

C2C12细胞诱导分化为脂肪细胞的转录组分析

田洪伟^{1,2} 美荣^{1,2} 李玉玲^{1,2} 乌云达来^{1,2*}

(¹内蒙古师范大学生命科学与技术学院, 呼和浩特 010022;

²内蒙古自治区高等学校生物多样性保护与可持续利用重点实验室, 呼和浩特 010022)

摘要 为了探究C2C12细胞转分化为脂肪细胞的关键基因, 实验采用添加IBMX、地塞米松、胰岛素和罗格列酮的培养基诱导C2C12细胞6天。通过油红O染色和免疫荧光染色方法鉴定诱导前后细胞的分化情况, 利用转录组分析与实时荧光定量PCR技术评估差异表达基因的表达水平; 借助蛋白质免疫印迹实验测定蛋白水平; 运用酶联免疫吸附测定实验分析细胞状态。结果显示, 诱导6天后C2C12细胞经油红O染色可见大量脂滴, 免疫荧光染色则检测到FABP4阳性信号。基因本体(GO)分析与京都基因组百科全书(KEGG)通路分析发现, 病毒响应和免疫系统通路相关基因表达水平显著上调。进一步筛选出核心(Hub)基因*Isg15*、*Ddx58*、*Ifit3*、*Irgm2*、*Eif2ak2*、*Irf9*和*Stat1*。实时荧光定量PCR验证了*Isg15*、*Fabp4*和*C/EBPα*的表达上调, 免疫印迹实验证实了FABP4、IL-6蛋白水平增加。上调表达的*Ddx58*、*Ifit3*、*Irgm2*、*Eif2ak2*、*Irf9*和*Stat1*基因参与炎症反应, 以维持细胞存活。综上所述, 该研究揭示了肌细胞向脂肪细胞转化的部分分子机制, 为进一步理解肌源性脂肪生成提供了依据。

关键词 C2C12细胞; 转录组; 脂肪; ISG15

Transcriptome Analysis of C2C12 Cells Induced to Differentiate into Adipocytes

TIAN Hongwei^{1,2}, Meirong^{1,2}, LI Yuling^{1,2}, Wuyundalai^{1,2*}

(¹College of Life Science and Technology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022, China;

²Key Laboratory of Biodiversity Conservation and Sustainable Utilization in Mongolian Plateau for College and University of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010022, China)

Abstract To explore the key genes in the transdifferentiation of C2C12 cells into adipocytes, the medium supplemented with IBMX, dexamethasone, insulin and rosiglitazone was used to induce C2C12 cells for six days. The differentiation of cells before and after induction was identified by oil red O staining and immunofluorescence staining. Transcriptome analysis and RT-qPCR (real-time fluorescence quantitative PCR) techniques were used to evaluate the expression levels of differentially expressed genes; Western blot was employed to measure the protein levels; and ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) was applied to analyze the cell state. The results showed that after six days of induction, a large number of lipid droplets appeared after oil red O staining of C2C12 cells, and a positive signal of FABP4 was detected by immunofluorescence staining. GO (Gene Ontology) analysis

收稿日期: 2024-11-20

接受日期: 2025-01-24

内蒙古自治区高等学校青年科技英才支持计划(批准号: NJYT23089)、内蒙古自治区自然科学基金(批准号: 2023LHMS03047)、内蒙古自治区高等学校科学技术研究重点项目(批准号: NJZZ23026)和内蒙古自治区人力资源和社会保障厅2020年度留学人员创新启动支持计划(批准号: 2020-29)资助的课题

*通信作者。Tel: 0471-4392448, E-mail: wuyundalai@imnu.edu.cn

Received: November 20, 2024

Accepted: January 24, 2025

This work was supported by the Plan for Young Talents of Science and Technology in Universities of Inner Mongolia Autonomous Region (Grant No.NJYT23089), the Natural Science Foundation of Inner Mongolia (Grant No.2023LHMS03047), the Research Program of Science and Technology at Universities of Inner Mongolia Autonomous Region (Grant No.NJZZ23026) and the Inner Mongolia Autonomous Region Department of Human Resources and Social Security 2020 Innovation Launch Support Plan for Overseas Students (Grant No.2020-29)

*Corresponding author. Tel: +86-471-4392448, E-mail: wuyundalai@imnu.edu.cn

and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway analysis revealed that the expression levels of genes related to viral response and immune system pathways were significantly upregulated. The Hub genes *Isg15*, *Ddx58*, *Ifit3*, *Irgm2*, *Eif2ak2*, *Irf9* and *Stat1* were further screened. RT-qPCR verified the up-regulated expression of *Isg15*, *Fabp4* and *C/EBPα* expression, and immunoblot confirmed the increase of FABP4 and IL-6 protein levels. Upregulated expression of *Ddx58*, *Ifit3*, *Irgm2*, *Eif2ak2*, *Irf9*, and *Stat1* genes were involved in the inflammatory response to maintain cell survival. Taken together, this study revealed part of the molecular mechanism of myocyte-to-adipocyte transformation, providing a basis for further understanding of myogenic adipogenesis.

Keywords C2C12 cells; transcriptome; fat; ISG15

肌肉脂肪浸润(muscle fat infiltration, MFI), 又称肌脂肪变性, 是指骨骼肌中出现的脂质沉积现象^[1]。在普通人群中, MFI与脂肪细胞的迁移与增殖、肌细胞转分化、肥胖症、胰岛素抵抗和炎症等相关, 且其在肥胖、2型糖尿病、肌肉减少症等代谢和肌肉异常的易感个体中尤为常见^[2]。1994年, GOUTALLIER等^[3]首次提出了肩袖撕裂后肌内脂肪浸润的概念, 此后的研究指出, 肩袖损伤后, 成肌细胞、肌腱干细胞参与了脂肪细胞的形成^[4]。

MFI依据病因可分为生理性与病理性肌肉脂肪浸润^[5-6]。前者可能关联增龄和运动不足, 后者则与神经损伤、肌肉疾病、内分泌异常及药物副作用相关^[7]。MFI发生时, 除原有脂肪细胞外, 其他细胞如成脂成纤维祖细胞(fibro/adipogenic progenitors, FAP)和肌肉干细胞, 在特定微环境与信号刺激下, 基因表达改变并转化为脂肪细胞, 积累成脂肪^[8]。尽管研究不断深入, 但其分子机制仍不明晰。探究肌肉细胞内脂质积累的机制对人类健康意义重大, 因它不仅揭示了疾病发生的潜在路径, 也为预防和治疗提供了新的视角, 有助于提升人们的生活质量, 特别是在老龄化社会背景下更具价值。

C2C12细胞源自小鼠骨骼肌细胞, 一直被用作研究肌肉发育的模型, 后来被发现可以诱导生脂^[9]。C2C12细胞经诱导后, 能够表达脂肪细胞特异性基因及其编码的蛋白, 如脂肪酸结合蛋白(fatty acid binding protein, FABP)^[10-11]、脂肪酸转运蛋白(fatty acid transporter, FATP)^[12]。已有研究发现, C2C12细胞在蓄积脂肪的过程中影响了细胞的正常代谢^[13], 该过程伴随细胞炎症^[14]、胰岛素抵抗等疾病的发生^[15]。然而, 目前对于成肌细胞积累脂质或转分化为脂肪细胞过程中的细胞起源以及转录组学变化, 人们尚不清楚。

本研究以C2C12小鼠成肌细胞为研究材料, 用

特定培养基进行诱导。经染色鉴定发现诱导后细胞呈现脂肪细胞特征, 进一步筛选出核心基因, 验证基因与蛋白表达水平, 并分析细胞状态, 旨在探讨C2C12细胞转分化为脂肪细胞过程中的关键基因及其功能, 为以后更好地揭示肌细胞生脂机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 C2C12细胞培养及诱导分化

