

文章编号:1000-5404(2013)11-1115-04

论著

KCTD15 基因调控 3T3-L1 脂肪前体细胞分化的研究

徐景¹, 赵旭², 杨莹², 徐梓辉¹ (400037 重庆, 第三军医大学新桥医院内分泌科¹; 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** 探讨含钾通道四聚化结构域 15(KCTD15)基因在 3T3-L1 脂肪前体细胞分化过程中的作用。**方法** ①采用半定量逆转录 PCR 检测在 3T3-L1 脂肪前体细胞分化过程中 KCTD15 mRNA 表达变化。②在 3T3-L1 脂肪前体细胞增殖早期通过 RNA 干扰技术靶向敲低 KCTD15 基因的表达,在靶向敲低 KCTD15 基因后的转染 KCTD15 siRNA 48 h 后通过半定量逆转录 PCR 验证 KCTD15 基因的敲低效果。用油红 O 染色法观察 KCTD15 敲低后 3T3-L1 细胞第 0 天和第 10 天的细胞形态学改变。③采用半定量逆转录 PCR 检测 KCTD15 基因敲低后 PPAR γ 、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 成脂基因的变化。**结果** 在 3T3-L1 脂肪前体细胞分化过程中, KCTD15 mRNA 表达水平逐渐降低($P < 0.05$); KCTD15 敲低能显著抑制 3T3-L1 脂肪前体细胞分化; KCTD15 敲低后 PPAR γ 、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 成脂基因无明显变化。**结论** 在分化早期阶段敲低 KCTD15 基因能抑制 3T3-L1 脂肪前体细胞分化。

[关键词] KCTD15 基因; 3T3-L1 脂肪前体细胞; 细胞分化; 肥胖

[中图分类号] R392.2; R394-33; R394.2

[文献标志码] A

Potassium channel tetramerisation domain containing 15 regulates preadipocyte differentiation

Xu Jing¹, Zhao Xu², Yang Ying², Xu Zihui¹ (¹Department of Endocrinology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; ²Disease Genomics and Individualized Medicine Laboratory, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100029, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of potassium channel tetramerisation domain containing 15 (KCTD15) gene on preadipocyte differentiation. **Methods** The expression of KCTD15 gene during 3T3-L1 preadipocyte differentiation was detected by semi-quantitative reverse transcriptase PCR. After transferring KCTD15 siRNA into the preadipocytes, the cell morphology was observed during preadipocyte differentiation by oil red O staining, and the level of triglyceride was examined by assay kit. The expression of adipogenesis genes, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ , CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) α , C/EBP β and C/EBP δ was detected by semi-quantitative reverse transcriptase PCR. **Results** The expression of KCTD15 gene was decreased during 3T3-L1 cell differentiation. KCTD15 gene knockdown inhibited the differentiation and lipid accumulation of 3T3-L1 cells, and there was no significant change in the expression of PPAR γ , C/EBP α , C/EBP β and C/EBP δ . **Conclusion** KCTD15 gene deficiency leads to the inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation at early stage.

[Key words] KCTD15 gene; 3T3-L1 preadipocyte; adipocyte differentiation; obesity

Corresponding author: Xu Zihui, Tel: 86-23-68755709, E-mail: zihuixu@yahoo.com.cn

肥胖症是在遗传和各种环境因素相互作用下引起能量摄取消耗不平衡,机体出现异常的脂肪积累的代谢紊乱状态,其特征性表型为脂肪细胞数目增多和体积增大^[1]。

到目前为止,超过 600 个基因位点和候选基因被

发现与肥胖相关。2009 年对大量人群进行全基因组关联研究(GWAS)分析筛选出含钾通道四聚化结构域 15(KCTD15)基因与体质指数(BMI)相关^[2],后续对大量的人群调查也证实了 KCTD15 基因与肥胖的相关性^[3-7]。但到目前为止,对 KCTD15 在 3T3-L1 脂肪前体细胞分化过程中的作用尚少见报道。本研究旨在检测 3T3-L1 脂肪前体细胞分化过程中 KCTD15 基因的表达变化,观察 KCTD15 基因敲低后对 3T3-L1 脂肪前

