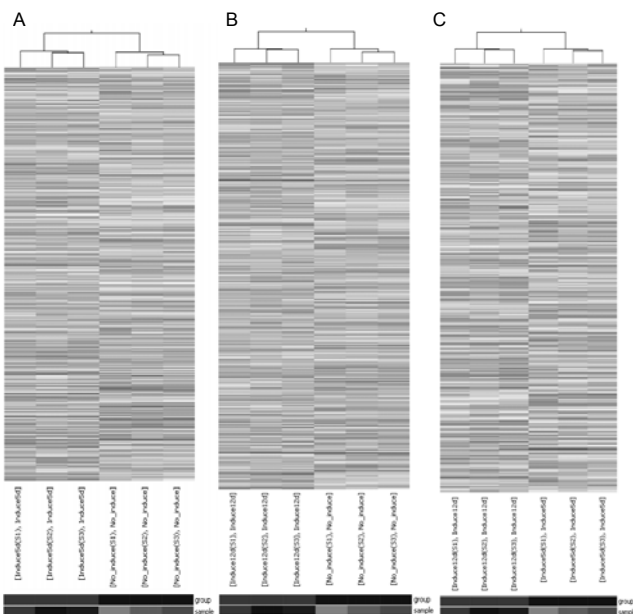


图4 分层聚类分析(差异倍数>1.5, P 值<0.05)
Figure 4 Hierarchical clustering (fold change > 1.5, $P < 0.05$)
图注: 图中A为诱导5 d vs.诱导0 d; B为诱导12 d vs.诱导0 d; C为诱导12 d vs.诱导5 d。

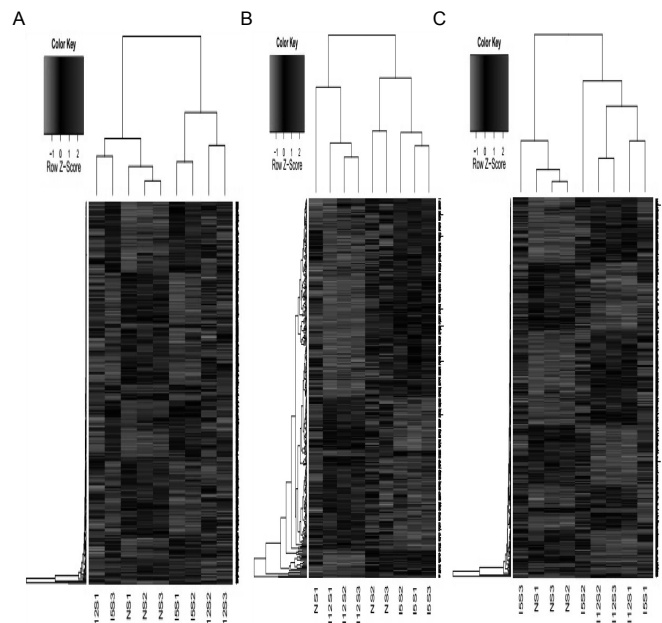


图5 样本层次聚类分析及热图绘制
Figure 5 Hierarchical clustering and heatmap drawing of samples
图注: 图中A为诱导5 d vs.诱导0 d; B为诱导12 d vs.诱导5 d; C为诱导12 d vs.诱导0 d。

表 1 IncRNAs 实时荧光定量 PCR 使用引物列表

Table 1 Primers of long non-coding RNAs for real-time fluorescent quantitative PCR

基因名	双向引物序列	退火温度	产物长度
GAPDH	F:5'GGG AAA CTG TGG CGT GAT 3' R:5'GAG TGG GTG TCG CTG TTG A 3'	60 °C	299 bp
AK304548	F:5'ACG GTA GTG GTG GCG ATG T 3' R:5'CTG AGG TCA ATG GCA GAG GA 3'	60 °C	298 bp
BP216319	F:5'ACA CCA ACC AGG CTC GTC AG 3' R:5'TCT TGC CCG TCC CAT TTC T 3'	60 °C	289 bp
DA852857	F:5'CCT TCA GAC CGA CTT TGG ACT 3' R:5'CAG GCA GAC AGG CTG GAG A 3'	60 °C	67 bp

表 3 成脂诱导过程中 0, 5, 12 d 呈现上调或下调 LncRNAs 数量(差异倍数 ≥ 1.5 , $P \leq 0.05$)Table 3 Number of long non-coding RNAs showing upregulation or downregulation during adipogenic differentiation of 0, 5 and 12 days (fold change ≥ 1.5 , $P \leq 0.05$)