使用细胞培养瓶将C2C12细胞(海星生物科技有限公司)培养在含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(海星生物科技有限公司)、1%青霉素-链霉素(Gibco公司)的DMEM高糖培养基(Gibco公司)中, 于37 °C、5% CO₂恒温培养箱中培养。待细胞达到90%融合度时, 用胰蛋白酶(Gibco公司)于37 °C消化细胞2 min, 加入5 mL培养基终止消化, 使用离心机沉淀细胞(4 °C、1 000 r/min、5 min), 加入DMEM重悬细胞, 使用细胞计数板计数, 将细胞接种于9 cm细胞培养皿中, 接种密度为6×10⁴个/cm²。

接种后的C2C12细胞使用DMEM培养基(含10% FBS、1%青霉素-链霉素)培养, 分为两组, 对照组(CK)与诱导组(T), 每组设置3个重复, 于37 °C、5% CO₂恒温培养箱中培养。CK组细胞培养至融合度达到90%时, 收集细胞。T组细胞待融合度达到70%时, 开始诱导分化, 使用含有10% FBS的F12培养基培养, 开始时添加胰岛素(Coolaber公司, 850 nmol)、地塞米松(MCE公司, 1 μmol)、IBMX(0.5 mmol)和罗格列酮(MCE公司, 1 μmol)持续培养2天, 而后只添加胰岛素(850 nmol)和罗格列酮(1 μmol)继续培养2天, 最后更换为普通培养基培养2天, 收集细胞用于免疫荧光染色、油红O染色、转录组测序(RNA sequencing, RNA-seq)分析、实时荧光定量PCR、免疫印迹杂交。

1.2 油红O染色

取CK组细胞及诱导6天后的T组细胞, 弃掉培养基后, 使用磷酸缓冲盐(phosphate buffer saline, PBS)洗涤3次, 每次5 min。然后用4%多聚甲醛于37 °C固定15 min, 用PBS漂洗3次, 最后使用油红O染色液(Solarbio公司)染色35 min(37 °C细胞培养箱内放置)。染色后使用60%的异丙醇溶液迅速洗涤, 再用PBS洗涤3次, 倒置荧光显微镜下拍照观察。

1.3 免疫荧光染色

制作CK组细胞及诱导6天后T组细胞的细胞爬片, PBS洗涤后使用4%的多聚甲醛溶液室温固定15 min, PBS漂洗3次后再用TritonX-100(0.2%)通透细胞, 使用5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)溶液室温封闭1 h。兔抗小鼠多克隆FABP4抗体(MCE公司)作一抗(1:500), 在4 °C条件下孵育细胞过夜; 次日使用对应的二抗(山羊抗兔IgG重链和轻链)(1:1 000)室温避光孵育2 h, 最后用4,6-二脒基-2-苯基吲哚(4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, DAPI)溶液室温染色15 min, 观察并采集图片。

1.4 转录组测序及差异表达基因(differential expressed genes, DEGs)数据分析

收集CK组细胞及诱导6天后的T组细胞, 使用细胞计数板计数, 每组中单个重复的细胞数量均超过 1×10^6 个, 提取RNA, 送上海美吉生物医药科技有限公司做转录组分析。使用TRIzol试剂(ThermoFisher Scientific公司)进行RNA提取; 运用RNA Purification Kit(上海美吉生物医药科技有限公司)进行核酸纯化; 采用Biowest Agarose(Biowest公司)进行琼脂糖凝胶检测; 利用Illumina® Stranded mRNA Prep, Ligation试剂(Illumina公司)进行文库构建; 使用NovaSeq Reagent Kit NovaSeqX Plus(Illumina公司)进行上机测序。

使用美吉生物医学有参转录组云分析(V2.2, <https://www.majorbio.com/>)进行基因表达分析, 分析T组与CK组中基因的差异表达情况, 筛选DEGs。随后, 利用基因本体(Gene Ontology, GO)分析和京都基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes, KEGG)分析确定富集的主要生物学功能和信号通路。

1.5 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络搭建及模块分析

为了进一步探讨DEGs之间的相互作用, 我们使用美吉生物医学有参转录组云分析(V2.2)获取PPI数

据后, 使用Cytoscape(V3.10.2)软件(<https://cytoscape.org/>)绘制PPI网络。另外, 使用Cytoscape插件Cytoscape MCODE筛选关键功能基因模块, 节点最小连接度设置为2, 节点得分阈值设置为0.2, 节点核心度设置为2。

1.6 Hub基因的筛选

使用Cytoscape软件筛选Hub基因, 本研究选择6种算法(MCC、DMNC、MNC、Degree、EPC、BottleNeck), 各自获取排名前30位的基因, 它们取交集后得到具有高度连接性的关键基因。

1.7 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)

提取CK组细胞及诱导6天后T组细胞的RNA后进行荧光定量, 采用TaKaRa Mini BEST Universal RNA Extraction Kit试剂盒从细胞中提取总RNA, 通过 D_{260}/D_{280} 值检测RNA纯度。使用反转录试剂盒[翌圣生物科技(上海)股份有限公司]将mRNA逆转录成cDNA。RT-qPCR反应使用Hieff UNICON® Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix试剂[翌圣生物科技(上海)股份有限公司], 在荧光定量PCR专用八连管中进行, 每个样本有3个重复, 以Gapdh基因作为内参。20 μL反应体系: 10 μL TB Green、1 μL cDNA、0.4 μL上游引物(10 μmol/L)、0.4 μL下游引物(10 μmol/L), 补ddH₂O至20 μL。反应混合物在CFX Opus 96中进行扩增, 95 °C预变性10 min; 95 °C变性10 s, 55 °C退火35 s, 72 °C延伸60 s, 40个循环。用于实时荧光定量PCR的引物序列如表1所示。

1.8 免疫印迹杂交(Western blot, WB)

分别收集CK组细胞及诱导6天后T组细胞, 使用蛋白裂解液提取细胞内总蛋白。电泳分离后转膜, 转膜后使用BSA-V溶液(2%)室温封闭1.5 h, 使用兔抗小鼠多克隆FABP4抗体(Immunoway公司)(1:1 000)、兔抗小鼠多克隆ISG15抗体(Immunoway公司)(1:1 000)、兔抗小鼠多克隆IL-6抗体(苏州博特龙免疫技术有限公司)(1:1500)、β-actin单克隆抗体(Proteintech公司)溶液(1:20 000)在4 °C条件下孵育过夜; 然后用含吐温20的Tris缓冲液洗涤; 再用各自对应二抗山羊抗兔IgG(H+L)抗体(Bio-Rad公司)(1:5 000)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)抗体(Immunoway公司)溶液(1:5 000)室温孵育1 h, 用Bio-Rad ChemiDoc XRS+化学发光凝胶成像系统拍照分析。

1.9 酶联免疫吸附试验(ELISA)

使用小鼠白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)

表1 实时荧光定量PCR的引物序列

Table 1 Primer sequences for real-time fluorescence quantitative PCR

引物名	引物序列(5'→3')
Primer name	Primer sequence (5'→3')
Irf3-F	CAC CCT GCC CGA TCC TGA G
Irf3-R	CAC AGT GCC AGC CCA TTG C
Isg15-F	TCC TGG TGT CCG TGA CTA ACT C
Isg15-R	AAG ACC GTC CTG GAG CAC TG
C/EBP α -F	TCG GTG GAC AAG AAC AGC AAC G
C/EBP α -R	CGG TCA TTG TCA CTG GTC AAC TCC
Fabp4-F	AAA TCA CCG CAG ACG ACA GGA AG
Fabp4-R	CAC CAC CAG CTT GTC ACC ATC TC
Ppar γ -F	GCC AAG GTG CTC CAG AAG ATG AC
Ppar γ -R	GTG AAG GCT CAT GTC TGT CTC TGT C
Gapdh-F	CCC AGA AGA CTG TGG ATG G
Gapdh-R	ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA

