

• 基础研究 •

应用高通量基因表达谱芯片研究替米沙坦对成熟脂肪细胞的影响

陈康 窦京涛 潘长玉 邓斌 闫文华 邢光 汪保安 毋义明 陆菊明

【摘要】 目的 应用基因表达谱芯片技术筛查替米沙坦独立干预下成熟脂肪细胞的差异表达基因,进而对替米沙坦作用下成熟脂肪细胞的功能变化进行预测。方法 将 3T3-L1 前脂肪细胞诱导为成熟脂肪细胞并进行替米沙坦(0.1mg/L)干预,Trizol 一步法提取总 RNA 并纯化,反转录合成荧光分子(Cy3/Cy5)标记的 cDNA 探针,分别与含有 36 000 个基因或基因片段的高通量小鼠全基因组寡核苷酸微阵列芯片杂交,杂交信号经扫描和数字化处理,筛选替米沙坦干预组与对照组成熟脂肪细胞间的差异表达基因,进而通过生物信息学数据分析推测替米沙坦独立作用下对于成熟脂肪细胞功能的影响以及可能信号途径。结果 共筛选 157 个差异表达基因,其中表达上调的基因 86 个,表达下调的基因 71 个,这些基因涉及脂质代谢、细胞分化及成脂过程以及脂肪细胞分泌,其基因功能可能参与替米沙坦对于脂肪细胞功能的独立影响。通过信号通路的生物信息学分析,包括细胞-细胞受体相互作用、细胞黏附分子、脂肪细胞因子信号途径、氧化应激等与脂肪细胞分泌有关的途径均受到影响。此外,替米沙坦还可能作用于脂肪细胞增殖、分化与成脂过程相关途径如 Wnt 信号途径、 β -catenin 相关途径以及 Notch 信号途径等。结论 替米沙坦对成熟脂肪细胞可能具有独立于 AT 受体的特殊作用,并对细胞脂质合成、代谢产生影响。

【关键词】 血管紧张素 II 受体拮抗剂;寡核苷酸序列分析;脂细胞

Effect of telmisartan on mature adipocytes investigated with microarray based high throughput gene expression profile

CHEN Kang, DOU Jingtao, PAN Changyu, et al

Department of Endocrinology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To screen the differentially expressed genes related to lipid metabolisms in the mature adipocytes and to investigate the effect of telmisartan on the cells with microarray based high throughput gene expression profile. Methods The 3T3-L1 preadipocytes were induced into the mature adipocytes, which was then intervened with telmisartan (0.1mg/L). The total RNA was isolated from the cells with or without telmisartan intervention with Trizol method. After purification, reverse transcription was carried out to synthesize Cy3/Cy5 labeled cDNA probe. The probe was hybridized with microarray based high throughput gene expression profile (36 000 genes or gene fragments) to screen the differentially expressed genes in the cells with and without telmisartan intervention. The effect of telmisartan on the function of the mature adipocytes and the possible signal pathway were analyzed. Results A total of 157 differentially expressed genes were screened out, including 86 up-regulated genes and 71 down-regulated ones, which were involved in lipid synthesis, catabolism and transport in the adipocytes. The changes in the expression level of these genes might be related to the effects of telmisartan on function of mature adipocytes, such as cytokine-cytokine receptor interaction, cell adhesion molecules, adipocytokine signaling pathway, oxidative stress, etc. In addition, telmisartan played some roles in certain pathways related to the proliferation, differentiation, and lipid synthesis of mature adipocytes, such as Wnt, β -catenin, and Notch signaling pathways. Conclusion Telmisartan exerts its effect on mature adipocytes in a manner which is independent of AT receptor. Telmisartan may affect the lipid synthesis, catabolism and transport of the mature adipocytes.

【Key words】 angiotensin II receptor blocker; gene expression microarray analysis; adipocyte

血管紧张素 II 受体拮抗剂(angiotensin II receptor blockers, ARBs)作为一类疗效确切的降压药物,其降压以外的作用也越来越受到重视。近年几

个大型的临床试验如 HOPE、LIFE、ALLHAT、CHARM、VALUE 等大都表明血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitors,

收稿日期:2008-09-23

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30671095)