名称	lncRNAs	mRNAs
5 d vs 0 d 上调	748	206
12 d vs 0 d 上调	847	277
12 d vs 5 d 上调	593	221
5 d vs 0 d 下调	828	302
12 d vs 0 d 下调	1 113	422
12 d vs 5 d 下调	750	241

表 4 筛选出的 lncRNAs 及其靶基因

Table 4 Screened long non-coding RNAs and its target gene

基因编号	0 d	5 d	12 d	差异倍数	变化规律	相关基因名称
AK304548	230.034 69	64.459 706 5	129.537 615	2.01-3.57	Down-up	ARHGFE2
BP216319	438.545 455	279.814 995	338.929 11	1.21-1.64	Down-up	FABP3
DA852857	130.763 435	310.887 38	275.696 78	1.13-2.38	Up-down	CALD1
ARHGFE2	795.154 786 7	482.110 895	997.370 353 3	1.65-2.07	Down-up	
FABP3	240.505 586 7	194.774 54	234.431 116 7	1.20-1.23	Down-up	

表注: 根据芯片数据, AK304548、BP216319 在标本 1 的差异表达变化趋势与标本 2、3 变化趋势相同, 而 DA852857 与之相反。

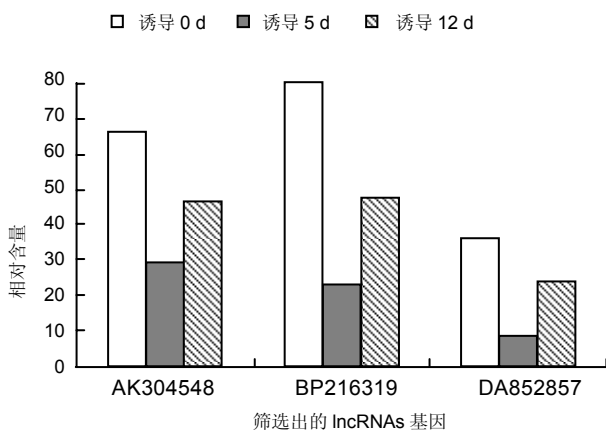


图 6 IncRNAs 在诱导 0, 5, 12 d 差异表达

Figure 6 Differential expression of long non-coding RNAs induced for 0, 5 and 12 days

图注: AK304548、BP216319、DA852857 在成脂诱导过程中, 0, 5, 12 d 呈现先下调后上调的变化规律。

表 2 标本 1, 2, 3 诱导 0, 5, 12 d ds-cDNA 定量分析及质检

Table 2 Quantitative analysis and quantification of ds-cDNA in samples 1, 2 and 3 induced for 0, 5 and 12 days

样品编号	$A_{260/280}$ 比值	$A_{260/230}$ 比值	浓度(mg/L)	体积(μ L)	质量(ng)
1(S1-0)	1.86	1.98	72.65	25.00	1 816.25
2(S1-5)	1.88	1.84	99.11	25.00	2 477.75
3(S1-12)	1.83	1.96	54.37	25.00	1 359.25
4(S2-0)	1.87	1.83	138.42	20.00	2 768.40
5(S2-5)	1.92	1.84	81.69	20.00	1 633.80
6(S2-12)	1.86	1.80	48.08	20.00	961.60
7(S3-0)	1.91	1.85	137.65	20.00	2 753.00
8(S3-5)	1.81	1.84	61.27	20.00	1 225.40
9(S3-12)	1.84	1.84	51.65	20.00	1 033.00

表注: 分光光度计结果显示 A_{260}/A_{280} 比值均在 1.8-2.1 之间, A_{260}/A_{230} 比值均 >1.8 , 表明样本 1、2、3 ds-cDNA 纯度较高, 可用于后续试验。

表 5 IncRNAs 的相对含量及差异表达倍数

Table 5 Relative contents and fold change of long non-coding RNAs

样品编号	AK304548	BP216319	DA852857
A	6.65E-03	8.00E-03	3.70E-03
B	2.94E-03	2.29E-03	8.70E-04
C	4.68E-03	4.75E-03	2.43E-03
C/A	0.70	0.59	0.66
C/B	1.60	2.07	2.79
A/B	2.26	3.49	4.25