ELISA检验试剂盒(江苏酶标生物科技有限公司), 严格按照试剂盒说明书操作, 将CK组与T组分别设置3个生物学重复, 每个生物学重复均进行3次技术重复, 所得结果使用Spectra Max Id5微孔板检测系统读数。

1.10 数据统计分析

转录组分析基于表达量定量结果。进行组间差异基因分析, 获得两组间发生差异表达的基因, 差异分析软件为DESeq2, 筛选阈值为 $|\log_2FC| \geq 1$ 且校正P值 <0.05 。

使用Goatools软件(<https://github.com/tanghaibao/goatools>)进行GO富集分析, 使用方法为Fisher精确检验。为控制计算的假阳性率使用4种多重检验方法(Bonferroni、Holm、Sidak和false discovery rate)对P值进行校正。使用Pythonscipy软件包(<https://github.com/scipy/scipy>)进行KEGG通路富集分析, 使用Fisher精确检验进行计算。为控制计算假阳性率, 采用BH方法进行多重检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

使用GraphPad Prism 10软件(<https://www.graphpad.com/>)进行转录组外数据的统计分析, 采用单因素方差分析对各组间数据进行统计学检验, 两组间比较采用t检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

WB结果使用Image Lab(Bio-Rad公司)软件检测各泳道目的蛋白的灰度值, 使用GraphPad Prism 10软件进行t检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 C2C12细胞诱导分化及鉴定

使用诱导液诱导C2C12细胞, 在诱导液的作用下, C2C12细胞形态趋向圆润, 增殖速度放缓, 出现油状分泌物, 部分细胞发生凋亡(图1A), 说明细胞处于分化状态, 分裂能力逐渐降低, 油状分泌物的出现表明细胞具备脂肪合成能力, 部分细胞凋亡可能是细胞的正常死亡或诱导液对细胞的刺激导致的。油红O染色后可见细胞内出现脂滴(图1B); 免疫荧光染色后可见T组细胞大量表达脂肪特异蛋白FABP4(图1C)。

2.2 转录组测序

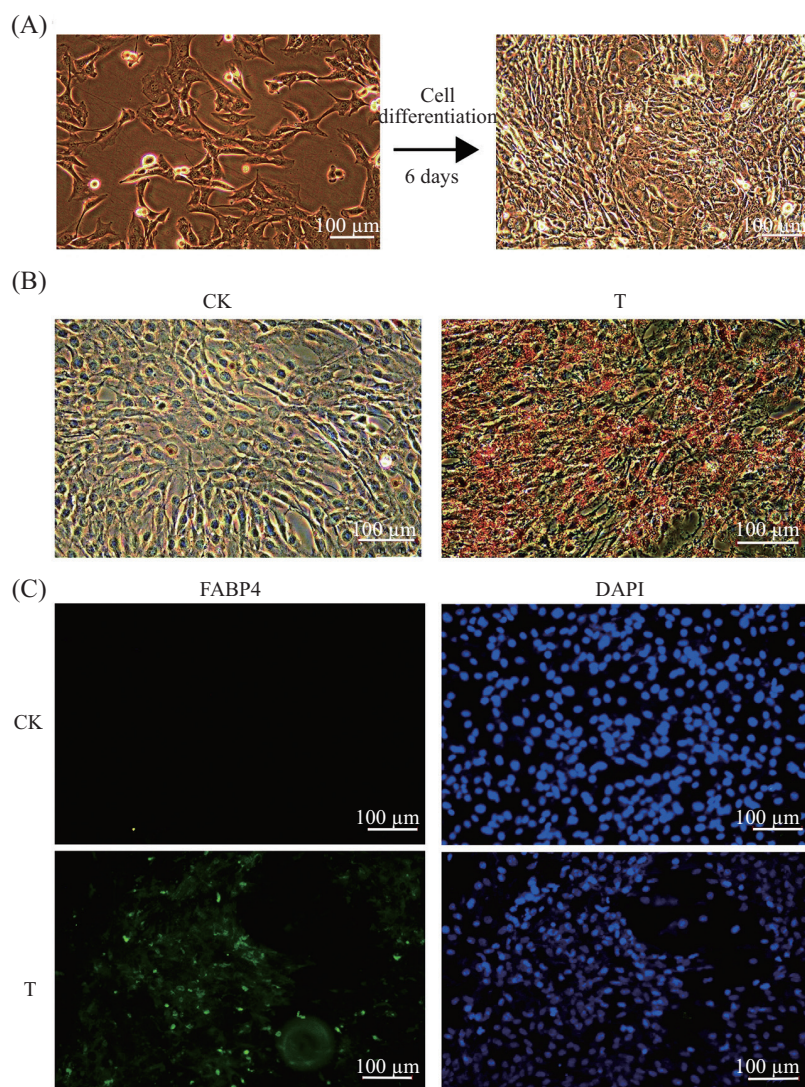
测序数据统计: 完成6个样品的转录组测序, 共获得40.17 Gb规整数据, 各样品规整数据量均达到6.04 Gb以上, Q30碱基百分比在96.14%以上。分别将各样品的规整数据与指定的参考基因组进行序列比对, 比对率从97.07%到97.64%不等。表达量分析: 本次分析共检测到26 052个基因和81 770个转录本。

2.3 DEGs分析

对C2C12细胞和诱导后的C2C12细胞的RNA-seq数据进行了差异基因表达分析, 相较于对照组, 诱导组共发现了1 168个差异基因, 其中619个上调基因、549个下调基因。对C2C12细胞T组与CK组DEGs绘制火山图(图2A), 前100位差异基因按T组与CK组基因表达量的差异倍数($\log_2FC$)大小排序(图2B)。

2.4 KEGG和GO富集分析

利用测序所得差异基因开展KEGG分析(图2C),



A: C2C12细胞诱导分化6天前照片; B: 油红O染色; C: FABP4免疫荧光染色(绿色), 细胞核DAPI染色(蓝色), 同视野下拍照。

A: C2C12 cells were induced to differentiate and photographed before and after 6 days; B: oil red O staining; C: FABP4 immunofluorescence staining (green), cell nucleus DAPI staining (blue), taken under the same field of view.

图1 C2C12细胞诱导分化后的鉴定结果

Fig.1 Identification of C2C12 cells after induced differentiation

从T组上调和下调的DEGs所富集的通路中,各挑选出10条通路,其中甲型流感(influenza A)、麻疹(measles)、冠状病毒病-COVID-19(coronavirus disease-COVID-19)、丙型肝炎(hepatitis C)等信号通路相关基因表达水平显著上调;细胞周期(cell cycle)、DNA复制(DNA replication)、同源重组(homologous recombination)、Fanconi贫血途径(Fanconi anemia pathway)等信号通路相关基因表达水平显著下调。

GO富集分析包括3个分支。在生物学过程(biological process, BP)分析中, T组中上调的DEGs主要富集在肌管分化的正调控(positive regulation of myotube differentiation)、调节白细胞介素-1的产生(regulation

of interleukin-1 production)、病毒过程的负调控(negative regulation of viral process)等生物学过程中(图3A); T组中下调的DEGs主要富集在DNA链延伸(DNA strand elongation)、四氢叶酸相互转化(tetrahydrofolate interconversion)、有丝分裂染色体凝聚(mitotic chromosome condensation)等生物学过程中(图3B)。

在细胞组分(cellular component, CC)分析中, T组中上调的DEGs主要富集在细胞表面(cell surface)、细胞外空间(extracellular space)、细胞质(cytoplasm)等细胞结构中(图3C); T组中下调的DEGs主要富集在凝聚素络合物(condensin complex)、外着丝粒(outer kinetochore)、复制分叉(replication fork)等细