作者单位:100853 北京市,解放军总医院内分泌科

通讯作者:窦京涛,E-mail:jingtaodou@yahoo.com.cn

ACEIs)或 ARBs 类药物可显著减少 2 型糖尿病的发生。Abuissa 等^[1]对 2005 年以前包括上述试验的 12 个临床随机对照试验进行的荟萃分析表明,与安慰剂、利尿剂、 β -受体阻滞剂以及钙离子通道阻滞剂相比,ACEIs 和 ARBs 可以减少 25% 的新发 2 型糖尿病。这一现象的机制并不明确。脂肪组织作为机体能量储存的重要场所,也通过其脂质代谢和分泌作用发挥对机体能量平衡和血糖稳态的调节作用^[2]。脂肪组织中存在肾素-血管紧张素系统,因此也是 ARBs 药物作用的重要靶组织。本实验利用小鼠来源的 3T3-L1 前脂肪细胞进行诱导分化成为成熟的脂肪细胞后,采用高通量表达谱基因芯片-晶芯[®]小鼠全基因组寡核苷酸微阵列芯片(CapitalBio, China)对替米沙坦(telmisartan)影响脂肪细胞功能的可能基因在 mRNA 水平进行全基因组筛查,并采用生物信息学方法对结果进行分析。

1 材料和方法

1.1 3T3-L1 细胞培养和诱导分化 参考 Muneya 等^[3]的方法进行 3T3-L1 小鼠前脂肪细胞(中科院上海生命研究所)的培养和诱导分化。于诱导的第 12 天观察脂肪细胞形态和脂滴形成情况,只有分化率超过 90% 的样品用于进一步的实验。

1.2 药物干预 取诱导分化后的 3T3-L1 细胞分为 2 组,替米沙坦干预组将替米沙坦(Sigma-Aldrich, USA)溶于 DMSO,加入培养液(10% FCS 的 DMEM)中,替米沙坦终浓度为 0.1 mg/L;应用 DMSO 作为对照,终浓度为 0.01%。37℃、5% CO₂ 条件下孵育 12h。

1.3 样品 RNA 的准备 干预结束吸干培养液,洗涤细胞后应用 Trizol(Invitrogen, USA)一步法提取细胞中的总 RNA,通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA,并进一步采用 NucleoSpin[®] RNA clean-up 试剂盒(Macherey-Nagel, Germany)对总 RNA 进行过柱纯化后用紫外分光光度计定量,甲醛变性胶电泳质检。

1.4 对样品 RNA 进行荧光标记和基因芯片杂交 按 CapitalBio 公司实验操作流程进行,将 Cy3-dCTP 和 Cy5-dCTP(GE Healthcare, USA)分别标记来源于替米沙坦干预细胞和对照组细胞总 RNA 的转录产物,标记产物纯化后溶于 80 μ l 杂交液中(3 \times SSC, 0.2% SDS, 5 \times Denhart's, 25% 甲酰胺),于 42℃ 杂交过夜。杂交结束后,在 42℃ 左右含 0.2% SDS, 2 \times SSC 的液体以及室温 0.2 \times SSC 中分别洗 5min。

1.5 芯片的扫描、芯片图像的采集与数据分析 芯片杂交后用 LuxScan 10KA 双通道激光扫描仪进行扫描,用 LuxScan 3.0 图像分析软件分析 Cy3 和

Cy5 两种荧光信号的强度和比值并进行片间线性校正和片内归一化^[4]。表达基因的判定标准为 Cy3 或 Cy5 信号值至少其中之一必须 > 1500; 差异表达基因必须符合以下两条标准:(1)符合表达基因的判定标准;(2)基因点信号值的比值 Cy3/Cy5 > 1.5 或 < 0.5。

1.6 表达基因的筛选和差异基因的信息学分析 删除荧光信号弱的基因(< 1500),以及芯片上的阴性对照、内标、外标等冗余的数据,以 2 倍标准筛选差异表达基因。在进行生物信息学分析时,把筛选出的差异表达基因对照 KEGG(www.genome.jp/kegg/)和 BioCarta(www.biocarta.com)数据库进行途径分析(Pathway analysis)。

1.7 芯片结果进行实时荧光定量 PCR 验证 选择基因芯片筛选的部分差异表达基因进行荧光定量 PCR 验证,荧光定量 PCR 委托北京博奥生物有限公司完成。

2 结果

2.1 样本和芯片质量控制结果 实验中提取的总 RNA 所进行的凝胶电泳(图 1)显示 18S、28S 条带清晰,且 28S 比 18S rRNA 条带亮度大于 1 : 1, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.7~2.2 之间,证实获得了高质量的总 RNA。芯片 Hex(固定化阳性对照序列)、外标(非样品相关的核苷酸序列)、内标(看家基因 M-ACTB, M-GAPD, M-LDHA, M-RPL5)等阳性对照信号正常,阴性对照(50% DMSO)检测为阴性;片内看家基因重复性好,比值的变异度不超过 0.3;无影响数据的污染,漏点率 < 3%;检测率正常。