3 讨论 Discussion

3.1 IncRNAs 的来源及功能特点 IncRNAs 是指大于 200 nt 的 RNAs, 位于细胞核或胞浆内, 不参与或很少参与蛋白质的编码^[12]。学者们曾经认为其是转录的“暗区”, 但最新的研究已表明这些转录产物可能直接参与细胞的调控^[13], 在功能上可分为 4 大类或原型: 信号, 诱饵, 向导和支架在多种生物学过程中发挥作用^[14], 尤其是癌症的发病过程^[15]。然而对于 IncRNAs 在人脂肪干细胞脂向分化过程中差异性表达的研究还处于初级阶段, 作者结合芯片技术及生物信息学分析, 力求在脂向分化过程中发现 IncRNAs 的差异表达, 为肥胖的治疗提供新的思路。

3.2 IncRNAs 微阵列芯片 (Microarrays) 及生物信息学分析 作者体外培养 3 例人脂肪干细胞并成功脂向诱导分化, 分别对诱导 0, 5, 12 d 细胞的 IncRNAs 运用 cDNA 微阵列进行芯片测序, 获得数以万计的 IncRNAs、mRNAs 表达谱及

其差异表达谱。按照差异倍数 ≥ 1.5 ($P < 0.05$, 差异有显著性意义)进行初步筛选, 不再赘述。为缩小研究范围, 作者按照 $\text{Fold Change} \geq 2.0$ ($P < 0.01$) 从大量差异表达的 lncRNA 中进一步筛选, 根据生物信息学报告从筛选结果中再进一步选择可能与脂类代谢相关的 lncRNA, 共 28 个。

3.3 筛选目的 lncRNAs 对得到的 28 个可能与脂类代谢相关的 lncRNAs 进行逐一分析, lncRNA-AK304548 及其靶基因 ARHGEF2 在 3 个标本中均呈现先下调后上调的趋势, 且差异倍数明显; lncRNA-BP216319 及其相关的靶基因脂肪酸结合蛋白 (FABP3) 在 3 个标本中均呈现一致的先下调后上调的变化趋势, 且已有大量的文献表明 FABP3 与脂肪代谢密切相关; lncRNA-DA852857 仅在标本 2、3 中呈现一致的先上调后下调的趋势, 且其靶基因 CALD1 可能由于表达量少, 信号强度较低被过滤掉而导致芯片数据缺失, 虽在标本 1 中未呈现此变化趋势, 但考虑到数据质量检测, 根据样本相关性及层次聚类发现标本 1 数据不同于标本 2 和 3 的数据, 在单个基因位点数据偏差大, 故仍将其列入进一步验证的 lncRNA; 对筛选出以上 3 个 lncRNAs 做进一步验证。

3.4 对目的 lncRNAs 及其可能的靶基因进行 qRT-PCR 验证 qRT-PCR 验证得出 3 个筛选出的 lncRNAs 及其对应的靶基因在 0, 5, 12 d 均呈现先下调后上调的变化趋势, 这与 lncRNA-AK304548 及靶基因 ARHGEF2, lncRNA-DA852857 及靶基因 FABP3 芯片数据结果相符, 与 lncRNA-DA852857 芯片数据结果不符, 故说明芯片在 DA852857 点出现假阳性且其靶基因 CALD1 在芯片数据缺失, 所以无法比较; 因此进一步筛选出 lncRNA-AK304548、BP216319 及对应的靶基因 ARHGEF2、FABP3 留作后续研究分析。

3.5 差异表达的 lncRNAs 及其可能的靶基因简要分析

3.5.1 AK304548 和靶基因鸟嘌呤核苷酸交换因子 (ARHGEF2) ARHGEF2 是鸟嘌呤核苷酸交换因子家族的一员, 目前国内外并未发现对 ARHGEF2 功能研究的文献, 所以根据 ARHGEF 家族基因预测其可能的作用。ARHGEF 家族主要参与核内有丝分裂、微管肌动蛋白、细胞骨架等细胞增殖相关的生物学过程。Finucane 等^[16]证明参与乳汁合成基因表达发生上调的同时, 与细胞增殖相关的基因则受到抑制。上调表达的基因主要与转运活动(氨基酸、葡萄糖、离子的转运等)、脂类和糖代谢以及细胞信号因子相关, 下调表达的基因主要与细胞周期和增殖、DNA 复制和微型染色体组建、以微管为基础的过程以及蛋白质和 RNA 降解相关。

在实验中脂肪干细胞诱导分化 0 d, 细胞仍处于增殖状态, 所以与细胞增殖相关的基因 ARHGEF2 高表达, 诱导开始至 5 d, 细胞处于向脂肪细胞分化状态, 与脂类代谢、调节转录等相关的基因及细胞因子高表达, 而与增殖相关的 ARHGEF2 受到抑制则处于低表达状态。诱导至 12 d,