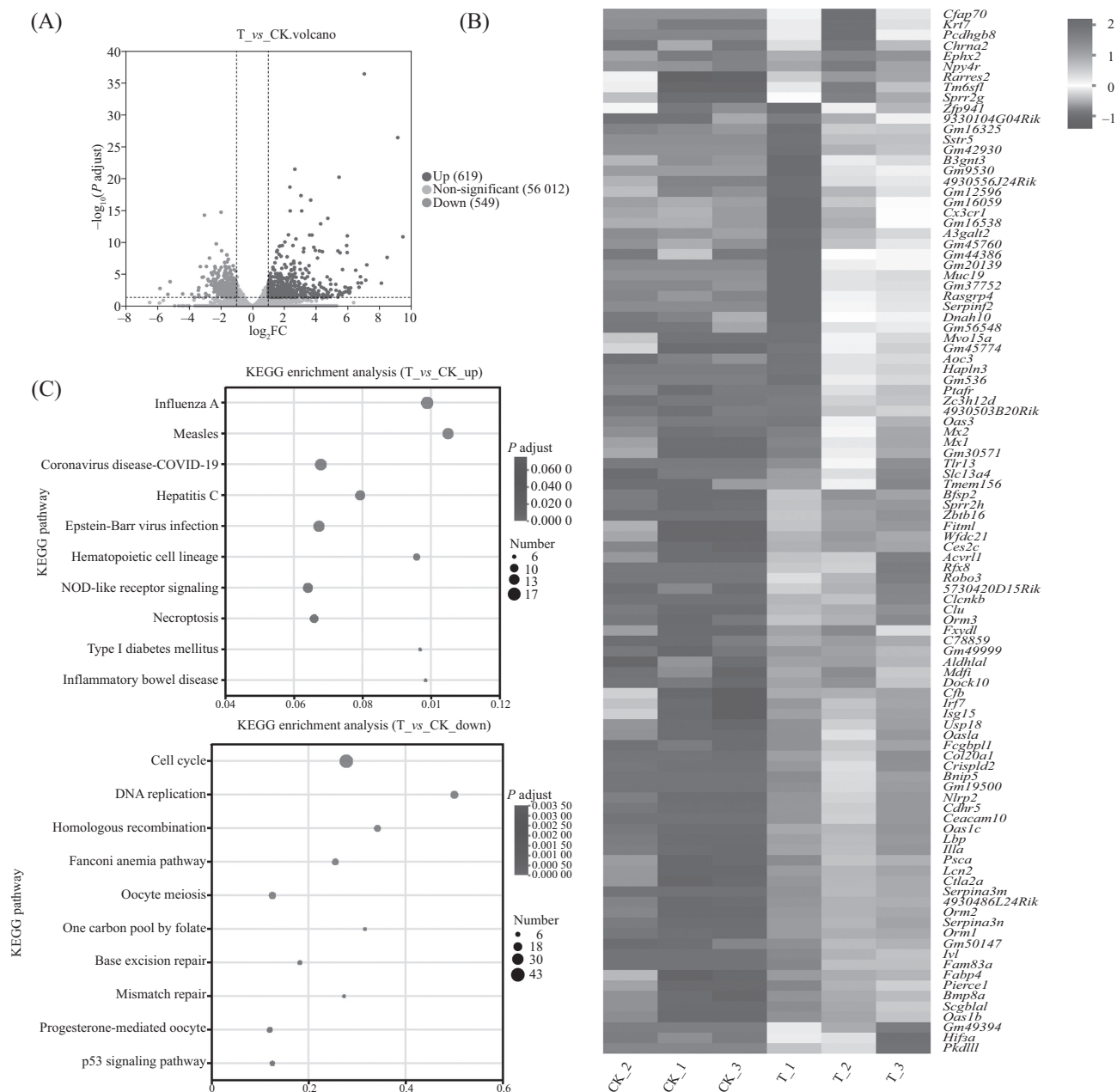
胞结构中(图3D)。

在分子功能(molecular function, MF)分析中, T组中上调的DEGs主要富集在双链RNA结合(double-stranded RNA binding)、生长因子活性(growth factor activity)、分子功能调节活性(molecular function regulator activity)等分子功能中(图3E); T组中下调

的DEGs主要富集在单链DNA解旋酶活性(single-stranded DNA helicase activity)、DNA复制起点结合(DNA replication origin binding)、微管运动活动(microtubule motor activity)等分子功能中(图3F)。

2.5 PPI网络构建和模块分析

分别筛选校正 $P < 0.05$ 的上调和下调DEGs, 利

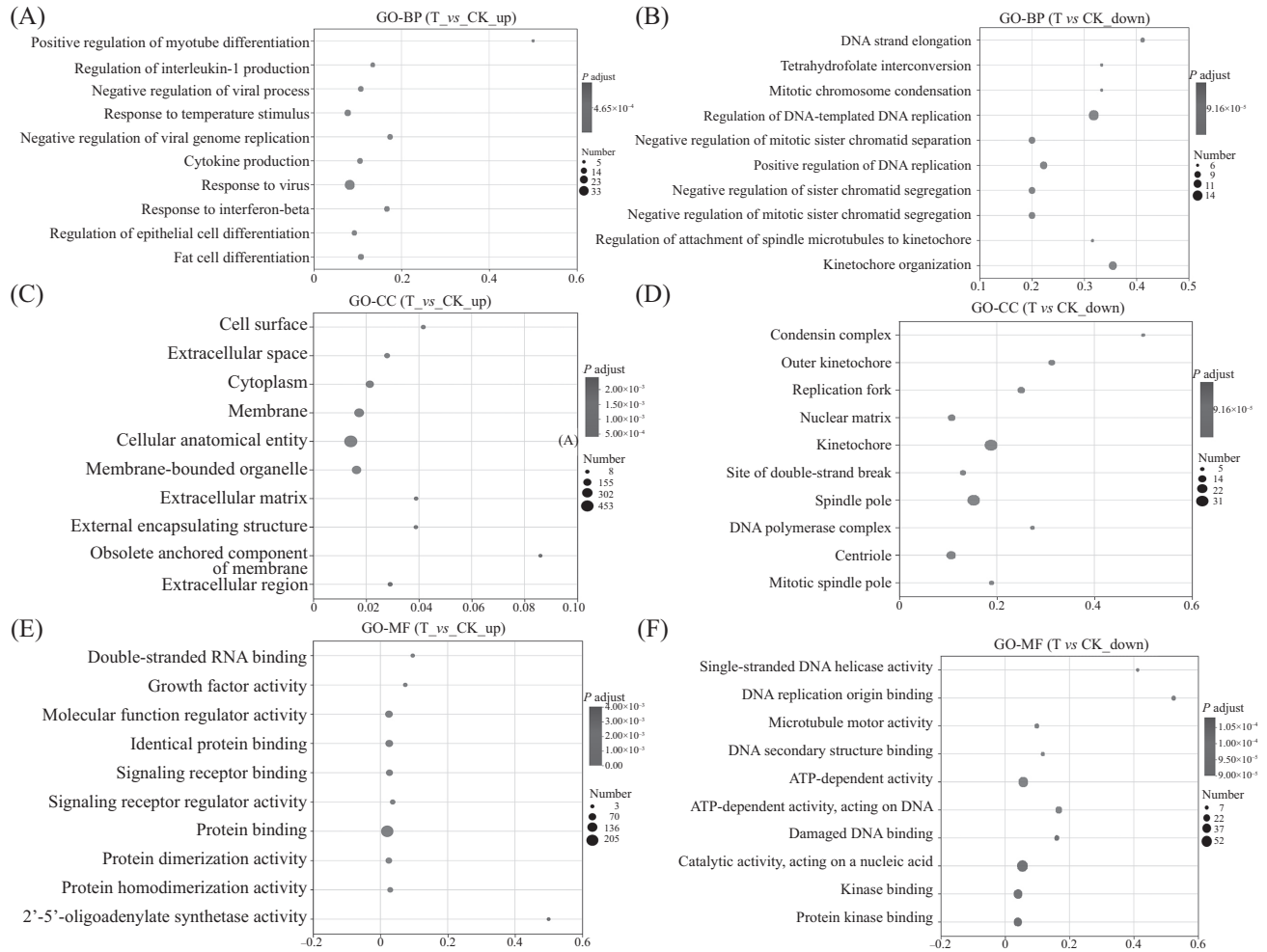


A: T组与CK组C2C12细胞间DEGs的火山图, 红色代表上调, 蓝色代表下调; B: T组与CK组C2C12细胞中前100个DEGs的热图; C: T组与CK组C2C12细胞间DEGs的KEGG分析气泡图。

A: volcano plot of DEGs between C2C12 cells in T and CK groups, with red representing upregulation and blue representing downregulation; B: heatmap of the top 100 DEGs between C2C12 cells in T and CK groups; C: KEGG analysis of DEGs between C2C12 cells in T and CK groups, presented as bubble plots.