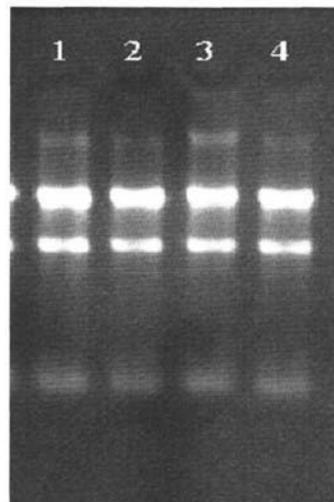


图 1 对照组(第 1、3 泳道)和替米沙坦干预组(第 2、4 泳道)成熟脂肪细胞提取的总 RNA 凝胶电泳图

2.2 差异表达基因 以信号值变化超过 2 倍作为筛选标准,差异表达基因或基因片段为 157 个,其中表达上调的基因 86 个,表达下调的基因 71 个;部分上调基因结果见表 1。各基因的杂交信号强度分布见图 2,图 2 中每一个数据点代表芯片上一个基因点的杂交信号,其中黑色数据点代表非差异表达基因,红色点为替米沙坦干预后表达上调的基因,绿色点为替米沙坦干预后表达下调的基因。

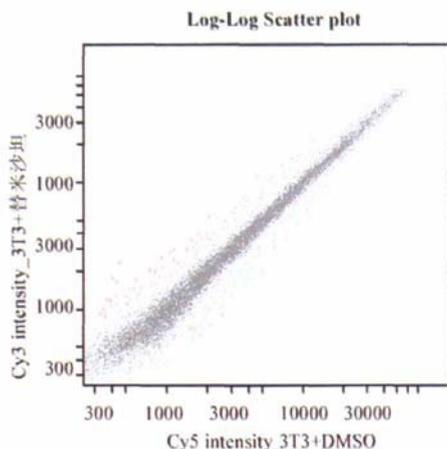


图 2 表达谱芯片杂交信号强度双对数散点图

2.3 途径分析 通过比对 KEGG 和 BioCarta 数据库进行差异基因的途径分析表明,替米沙坦作用于脂肪细胞的可能相关途径列于表 2 中。其中,受影响最大的是促丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号途径,包括细胞-细胞受体相互作用、细胞黏附分子、脂肪细胞因子信号途径、氧化应激等与脂肪细胞分泌有关的途径均受到影响。替米沙坦还可能作用于脂肪细胞增殖、分化与成脂过程相关途径如 Wnt 信号途径、 β -catenin 相关途径以及 Notch 信号途径等。

2.4 实时荧光定量 PCR 结果 用实时荧光定量 PCR 抽检部分差异表达基因,结果显示,虽然表达上调或下调的倍数存在差异,但芯片结果与实时定量 PCR 结果在上调或下调的趋势上基本一致,证实了芯片杂交结果的可靠性(表 3)。

3 讨论

基因表达谱芯片作为高通量的基因表达检测方法在药物作用的研究中已经比较常用,具有高通量、高灵敏度等特点,而利用以 KEGG 和 BioCarta 数据库为来源的途径分析可以协助发现差异表达基因所

表 1 表达谱芯片筛选出的部分上调的差异表达基因

基因符号 1	比值 Cy3/Cy5	Ensembl 基因号	Ensembl 描述
Olfir663	30.5310	ENSMUSG00000060136	Olfactory receptor GA_x6K02T2PBJ9-7331927-7332961
Pga5	28.5911	ENSMUSG00000024738	pepsinogen F
Insl5	20.6587	ENSMUSG00000059100,	Insulin-like peptide INSL5 precursor
Edg6	11.6601	ENSMUSG00000044199	Sphingosine 1-phosphate receptor Edg-6
Neurod2	10.4880	ENSMUSG00000038255	Neurogenic differentiation factor 2 (NeuroD2)
Pace4	10.4019	ENSMUSG00000030513	PACE4A (Fragment)
Cd200r3	9.6117	ENSMUSG00000036172	CD200 cell surface glycoprotein receptor 3
Rpl41	9.5102	ENSMUSG00000060143	60S ribosomal protein L41 (HG12)
Trim10	7.6748	ENSMUSG00000052980	Tripartite motif protein 10 (RING finger protein 9)
Crhbp	7.6237	ENSMUSG00000021680	Corticotropin-releasing factor binding protein precursor
Olfir1031	5.7936	ENSMUSG00000043267	Olfactory receptor
Dlgh2	4.6873	ENSMUSG00000052572	chapsyn-110; discs large homolog 2
Pola1	3.2797	ENSMUSG00000006678	DNA polymerase alpha catalytic subunit (EC 2.7.7.7)
Fhl3	3.0460	ENSMUSG00000032643	Skeletal muscle LIM-protein 2 (SLIM 2)
HPT_MOUSE	2.8617	ENSMUSG00000031722	Haptoglobin precursor
Lcn2	2.7638	ENSMUSG00000026822	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin precursor
Chi3l1	2.7382	ENSMUSG00000064246	Chitinase-3 like protein 1 precursor
Il1rap	2.5659	ENSMUSG00000022514	Interleukin-1 receptor accessory protein precursor
Sdcbp2	2.4970	ENSMUSG00000027456	Syntenin 2 (Syndecan binding protein 2)
Ube2j1	2.1624	ENSMUSG00000028277	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1
Saa1	2.0955	ENSMUSG00000061933	Serum amyloid A-1 protein precursor