约 80% 的脂肪细胞分化完成, 由于脂肪细胞的体积较分化前要大, 参与细胞微管、肌动蛋白、细胞骨架等相关的基因 ARHGEF2 明显上调, 甚至高于诱导分化前。

AK304548 与其靶基因 ARHGEF2 呈现相同的变化趋势, 这说明 AK304548 与 ARHGEF2 正向相关。AK304548 位于 1 号染色体, 是一个来源于 lincRNAs 的 lincRNA。序列名称为 HMI lncRNA1024。作为信号或诱饵的 lncRNAs 的功能主要是参与基因的表达和调控, 而作为向导和支架的 lncRNAs 主要是参与表观遗传修饰^[17]。根据 ARHGEF2 在脂肪干细胞成脂分化中受到抑制, 可以推断 AK304548 在调控网络中可能作为信号或者诱饵发挥调节基因激活或抑制的作用。而一个 lncRNA 分子可能具有不同功能类型的几个功能, 也可能存在复杂的功能类型或者是不同分子机制的组合^[18]。所以 AK304548 在脂肪干细胞脂向分化中的作用及其与 ARHGEF2 的调节关系需要在下一步对 AK304548 通过功能缺失实验, 构建慢病毒载体、转染脂肪干细胞中进一步研究。

3.5.2 BP216319 及其可能的靶基因脂肪酸结合蛋白 (FABP3) FABP3 是有效的棕色脂肪组织中的脂肪酸氧化和抗寒性的关键^[19], 参与适应性发热需求^[20], 在胰岛细胞中与 FABP5 一起由脂肪酸和葡萄糖调控^[21], 在脂类代谢过程中主要参与细胞内脂肪酸转运。其代谢水平与细胞内转运及脂类代谢密切相关^[22]。脂肪细胞形成是由转录级联驱动管理的, 在很大程度上依赖于过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ), 它是脂肪细胞富含的核内受体。PPAR γ 是脂肪形成所必须的, 至今还没有发现在 PPAR γ 不存在的情况下其他因子能够诱导脂肪形成^[10]。而 FABP 可能作为 PPAR γ 表达的触发器发挥作用, 但是这具体的机制还需要进一步研究^[23]。实验中在脂肪干细胞诱导分化的 0 d, 脂肪细胞内的脂肪酸运输处于平衡状态, 当诱导开始后至 5 d, 脂肪细胞分化的转录调节开始活跃, PPAR γ 表达增加, 这时脂肪酸的合成也开始活跃, 由于脂肪酸合成较少, 参与运输的 FABP3 的表达下降, 脂质堆积较少, 而到诱导后 12 d, 近 80% 的脂肪细胞分化完成, 一方面 PPAR γ 的增加上调了 FABP, 另一方面脂质合成增多, 脂肪酸运输活跃, FABP 增加, 脂质堆积增多。BP216319 以 FABP3 作为靶基因, 呈现与 FABP3 相同的变化趋势, 可能在调控 FABP3 合成中起到正向调控作用。成脂分化开始后 BP216319 处于低表达水平, 分化基本完成时恢复到高表达水平。这种变化趋势表明, 在脂肪干细胞脂向分化时, BP216319 受到抑制。如前所述, 作为信号或诱饵的 lncRNAs 的功能主要参与基因的表达和调控, 而作为向导和支架的 lncRNAs 主要参与表观遗传修饰^[24]。这表明 BP216319 可能也是作为信号或诱饵发挥调控作用。

3.6 实验中存在的局限性 本实验的局限性在于仅选取 3 例样本, 数量较少, 存在偶然性。其中标本 1 与标本 2、3 细胞的培养及芯片测序是分次进行的, 可能存在误差。芯

片cDNA微阵列分析lncRNAs存在假阳性及假阴性,需要一种精确度更高的技术手段来检测lncRNAs。随着对lncRNAs研究的深入,越来越多的lncRNAs被发现。现在在本实验应用的芯片功能注释的lncRNAs数量较少,仍有许多刚发现的lncRNAs未纳入。鉴于国内外研究的现状,脂肪干细胞脂向分化相关的基因调控网络仍未完善,所以研究所涉及到的mRNA可能不全,有待进一步深入研究。