图2 C2C12细胞诱导前后转录组分析结果

Fig.2 Transcriptome analysis results before and after induction of C2C12 cells



A: 上调DEGs的GO-BP分析; B: 下调DEGs的GO-BP分析; C: 上调DEGs的GO-CC分析; D: 下调DEGs的GO-CC分析; E: 上调DEGs的GO-MF分析; F: 下调DEGs的GO-MF分析。

A: GO-BP analysis of upregulated DEGs; B: GO-BP analysis of downregulated DEGs; C: GO-CC analysis of upregulated DEGs; D: GO CC analysis of downregulated DEGs; E: GO-MF analysis of upregulated DEGs; F: GO-MF analysis of downregulated DEGs.

图3 气泡图展示T组与CK组C2C12细胞间DEGs的GO富集结果

Fig.3 Bubble plot of the GO enrichment results for the DEGs between C2C12 cells in T group and CK group

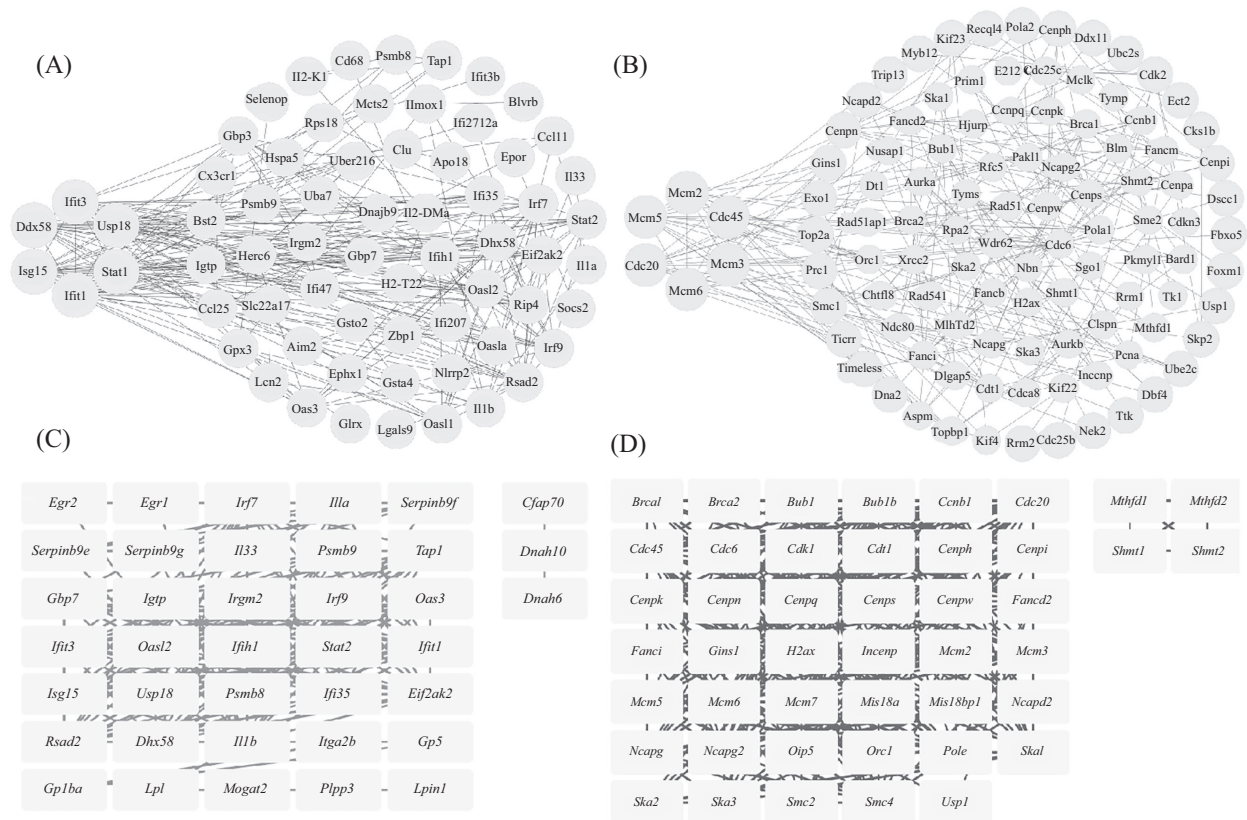
用美吉生物医学有参转录组云分析(V2.2)筛选互作蛋白, 设定综合值为0.4, 综合值排名设定为前300名, 所得结果使用Cytoscape软件筛选并作图, 得到得分较高的前6个蛋白(图4A和图4B)。使用Mcode插件筛选DEGs中的功能模块基因, 得到43个上调功能模块基因、45个下调功能模块基因(图4C和图4D)。

对上调和下调功能模块基因分别进行GO分析、KEGG分析。GO分析结果显示, 上调功能模块基因主要富集于细胞过程(cellular process)、生物调控(biological regulation)、应激反应(response to stimulus)等生物学过程中(图5A); 下调功能模块基因主要富集于细胞过程(cellular process)、细胞成分组织或生物发生(cellular component organization or biogen-

esis)、代谢过程(metabolic process)等生物学过程中(图5B)。KEGG分析结果显示, 上调功能模块基因中传染病: 病毒(infectious disease: viral)、免疫系统(immune system)、信号转导(signal transduction)等信号通路相关基因表达水平显著上调(图5C); 下调功能模块中细胞生长和死亡(cell growth and death)、复制和修复(replication and repair)、癌症(cancer: overview)等信号通路相关基因表达水平显著下调(图5D)。

2.6 Hub基因的选择与分析

通过CytoHubba插件中的6种算法, 分别计算出了在T组和CK组间的DEGs中排名前30的Hub基因(表2和表3), 取交集后, 共发现7个常见的上调基



A: 上调DEGs中Degree前6基因编码的蛋白及其互作蛋白; B: 下调DEGs中Degree前6基因编码的蛋白及其互作蛋白; C: 上调功能模块基因; D: 下调功能模块基因。

A: the protein encoded by the top 6 upregulated genes with the highest degree values and their interacting proteins; B: the protein encoded by the top 6 downregulated genes with the highest degree values and their interacting proteins; C: upregulated functional module genes; D: downregulated functional module genes.