[通信作者] 徐梓辉,电话:(023)68755709, E-mail: zihuixu@yahoo.com.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130313.0841.004.html> (2013-03-13)

体细胞分化的影响,初步探讨其作为肥胖基因治疗靶点的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠 3T3-L1 脂肪前体细胞系购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所,DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司,油红 O 染料、胰蛋白酶、胰岛素、地塞米松、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)均购自 Sigma-Aldrich 公司,新生胎牛血清(new born calf serum, NBSC)购自 HyClone 公司,胎牛血清(fetal bovine calf serum gold, FBS)购自 PAA 公司, KCTD15 siRNA 由上海吉玛公司合成, KCTD15 抗体购自 Sigma 公司,逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司,组织甘油三酯酶法测定试剂盒购自普利莱公司, rTaq 酶购自 TaKaRa 公司,引物由上海生物生工技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 3T3-L1 脂肪前体细胞培养及诱导分化 根据 3T3-L1 脂肪前体细胞培养和诱导分化方案^[8],用完全培养基[DMEM 培养基 + 100 mL/L 新生胎牛血清 + 青霉素 100 U/mL + 链霉素 100 g/mL + 非必需氨基酸 (NEAA) 100 U/mL] 在 37 °C 孵箱 (50 mL/L CO₂) 中培养,每 2 天换液 1 次。细胞融合度在 50% 时被接种在 6 孔板中,待细胞长至完全融合后 2 d (第 0 天),开始换诱导液 I [含有 0.5 mol/L IBMX + 10 μmol/L 地塞米松 + 10 μg/mL 胰岛素的 FBS 培养基 (DMEM + 100 mL/L 胎牛血清 + 青霉素 100 U/mL + 链霉素 100 μg/mL + 非必需氨基酸 100 U/mL)] 诱导分化 48 h,诱导液 II (含有 10 μg/mL 胰岛素的 FBS 培养基) 诱导分化 48 h,完全培养基继续培养,每 2 天换液 1 次,至第 10 天 70% ~ 80% 的细胞已分化为成熟的脂肪细胞。在细胞诱导分化的第 2、5、10 天分别收集细胞,存放于 -80 °C 低温冰箱中保存。

1.2.2 3T3-L1 脂肪前体细胞的鉴定(油红 O 染色法) 鉴定配置 30 g/L 的油红 O 染料为储存液,使用时将其以 6:4 的比例与蒸馏水混合为工作液,PBS 冲洗细胞,在 10% 甲醛中固定 1 h,0.35% 的油红异丙醇溶液用等体积的水稀释后,分别取第 0、10 天的细胞加入固定好的细胞中,然后冲洗,油红 O 染色 1 h,蒸馏水冲洗至背景透明。染色后观察并拍照,经计算机扫描后,进行图像分析,以红色所占的比例表示 3T3-L1 前脂肪细胞的分化率。

1.2.3 RT-PCR 方法检测 3T3-L1 脂肪前体细胞中 KCTD15 mRNA 的表达水平及 KCTD15 敲低后成脂基因的变化 用 Trizol 提取细胞的总 RNA,以 Oligo (dT)₁₈ 为引物进行逆转录,逆转录反应体系 25 μL。取 1 μg RNA 按照试剂盒 (Fermentas, K1611) 说明书要求进行逆转录合成 cDNA,混合后按下列条件反应:25 °C 5 min,42 °C 60 min,70 °C 5 min。取逆转录产物 1 μL 为模板进行 PCR 扩增,反应体系为 25 μL。引物由上海生物生工公司合成, KCTD15 上游 5'-ATGGGGAGATTTCCGCTAC-3',下游:5'-GGGGCTCCTGCTTTATCC-3',产物长度 166 bp;过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, PPARγ) 上游:5'-GACCACTCGCATTCCTTT-3',下游:5'-GGCATTGTGAGACATCCC-3',产物长度 459 bp;CCAAT