Cy3: 替米沙坦; Cy5: 对照

表2 差异表达基因比照 KEGG 和 BioCarta 数据库获得的信号途径

途径名称	基因	P 值	Q 值	数据库	细胞过程
MAPK signaling pathway	9	0.00002	0.0	KEGG	Adipocytokines and proinflammatory factors
Cytokine-cytokine R interaction	8	0.00036	0.0	KEGG	Adipocytokines and proinflammatory factors
Cell adhesion molecules	6	0.000644	0.0	KEGG	Adipocytokines and proinflammatory factors
Adipocytokine signaling pathway	4	0.001457	0.0	KEGG	Adipocytokines and proinflammatory factors
Oxidative Stress Induced Gene Express	2	0.004883	0.0	BioCarta	Adipocytokines and proinflammatory factors
Wnt signaling pathway	3	0.079305	0.0	KEGG	Differentiation and adiposity
Cell Cycle	3	0.039241	0.0	KEGG	Proliferation
Accumulation of β -catenin by AKT	2	0.011337	0.0	BioCarta	Differentiation and adiposity
Notch signaling pathway	2	0.041728	0.0	KEGG	Differentiation and adiposity

表3 实时荧光定量 PCR 与芯片结果的比较

基因符号	Ensembl 基因号	替米沙坦/对照	
		R1	R2
Nos3	ENSMUSG00000028978	2.4746	2.36*
CPT1 α	ENSMUSG00000024900	2.0955	3.55*
Fos	ENSMUSG00000021250	2.6511	2.28*
Prkcc	ENSMUSG00000053272	0.4010	0.32*
Fgf22	ENSMUSG00000020327	1.9667	3.84*

注:R1,在芯片结果中与对照相比;R2,在实时 PCR 中与对照相比(* $P < 0.05$, * $P < 0.01$)

影响的生物学通路。KEGG 和 BioCarta 数据库涵盖了目前所发现的大多数细胞信号和基因调控的通路。本实验应用晶芯[®]小鼠全基因组寡核苷酸微阵列芯片(CapitalBio, China),对小鼠来源经过诱导的 3T3-L1 前脂肪细胞进行替米沙坦干预下的全基因组表达的筛查。筛查共发现 157 个差异表达基因,通过比对 KEGG 和 BioCarta 数据库进行差异基因的途径分析,这些基因涉及多个信号转导途径以及细胞脂质和能量代谢、细胞分泌等多个过程。提示替米沙坦可能对成熟脂肪细胞发挥直接影响。实验中笔者还利用实时荧光定量 PCR 对芯片筛选的部分差异表达基因进行了验证,结果证实了芯片杂交结果的可靠性。

根据以往的研究,ARBs 具有对于肥胖和糖尿病降压作用以外的影响,这种影响是在一系列的临床观察和动物实验中获得的。笔者既往的研究已经证实^[5],在动物实验中应用较大剂量坎地沙坦(candesartan)进行药物干预,在摄食量无显著变化的情况下,动物体重和体内附睾脂肪、肾周脂肪量明显较对照组减少。进一步观察附睾脂肪显示脂肪细胞缩