图4 C2C12 细胞诱导前后转录组分析

Fig.4 Transcriptome analysis of C2C12 cells before and after induction

因, 分别为 *Ddx58*、*Ifit3*、*Irgm2*、*Eif2ak2*、*Isg15*、*Irf9*、*Stat1*; 以及6个常见的下调Hub基因, 即 *Mcm5*、*Cdc45*、*Mcm3*、*Mcm6*、*Cdc6*、*Pole*。

2.7 实时荧光定量PCR结果

对上调Hub基因分析, 上调Hub基因中与细胞脂肪积累最密切的基因为 *Isg15*, 以往对脂肪细胞的研究表明, *Isg15* 的表达受 *Irf3* 的调控。我们对 *Isg15* (图6A)、*Fabp4* (图6B)、*C/EBPα* (图6C)、*Irf3* (图6D)、*Pparγ* (图6E) 进行实时荧光定量PCR, *Gapdh* 为内参基因, 每个基因单独绘制标准曲线, 设置空白组检验引物水平, 斜率 (E) 反映PCR扩增效率, 理想的PCR扩增效率应满足 $0.9 < E < 1.1$ 这一范围, 相关系数 R^2 应大于 0.98。每组实验设置3个生物学重复, 每个生物学重复均进行3次技术重复。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对T组与CK组数据进行比较, 对两组结果做 *t* 检验。结果表明 *Isg15* (图6A)、*Fabp4* (图6B)、*C/EBPα* (图6C) 表达水平在两组间具有显著性差异, 表现为表达上调, 其中 *Isg15*、*Fabp4*

表达水平在两组间表现出差异极显著, *Irf3* (图6D)、*Pparγ* (图6E) 表达水平在两组间没有显著性差异。

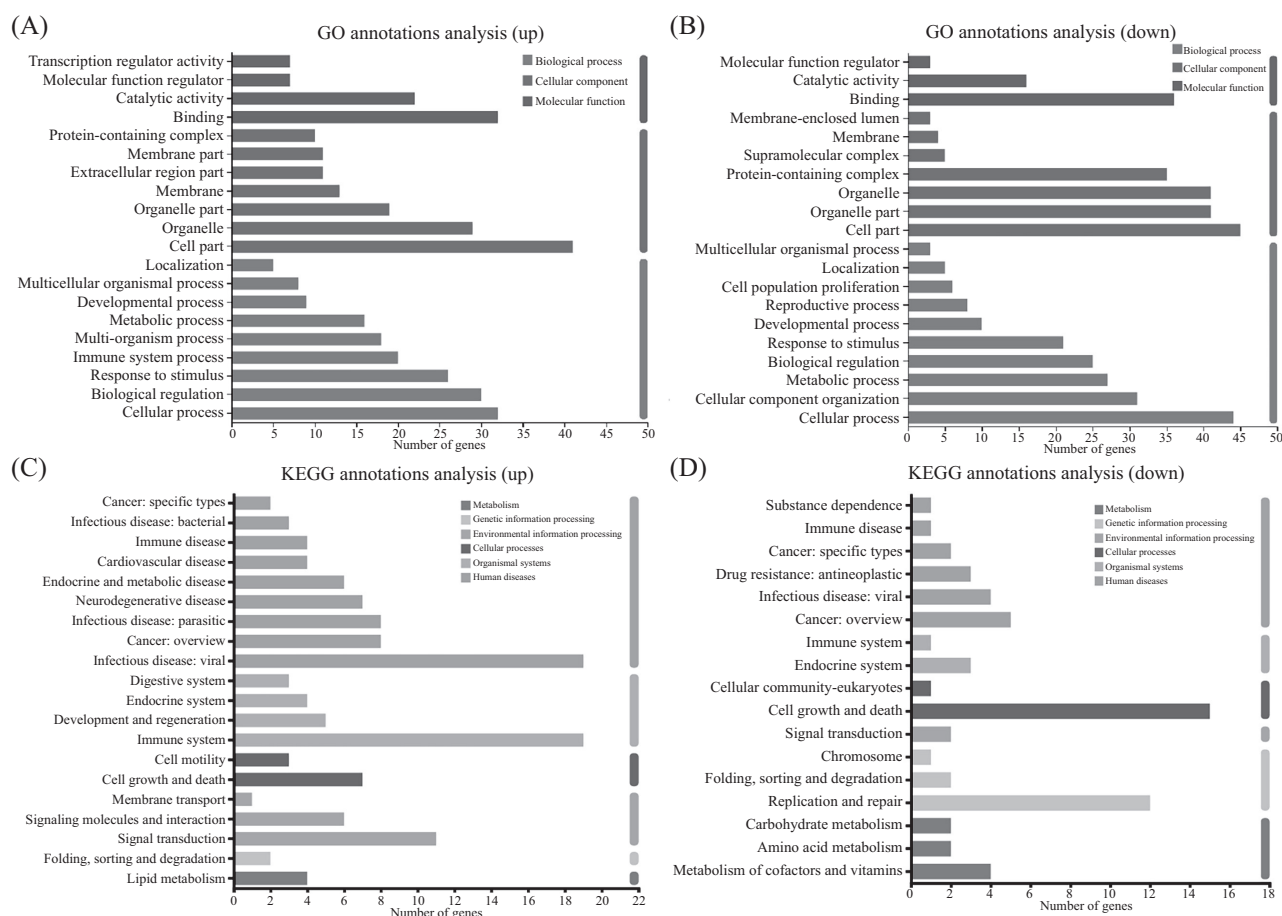
2.8 免疫印迹杂交(Western blot)结果

转录组分析结果与实时荧光定量PCR结果显示, *Isg15*、*Fabp4* 表达水平在两组间存在极显著差异, 我们对此进一步做WB实验 (图7A)。结果显示, *ISG15* 蛋白在两组细胞中均有表达且没有显著性差异 (图7B), *FABP4* 蛋白在T组细胞中表达量上调, 结果在统计学上具有极高的显著性 (图7C)。

2.9 细胞中IL-6蛋白表达结果

ELISA检测细胞培养基中IL-6蛋白含量的结果显示, 对照组细胞分泌少量IL-6蛋白, 随着诱导时间的延长, IL-6蛋白的分泌量逐渐增加 (图8A)。WB结果表明, 诱导分化6天后的T组细胞内IL-6蛋白含量显著高于CK组 (图8B)。

免疫荧光染色结果显示T组与CK组IL-6蛋白在表达量与分布位置上存在区别, CK组细胞蛋白表达



A: 上调功能模块GO分析; B: 下调功能模块GO分析; C: 上调功能模块KEGG分析; D: 下调功能模块KEGG分析。

A: GO analysis of upregulated functional modules; B: GO analysis of downregulated functional modules; C: KEGG analysis of upregulated functional modules; D: KEGG analysis of downregulated functional modules.

图5 上调及下调功能模块基因的GO分析与KEGG分析

Fig.5 GO and KEGG analyses of genes in upregulated and downregulated functional modules

量相对较低, 主要分布在细胞核周围, 细胞质基质中未出现染色情况; T组细胞中IL-6蛋白表达量相对较高, 主要分布在细胞质基质中, 与DAPI染色相对照, 发现IL-6蛋白分布出现明显的细胞核周围空缺(图8C白色箭头所示)。

3 讨论与结论

C2C12成肌细胞在特定条件下会转分化为脂肪细胞。TSUKAHARA等^[16]对C2C12小鼠细胞进行脂质积累诱导的研究表明, 油红O染色呈现阳性可作为细胞转化为脂肪细胞的标志。KHYROMOVA等^[17]的研究发现, FABP4是重要的脂肪细胞标志物。本研究图1中油红O染色与免疫荧光染色的结果表明, 脂滴积累出现, FABP4大量表达, 成肌细胞已转分化为脂肪细胞(或脂肪细胞样细胞)。

脂肪前体细胞发育为完全分化的成熟脂肪细

胞的过程, 是在大量不同转录因子家族高度协调和有序激活的作用下完成的^[18], 从成肌细胞转化为脂肪细胞的过程同样是一个复杂的过程, 在T组与CK组的对比分析中, 上调基因与下调基因的数量均极为可观, 表明该过程受大量基因协同调控, 并非少数几个基因所能左右(图2A)。本研究对上调基因与下调基因分别做了GO分析与KEGG分析, 发现了上调基因在信号通路上主要与病毒、丙型肝炎、免疫系统相关, VAN等^[19]在对高脂饮食诱导小鼠肥胖的研究中发现, 脂肪积累与炎症发生密不可分。下调基因主要与细胞分裂相关, 细胞在分化时, 会退出细胞周期, 降低分裂倾向^[20]。在此基础上本研究筛选了上调与下调基因的功能模块(图4), 并分别对功能模块基因进行了GO分析和KEGG分析(图5), 结果进一步明确上调基因主要与免疫系统、病毒、炎症相关, 下调基因主要与细胞生长和死亡、复制和修复