增强子结合蛋白 (CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP) α 上游:5'-CCC-CACTTGCAGTTCAGAT-3',下游:5'-CGTTGCGTT-GTTTGGCT-TT-3',产物长度 328 bp; C/EBPβ 上游:5'-ACCAC-GACTTCCTCTCCGAC-3',下游:5'-TCAGCTTGTCCACCGTCTTC-3',产物长度 417 bp; C/EBPδ 上游:5'-CTGTGCCACGACGA-ACTCTT-3',下游:5'-TGCAGCTTCTCGTTCTCG-3',产物长度 476 bp;内参照 β-actin 基因上游:5'-AGCCATGTACGTAGC-CATCC-3',下游:5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTAA-3',产物长度 224 bp。循环条件为预变性 95 °C 5 min,变性 95 °C 30 s,退火 55 °C 30 s,延伸 72 °C 30 s,终末延伸 72 °C 10 min,共 40 个循环 (KCTD15)/25 个循环 (β-actin 等)。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定量并摄像电泳条带的灰度,以确定扩增产物的相对量。采用 Bio-Rad Quantity One 图像分析软件分析数据,通过 Quantity One 软件定量,获得各电泳条带的光密度值 [D(260)],以 β-actin 的 D(260) 作为内参照,计算 KCTD15 基因的相对表达量并进行半定量分析。

1.2.4 瞬时转染实验 小鼠 KCTD15 siRNA 和非特异 siRNA 由上海吉玛公司设计合成, KCTD15 所有的 siRNA 序列如下所示:① 5'-GACGUCUAAAACUGCUGCUU-3',② 5'-CAACUGCU-GUCCGGAAUAAA-3',③ 5'-GGCUACUGUAGACUCAACU-3';非特异 siRNA,5'-UUCUCCGACGUGUCACGU-3'。将生长状态良好的 3T3-L1 脂肪前体细胞接种于 6 孔板内,每个孔内的细胞分布约 40%,24 h 后细胞占据整个孔的 60% 左右,按照 Invitrogen 公司阳离子脂质体转染法说明书瞬时转染 3 条序列混合好的 KCTD15 siRNA,非特异性 siRNA 作为空白对照。转染后继续培养 12 h 后吸取原有培养基,加入 3 mL FBS 培养基继续培养 48 h 后,收集细胞,提取总 RNA 用于半定量 RT-PCR 实验,提取总蛋白用于 Western blot 检测。收集诱导后第 10 天的细胞进行油红 O 染色及甘油三酯分析。

1.2.5 Western blot 检测 KCTD15 蛋白转染效率 分别收集 2 组细胞,经细胞裂解液处理,提取细胞总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度。各组分别取蛋白 150 μg,上样,经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后转 PVDF 膜,PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。加入一抗,4 °C 轻摇过夜。各一抗的稀释度为:兔抗人 KCTD15 多克隆抗体 1:2 000,兔抗人 β-tubulin 1:5 000。TBST 洗膜 4 次后,加入羊抗兔抗体 (1:5 000),室温孵育 1 h;TBST 洗膜 4 次后,ECL 显色,暗室里 X 线曝光,常规方法显影、定影,以蛋白条带的灰度值确定转染 KCTD15 siRNA 后的转染效率。

1.3 统计学分析

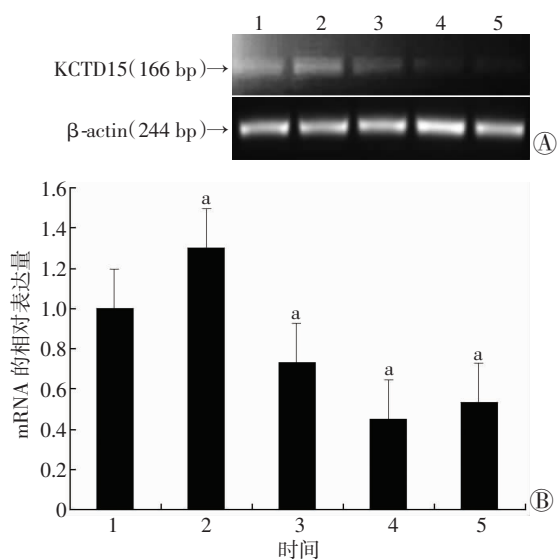
采用 SPSS 16.0 统计软件,所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Excel 统计软件进行数据整理和统计。符合正态分布的资料,组内比较行独立样本 t 检验,多组间比较行单因素方差分析;非正态分布资料行对数转换后再进行统计分析。