小,细胞构成增加,而单位质量组织甘油三酯含量和总细胞数量无变化,说明 ARBs 对于内脏脂肪具有一定的作用。对替米沙坦和缬沙坦(valsartan)的研究也得到了类似的结果^[6]。在临床研究中,替米沙坦也被证明可以减少代谢综合征患者体重和脂肪组织的量^[7]。ARBs 的这些降压外效应的机制尚不清楚。笔者利用高通量的表达谱芯片对替米沙坦干预下的 3T3-L1 成熟脂肪细胞在 mRNA 水平进行全基因组的表达分析,发现的 157 个差异表达基因,其中一部分基因参与到 Wnt/ β -catenin 信号途径、Notch 信号途径等(表 2)与脂肪细胞增殖、分化、成脂密切相关的信号途径中。其中,Wnt 信号途径和 β -catenin 相关途径实际上是整合的信号途径,称为 Wnt/ β -catenin 信号途径,Wnt/ β -catenin 信号途径在脂肪细胞的脂肪生成中起关键作用,其激活可以抑制脂肪细胞的分化^[8]。另外,差异表达基因中还包括一些与能量物质代谢有关的基因如 Nos3(内皮型一氧化氮合酶基因)、CPT1 α (脂酰肉碱脂酰转移酶 1 基因)等(表 3),这些基因表达产物在脂解以及氧化磷酸化过程中发挥关键的调节作用。研究表

明^[9], Nos3 表达上调导致的 NO 增加, 可以触发线粒体的生物合成, 促进能量物质在线粒体代谢, 并调节脂肪细胞的脂解作用; 而 CPT-1 α 的表达产物是脂肪酸 β 氧化的限速酶, 参与线粒体能量代谢。替米沙坦可能通过增强上述基因的表达诱导脂解、增强线粒体氧化磷酸化, 产生对肥胖个体脂质代谢的有益影响。

脂肪组织作为机体能量储存的重要场所, 在机体能量平衡和血糖稳态也有重要的调节作用。这主要是脂肪细胞通过分泌脂肪因子调节其他组织器官。在本研究结果中发现, 替米沙坦干预下的部分差异表达基因参与了脂肪因子的分泌以及脂肪因子作用的调节。其中 MAPK 途径(表 2)与脂肪细胞分泌尤其是促炎因子的分泌有重要的联系, 也可能参与脂肪细胞增殖分化的过程^[10], 提示替米沙坦可能通过 MAPK 途径而发挥对脂肪细胞以及脂肪细胞炎症因子分泌的调节作用。近年来, 2 型糖尿病的炎症基础越来越受到重视, 很多研究提示慢性炎症是包括肥胖和 2 型糖尿病等代谢性疾病的重要病理状态, 与疾病的发生发展及靶器官的损害有密切的联系。脂肪组织是某些促炎因子如 IL-1、IL-6、TNF- α 等的重要来源, 而促炎因子引起的胰岛素抵抗是引起 2 型糖尿病的一个重要因素。近期几项大型的临床研究提示, ARBs 可以减少新发 2 型糖尿病^[1], 笔者的芯片研究结果所提示的 ARBs 通过 MAPK 途径调节脂肪细胞炎症因子分泌可能起到一定的作用。另外, 筛选的差异表达基因中某些炎症因子前体的基因表达也发生变化, 如 Saa1(编码血浆淀粉样蛋白 A1 前体)、Saa3(编码血浆淀粉样蛋白 A3 前体)、HPT(编码触珠蛋白)等。这些炎症因子在糖尿病的发生发展中可能存在一定的作用。

脂肪组织存在自身的肾素-血管紧张素系统, 可能是 ARB 药物作用的重要靶点。笔者的研究利用高通量的表达谱芯片研究 ARB 药物替米沙坦对成熟脂肪细胞的影响, 为深入研究 ARBs 作用于脂肪细胞的机制提供线索, 对涉及更多代谢途径的基因表达谱分析工作正在进行。

参考文献

- [1] Abuissa H, Jones PG, Marso SP, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention for type 2 diabetes. A meta-analysis of randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46: 821-826.
- [2] Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, 2006, 444: 847-853.
- [3] Fujimoto M, Masuzaki H, Tanaka T, et al. An angiotensin II AT₁ receptor antagonist, telmisartan augments glucose uptake and GLUT4 protein expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS-Lett*, 2004, 576: 492-497.
- [4] Yang YH, Sandrine D, Percy LS, et al. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: e15.
- [5] 窦京涛, Zorad S, Juan MS. 血管紧张素 II 受体拮抗剂减低大鼠体内脂肪. *军医进修学院学报*, 2006, 27: 4-6.
- [6] Mori Y, Itoh Y, Tajima N. Angiotensin II receptor blockers downsize adipocytes in spontaneously type 2 diabetic rats with visceral fat obesity. *Am J Hypertens*, 2007, 20: 431-436.
- [7] Shimabukuro M, Tanaka H, Shmabukuro T. Effects of telmisartan on fat distribution in individuals with the metabolic syndrome. *J Hypertens*, 2007, 25: 841-848.
- [8] Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signaling during adipogenesis. *Biochem J*, 2003, 376: 607-613.
- [9] Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, et al. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*, 2003, 299: 896-899.
- [10] Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, 1995, 9: 726-735.