表2 前30位上调Hub基因
Table 2 The top 30 up-regulated Hub genes

最大团中心性 Maximal clique centrality	最大领域组件密度 Density of maximum neighborhood component	最大领域组件 Maximum neighborhood component	度中心性 Degree	边缘渗透组件 Edge percolated component	瓶颈中心性 Bottleneck
<i>Usp18</i>	<i>Stat2</i>	<i>Usp18</i>	<i>Stat1</i>	<i>Stat1</i>	<i>Stat1</i>
<i>Ifit1</i>	<i>Oasl1</i>	<i>Isg15</i>	<i>Usp18</i>	<i>Usp18</i>	<i>Il1b</i>
<i>Isg15</i>	<i>Oasl2</i>	<i>Stat1</i>	<i>Isg15</i>	<i>Isg15</i>	<i>Aim2</i>
<i>Ifit3</i>	<i>Ifit3</i>	<i>Ifit1</i>	<i>Ifit1</i>	<i>Ifit1</i>	<i>Lpl</i>
<i>Ifih1</i>	<i>Ifih1</i>	<i>Ddx58</i>	<i>Ddx58</i>	<i>Ddx58</i>	<i>Fabp4</i>
<i>Ddx58</i>	<i>Rsad2</i>	<i>Ifit3</i>	<i>Ifit3</i>	<i>Ifit3</i>	<i>Itga2b</i>
<i>Stat1</i>	<i>Oas3</i>	<i>Ifih1</i>	<i>Ifih1</i>	<i>Ifih1</i>	<i>Cebpa</i>
<i>Rsad2</i>	<i>Dhx58</i>	<i>Irf7</i>	<i>Irf7</i>	<i>Irf7</i>	<i>Tgfb2</i>
<i>Stat2</i>	<i>Ifit1</i>	<i>Rsad2</i>	<i>Rsad2</i>	<i>Rsad2</i>	<i>Itgb6</i>
<i>Oasl2</i>	<i>Eif2ak2</i>	<i>Oasl2</i>	<i>Oasl2</i>	<i>Oasl2</i>	<i>Eif2ak2</i>
<i>Dhx58</i>	<i>Rtp4</i>	<i>Dhx58</i>	<i>Dhx58</i>	<i>Dhx58</i>	<i>Hmox1</i>
<i>Irf7</i>	<i>Irf9</i>	<i>Irf9</i>	<i>Irf9</i>	<i>Irf9</i>	<i>Ifi35</i>
<i>Irf9</i>	<i>Oas1a</i>	<i>Ifi35</i>	<i>Ifi35</i>	<i>Ifi35</i>	<i>Gpx3</i>
<i>Eif2ak2</i>	<i>Ddx58</i>	<i>Eif2ak2</i>	<i>Eif2ak2</i>	<i>Eif2ak2</i>	<i>Isg15</i>
<i>Rtp4</i>	<i>Irf7</i>	<i>Rtp4</i>	<i>Rtp4</i>	<i>Rtp4</i>	<i>Psmb8</i>
<i>Ifi35</i>	<i>Usp18</i>	<i>Stat2</i>	<i>Stat2</i>	<i>Stat2</i>	<i>Hspa5</i>
<i>Oas3</i>	<i>Isg15</i>	<i>Oas3</i>	<i>Oas3</i>	<i>Gbp3</i>	<i>Ddx58</i>
<i>Oasl1</i>	<i>Ifi35</i>	<i>Gbp3</i>	<i>Gbp3</i>	<i>Herc6</i>	<i>Ifit3</i>
<i>Oas1a</i>	<i>Herc6</i>	<i>Oasl1</i>	<i>Oasl1</i>	<i>Oas3</i>	<i>H2-K1</i>
<i>Herc6</i>	<i>Stat1</i>	<i>Herc6</i>	<i>Herc6</i>	<i>Oasl1</i>	<i>Ccl11</i>
<i>Gbp3</i>	<i>Ube2l6</i>	<i>Oas1a</i>	<i>Oas1a</i>	<i>Oas1a</i>	<i>Gsta4</i>
<i>Ube2l6</i>	<i>Gbp7</i>	<i>Ube2l6</i>	<i>Il1b</i>	<i>Ube2l6</i>	<i>Serpine1</i>
<i>Igtp</i>	<i>Ifi47</i>	<i>Igtp</i>	<i>Ube2l6</i>	<i>Igtp</i>	<i>Per2</i>
<i>Irgm2</i>	<i>Uba7</i>	<i>Irgm2</i>	<i>Igtp</i>	<i>Gbp7</i>	<i>Myo15</i>
<i>Gbp7</i>	<i>Gbp3</i>	<i>Psmb8</i>	<i>Irgm2</i>	<i>Irgm2</i>	<i>Irf7</i>
<i>Ifi47</i>	<i>Irgm2</i>	<i>Gbp7</i>	<i>Psmb8</i>	<i>Uba7</i>	<i>Rsad2</i>
<i>Uba7</i>	<i>Igtp</i>	<i>Ifi47</i>	<i>Gbp7</i>	<i>Ifi47</i>	<i>Irf9</i>
<i>Psmb8</i>	<i>Lpl</i>	<i>Uba7</i>	<i>Aim2</i>	<i>Psmb8</i>	<i>Rtp4</i>
<i>Il1b</i>	<i>Dnaic1</i>	<i>Tap1</i>	<i>Ifi47</i>	<i>Aim2</i>	<i>Gbp3</i>
<i>Tap1</i>	<i>Cfap70</i>	<i>Lpl</i>	<i>Uba7</i>	<i>Tap1</i>	<i>Ube2l6</i>

相关, 以上结果表明T组细胞已分化, 分裂能力下降, 同时暗示T组细胞处于炎症状态。

Hub基因中下调Hub基因均与细胞周期相关, 说明细胞已分化, 分裂倾向降低。上调Hub基因中除*Isg15*表达上调外, *Ddx58*、*Ifit3*、*Irgm2*、*Eif2ak2*、*Irf9*、*Stat1*等基因也出现明显上调。其中, *Ddx58*与脂肪包涵体的清除相关, 在对非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型的研究中发现, 激活*Ddx58*会增加自噬反应, 有助于清除导致细胞炎症和凋亡的有毒脂质包涵体^[21]; *Ifit3*与抗病毒、对抗细胞凋亡相关, IFIT3在抗病毒天然免疫中发挥重要作用, 抑制某些病毒

的复制。新的发现已经证明了IFIT3在各种情景(包括细胞分化)中存在差异表达^[22]; EREN等^[23]在对巨噬细胞的研究中证明, 干扰素诱导蛋白IRGM2和ATG-8家族成员GATE-16抑制革兰氏阴性菌诱导的非典型炎性小体激活, 这表明细胞组分严格控制非典型炎性小体的阈值水平, 以确保有效但无害的炎症反应发生。XIE等^[24]的研究表明, PKM2介导的糖酵解通过调节巨噬细胞中的EIF2AK2磷酸化来促进炎症小体激活; *Irf9*与细胞凋亡相关, IRF9通过抑制鱼类的SIRT1-p53轴来促进细胞凋亡和维持正常的免疫, 其中的SIRT1是一种NAD依赖性脱乙酰酶, 通