2 结果

2.1 3T3-L1 脂肪前体细胞分化过程中 KCTD15 基因表达水平的变化

3T3-L1 脂肪前体细胞被诱导分化,在分化过程中的不同时间点检测 KCTD15 的表达。结果显示:在分化开始阶段, KCTD15 基因表达水平升高;随着 3T3-L1 脂肪前体细胞分化成

熟,KCTD15 基因表达水平呈逐渐下降趋势(图 1A)。我们用 Quantity One 软件定量分析 PCR 产物及蛋白条带灰度值,KCTD15 基因表达水平用 β -actin 基因表达水平的灰度值标准化后统计分析,结果显示:在 3T3-L1 脂肪前体细胞分化过程中,KCTD15 基因表达在第 0 天升高,而后逐渐降低(图 1B)。



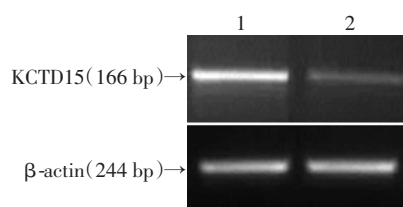
1:分化前 2 d;2:分化第 0 天;3:分化第 2 天;4:分化第 5 天;5:分化第 10 天

A:RT-PCR 检测结果; B:半定量分析结果 a: $P < 0.05$, 与分化前 2 d 比较

图 1 RT-PCR 检测 3T3-L1 脂肪前体细胞分化过程中 KCTD15 基因的表达

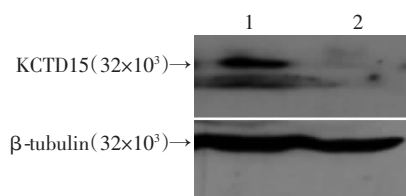
2.2 siRNA 的干扰效果检测

将 KCTD15 siRNA 和非特异性 siRNA 分别转染到 3T3-L1 脂肪前体细胞中,转染 72 h 后提取细胞总 RNA。RT-PCR 及 Western blot 检测结果显示,将 KCTD15 siRNA 和非特异性 siRNA 转染到 3T3-L1 脂肪前体细胞成功抑制了 KCTD15 mRNA 和蛋白的表达(图 2,3)。