3.7 下一步的研究方向 增加样本量并进行芯片扫描测序,进一步选择以成脂相关基因为靶基因且差异倍数较大的lncRNAs进行qRT-PCR验证,筛选出符合芯片测序结果的lncRNAs,连同现阶段筛选出的2个lncRNAs一起分别进行过表达及功能缺失实验,构建慢病毒载体转染脂肪干细胞,并进行油红O染色鉴定,qRT-PCR检测成脂相关转录因子及成脂标记基因的表达式,Western blot定量分析成脂相关蛋白表达式,最后荧光素酶法验证其与靶基因的关系及作用。

作者贡献: 实验设计为彭智、岳文峻,实验实施为岳文峻、王香梅、韦有万,实验评估为王香梅、黄海华,资料收集为张芹、韦有万。岳文峻成文,彭智审核,彭智对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 脂肪标本经当事人签署协议书后同意用于科学研究,实验获得广东医学院伦理委员会批准。

学术术语: 长非编码RNA-是指大于200 nt的RNAs,位于细胞核或胞浆内,不参与或很少参与蛋白质的编码。

作者声明: 文章为原创作品,无抄袭剽窃,无泄密及署名和专利争议,内容及数据真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Kajimoto K, Naraba H, Iwai N. MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. *RNA*. 2006;12(9):1626-1632.
- [2] Esau C, Kang X, Peralta E, et al. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 2004;279(50):52361-52365.
- [3] Lin Q, Gao Z, Alarcon RM, et al. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *FEBS J*. 2009;276(8):2348-2358.
- [4] Cheung O, Puri P, Eicken C, et al. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology*. 2008;48(6):1810-1820.
- [5] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002;12(9):735-739.
- [6] Xie H, Sun L, Lodish HF. Targeting microRNAs in obesity. *Expert Opin Ther Targets*. 2009;13(10):1227-1238.
- [7] Hilton C, Neville MJ, Karpe F. MicroRNAs in adipose tissue: their role in adipogenesis and obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(3):325-332.
- [8] Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ. Role of microRNAs in obesity and the metabolic syndrome. *Obes Rev*. 2010;11(5):354-361.
- [9] Kajimoto K, Naraba H, Iwai N. MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. *RNA*. 2006;12(9):1626-1632.
- [10] Sun L, Goff LA, Trapnell C, et al. Long noncoding RNAs regulate adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(9):3387-3392.
- [11] 彭智,陈崎,贾振华,等.组织块培养法扩增人脂肪源性干细胞的生物学特征鉴定[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(36):6689-6694.
- [12] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet*. 2009;10(3):155-159.
- [13] Kung JT, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics*. 2013;193(3):651-669.
- [14] Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*. 2011;43(6):904-914.
- [15] Derrien T, Guigó R, Johnson R. The Long Non-Coding RNAs: A New (P)layer in the "Dark Matter". *Front Genet*. 2012;2:107.
- [16] Finucane KA, McFadden TB, Bond JP, et al. Onset of lactation in the bovine mammary gland: gene expression profiling indicates a strong inhibition of gene expression in cell proliferation. *Funct Integr Genomics*. 2008;8(3):251-264.
- [17] 吕玉龙.基于双聚类的基因表达芯片分析[D].上海:上海大学,2009.
- [18] Da Sacco L, Baldassarre A, Masotti A. Bioinformatics Tools and Novel Challenges in Long Non-Coding RNAs (lncRNAs) Functional Analysis. *Int J Mol Sci*. 2012;13(1):97-114.
- [19] Vergnes L, Chin R, Young SG, et al. Heart-type fatty acid-binding protein is essential for efficient brown adipose tissue fatty acid oxidation and cold tolerance. *J Biol Chem*. 2011;286(1):380-390.
- [20] Yamashita H, Wang Z, Wang Y, et al. Induction of fatty acid-binding protein 3 in brown adipose tissue correlates with increased demand for adaptive thermogenesis in rodents. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377(2):632-635.
- [21] Hyder A, Zenhom M, Klapper M, et al. Expression of fatty acid binding proteins 3 and 5 genes in rat pancreatic islets and INS-1E cells: regulation by fatty acids and glucose. *Islets*. 2010;2(3):174-184.
- [22] 南雪梅.奶山羊乳腺物质代谢研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2010.
- [23] Shi H, Zhang Q, Wang Y, et al. Chicken adipocyte fatty acid-binding protein knockdown affects expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ gene during oleate-induced adipocyte differentiation. *Poult Sci*. 2011;90(5):1037-1044.
- [24] Finucane KA, McFadden TB, Bond JP, et al. Onset of lactation in the bovine mammary gland: gene expression profiling indicates a strong inhibition of gene expression in cell proliferation. *Funct Integr Genomics*. 2008;8(3):251-264.