1:空白对照组;2:转染 KCTD15 siRNA 组

图 2 RT-PCR 检测 KCTD15 基因敲低后 2 组细胞中 KCTD15 mRNA 的表达

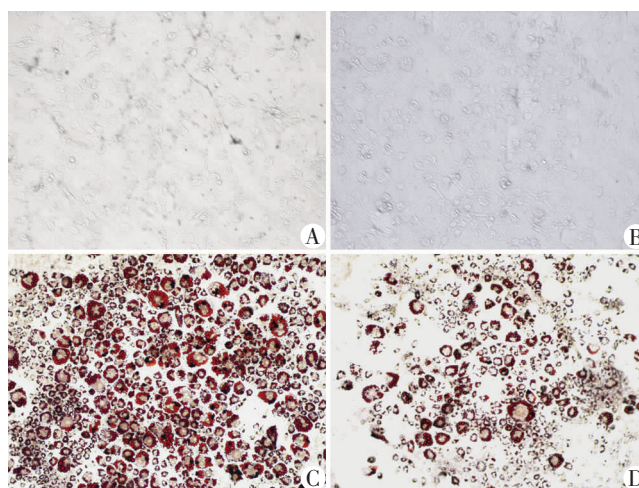


1:空白对照组;2:转染 KCTD15 siRNA 组

图 3 Western blot 检测 KCTD15 基因敲低后 2 组细胞中 KCTD15 蛋白的表达

2.3 KCTD15 基因敲低后对 3T3-L1 脂肪前体细胞分化的影响

KCTD15 基因敲低后,在 3T3-L1 脂肪前体细胞分化的第 10 天,通过油红 O 染色检测脂肪细胞的分化程度。结果显示:3T3-L1 脂肪前体细胞生长至完全融合后 2 d(第 0 天)开始诱导分化,第 10 天可见含有亮红色脂滴的成熟脂肪细胞在视野中占 80% 以上,且细胞体积大、形态圆,但比起空白对照组,脂肪细胞分化明显被抑制(图 4)。我们用甘油三酯定量分析脂质积累情况,结果显示与空白对照组 (100.0 ± 13.2) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 比较,在 KCTD15 基因敲低的脂肪细胞中,甘油三酯积累水平 (70.7 ± 13.4) $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 明显降低 ($P < 0.05$)。

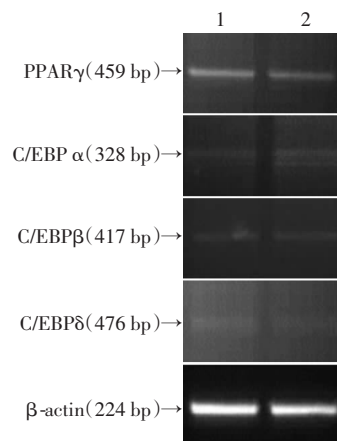


A, B:分化第 0 天;C, D:分化第 10 天;A, C:空白对照组;B, D:转染 KCTD15 siRNA 组

图 4 倒置显微镜观察 KCTD15 基因敲低后抑制脂肪细胞分化 (油红 O $\times 40$)

2.4 KCTD15 基因敲低后成脂基因的变化

在脂肪前体细胞分化的前 2 d 转染 KCTD15 基因的 siRNA,在转染 48 h 后提取细胞的 RNA,通过 RT-PCR 方法检测了 PPAR γ 、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 成脂基因的变化。结果显示:与空白对照组比较,PPAR γ 、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 成脂基因的 mRNA 表达水平无明显变化(图 5)。



1:空白对照组;2:转染 KCTD15 siRNA 组

图 5 RT-PCR 检测 KCTD15 基因敲低后 PPAR γ 、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ mRNA 的表达

3 讨论

KCTD15 基因属于 KCTD 家族成员之一,编码含 KCTD15,最早在人类被鉴定为具有保守 C 末端的功能未知的 BTB 结构蛋白^[9]。有研究已经证实了 KCTD15 基因的遗传变异与肥胖相关^[10],并能减少脂肪氧化率^[11]。Gutierrez-Aguilar 等^[12]在高脂饮食喂养的大鼠皮下脂肪组织,KCTD15 基因表达下调。另有研究表明,在高脂饮食喂养小鼠的肝脏、脂肪组织和下丘脑中 KCTD15 表达下调,在大脑中不表达^[13]。以上结果提示该基因可能参与脂肪细胞诱导分化的调控过程,与肥胖发生相关。我们推测其可能参与了脂肪细胞分化成熟的调控。因此,我们检测了 KCTD15 在 3T3-L1 脂肪前体细胞分化过程中的表达。3T3-L1 脂肪前体细胞分化能够模拟活动脂肪组织的功能,因而成为研究脂肪细胞分化的常用工具^[14-15]。我们利用脂肪前体细胞为模型,诱导其分化,在诱导分化前,细胞呈梭形形成纤维细胞形态;细胞生长至完全融合后 2 d (第 0 天)开始诱导分化,从第 4 天开始细胞进入终末分化和脂质积累阶段。我们发现在细胞分化的早期阶段,KCTD15 的表达升高,在分化的后期阶段 KCTD15 的表达降低。

为了进一步研究 KCTD15 在 3T3-L1 脂肪前体细胞中的功能,我们采用 RNA 干扰技术敲低该基因在 3T3-L1 脂肪前体细胞中的转录,通过观察 3T3-L1 脂肪前体细胞的分化和脂质积累情况来验证该基因对脂肪细胞的调控机制。结果显示在 3T3-L1 脂肪前体细胞分化早期,敲低 KCTD15 基因后抑制 3T3-L1 脂肪前体细胞的分化和脂质积累。这意味着 KCTD15 可能在 3T3-L1 脂肪前体细胞分化早期促进分化及脂肪形成过程中发挥了重要作用;在 3T3-L1 脂肪前体细胞分化的晚期,它的功能可能因其表达逐渐减低对分化影响减小。我们推测该基因可能参与了促细胞有丝分裂过程从而影响细胞增殖,在分化的后期阶段该基因可能被某种蛋白降解而导致其表达降低,因而在分化后期阶段作用不显著。

3T3-L1 脂肪前体细胞分化受到许多关键因子(如 PPAR γ 和 C/EBP 等转录因子)的协同调控^[16]。PPAR γ 和 C/EBP 表达能活化成脂基因的表达从而启动细胞分化,最终导致甘油三酯的积累^[16]。该基因是否能调控这些启动和影响成脂过程的关键因子的变化从而发挥影响成脂的功能?为此,我们检测了 KCTD15 基因敲低后这些关键转录因子的变化,结果发现 PPAR γ 和 C/EBP 等转录因子的表达在 KCTD15 敲低前后均无明显变化,这提示 KCTD15 基因敲低后对 3T3-L1 脂肪前体细胞分化的抑制并没有影响调控 3T3-L1 脂肪前体细胞分化关键转录因子的表达。因

此,对于 KCTD15 基因调控脂肪细胞成脂功能潜在的分子机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Tchernof A, Despres J P. Pathophysiology of human visceral obesity: an update[J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(1): 359-404.
- [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] Li S, Zhao J H, Luan J, et al. Cumulative effects and predictive value of common obesity-susceptibility variants identified by genome-wide association studies[J]. *Am J Clin Nutr*, 2010, 91(1): 184-190.
- [4] Bauer F, Elbers C C, Adan R A, et al. Obesity genes identified in genome-wide association studies are associated with adiposity measures and potentially with nutrient-specific food preference[J]. *Am J Clin Nutr*, 2009, 90(4): 951-959.
- [5] Elks C E, Loos R J, Hardy R, et al. Adult obesity susceptibility variants are associated with greater childhood weight gain and a faster tempo of growth: the 1946 British Birth Cohort Study[J]. *Am J Clin Nutr*, 2012, 95(5): 1150-1160.
- [6] Mei H, Chen W, Jiang F, et al. Longitudinal replication studies of GWAS risk SNPs influencing body mass index over the course of childhood and adulthood[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31470.
- [7] 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.
- [8] Kim S J, Lee K H, Lee Y S, et al. Transcriptome analysis and promoter sequence studies on early adipogenesis in 3T3-L1 cells[J]. *Nutr Res Pract*, 2007, 1(1): 19-28.
- [9] Hotta K, Nakamura M, Nakamura T, et al. Association between obesity and polymorphisms in SEC16B, TMEM18, GNPDA2, BDNF, FAIM2 and MC4R in a Japanese population [J]. *J Hum Genet*, 2009, 54(12): 727-731.
- [10] Elks C E, Loos R J, Sharp S J, et al. Genetic markers of adult obesity risk are associated with greater early infancy weight gain and growth [J]. *PLoS Med*, 2010, 7(5): e1000284.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Tong Q, Hotamisligil G S. Molecular mechanisms of adipocyte differentiation[J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2001, 2(4): 349-355.
- [15] Eliasson P, Andersson T, Aspenberg P. Influence of a single loading episode on gene expression in healing rat Achilles tendons[J]. *J Appl Physiol*, 2012, 112(2): 279-288.
- [16] Neel B A, Brady M J, Sargis R M. The endocrine disrupting chemical tolylfluanid alters adipocyte metabolism via glucocorticoid receptor activation[J]. *Mol Endocrinol*, 2013, 27(3): 394-406.

(收稿:2012-12-05;修回:2013-03-07)

(编辑 栾嘉)