表3 前30位下调Hub基因

Table 3 The top 30 down-regulated Hub genes

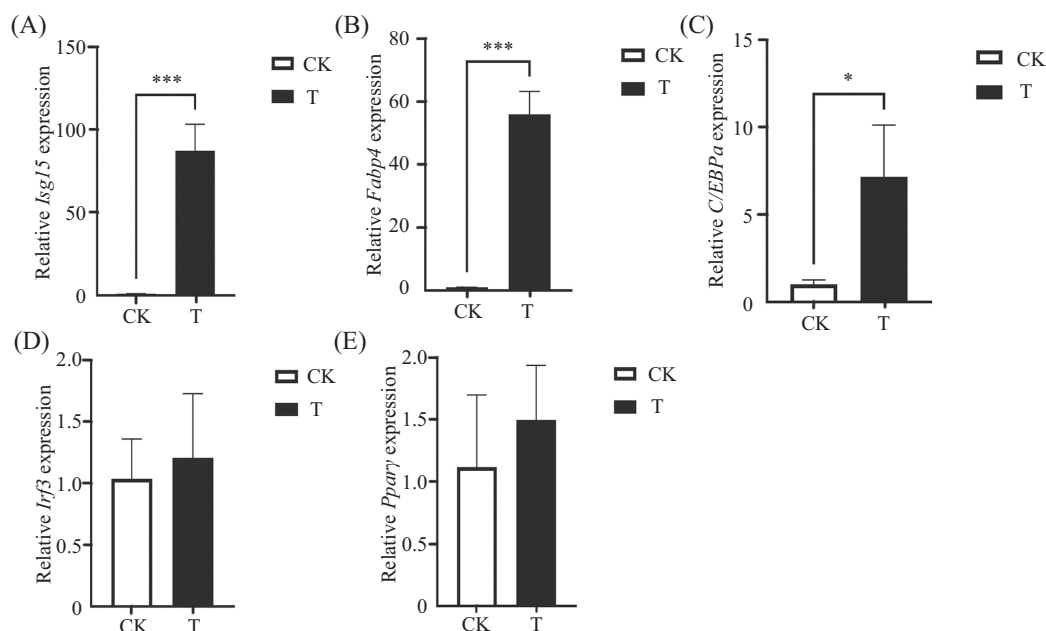
最大团中心性	最大领域组件密度	最大领域组件	度中心性	边缘渗透组件	瓶颈中心性
Maximal clique centrality	Density of maximum neighborhood component	Maximum neighborhood component	Degree	Edge percolated component	Bottleneck
<i>Mcm5</i>	<i>Cdc6</i>	<i>Mcm5</i>	<i>Mcm5</i>	<i>Bub1b</i>	<i>Cdk2</i>
<i>Mcm2</i>	<i>Orc1</i>	<i>Cdc45</i>	<i>Cdc45</i>	<i>Cdc20</i>	<i>Cdc6</i>
<i>Cdc45</i>	<i>Gins1</i>	<i>Bub1b</i>	<i>Cdc20</i>	<i>Cdk1</i>	<i>Ccnb1</i>
<i>Mcm3</i>	<i>Mcm6</i>	<i>Mcm2</i>	<i>Bub1b</i>	<i>Aurkb</i>	<i>Cdk1</i>
<i>Mcm7</i>	<i>Cenps</i>	<i>Mcm3</i>	<i>Mcm2</i>	<i>Ccnb1</i>	<i>Bub1b</i>
<i>Mcm6</i>	<i>Dbf4</i>	<i>Mcm7</i>	<i>Mcm3</i>	<i>Cdca8</i>	<i>Fancm</i>
<i>Cdt1</i>	<i>Cenpi</i>	<i>Pole</i>	<i>Mcm7</i>	<i>Bub1</i>	<i>Cenpa</i>
<i>Cdc6</i>	<i>Cenpq</i>	<i>Cdc20</i>	<i>Pole</i>	<i>Mcm5</i>	<i>Mcm5</i>
<i>Orc1</i>	<i>Cdt1</i>	<i>Mcm6</i>	<i>Cdk1</i>	<i>Cdc45</i>	<i>Cenps</i>
<i>Pole</i>	<i>Cenpk</i>	<i>Cdk1</i>	<i>Mcm6</i>	<i>Mcm2</i>	<i>H2ax</i>
<i>Gins1</i>	<i>Cenpw</i>	<i>Cdt1</i>	<i>Cdt1</i>	<i>Mcm3</i>	<i>Cenpk</i>
<i>Cenpk</i>	<i>Cenpn</i>	<i>Pola1</i>	<i>Bub1</i>	<i>Mcm7</i>	<i>Brca2</i>
<i>Cenpw</i>	<i>Cenph</i>	<i>Bub1</i>	<i>Pola1</i>	<i>Pole</i>	<i>Cdc45</i>
<i>Cenpn</i>	<i>Mcm7</i>	<i>Cdc6</i>	<i>Cdc6</i>	<i>Mcm6</i>	<i>Rrm1</i>
<i>Cenph</i>	<i>Mcm2</i>	<i>Orc1</i>	<i>Ccnb1</i>	<i>Pola1</i>	<i>Top2a</i>
<i>Timeless</i>	<i>Mcm3</i>	<i>Aurkb</i>	<i>Cenpa</i>	<i>Cdc6</i>	<i>Aspm</i>
<i>Cenps</i>	<i>Timeless</i>	<i>Cdca8</i>	<i>Cdk2</i>	<i>Cdt1</i>	<i>Recql4</i>
<i>Dbf4</i>	<i>Prim1</i>	<i>Ccnb1</i>	<i>Orc1</i>	<i>Orc1</i>	<i>Tyms</i>
<i>Cenpi</i>	<i>Cdc45</i>	<i>Brca1</i>	<i>Aurkb</i>	<i>Cenpa</i>	<i>Cdc20</i>
<i>Cenpq</i>	<i>Pold1</i>	<i>Gins1</i>	<i>Cdca8</i>	<i>Gins1</i>	<i>Topbp1</i>
<i>Pola1</i>	<i>Cenpa</i>	<i>Cenpk</i>	<i>Brca1</i>	<i>Timeless</i>	<i>Skp2</i>
<i>Cdc20</i>	<i>Ncapg</i>	<i>Cenpw</i>	<i>Gins1</i>	<i>Pold1</i>	<i>Mcm6</i>
<i>Bub1b</i>	<i>Pola2</i>	<i>Cenpn</i>	<i>Cenpk</i>	<i>Incenp</i>	<i>Brca1</i>
<i>Cdk1</i>	<i>Smc4</i>	<i>Cenph</i>	<i>Cenpw</i>	<i>Topbp1</i>	<i>Kif4</i>
<i>Aurkb</i>	<i>Ncapg2</i>	<i>Timeless</i>	<i>Cenpn</i>	<i>Aurka</i>	<i>Ncapg</i>
<i>Cdca8</i>	<i>Smc2</i>	<i>Cenps</i>	<i>Cenph</i>	<i>Dbf4</i>	<i>Mcm3</i>
<i>Pold1</i>	<i>Ncapd2</i>	<i>Dbf4</i>	<i>Timeless</i>	<i>Cdk2</i>	<i>Pole</i>
<i>Bub1</i>	<i>Mcm5</i>	<i>Cenpi</i>	<i>Cenps</i>	<i>Ube2c</i>	<i>Pcna</i>
<i>Ccnb1</i>	<i>Incenp</i>	<i>Cenpq</i>	<i>Pold1</i>	<i>Brca1</i>	<i>Ndc80</i>
<i>Cenpa</i>	<i>Pole</i>	<i>Pold1</i>	<i>Brca2</i>	<i>Prim1</i>	<i>Rad51</i>

过p53等多种途径广泛参与细胞凋亡和细胞炎症^[25]; *Stat1*与细胞凋亡、细胞免疫相关, *STAT1*可以调节广谱的细胞死亡, 包括凋亡和非凋亡途径^[26], 小鼠的 *STAT1*基因缺失和人类的 *STAT1*完全缺乏都会导致机体严重感染而快速死亡^[27]。

已有研究表明, *ISG15*过表达会抑制产热基因表达和降低细胞能量消耗^[28]。产热是一个能量消耗极高的过程, 主要燃料来源是白色脂肪组织的脂肪^[29], 在非寒颤产热过程中, 棕色脂肪细胞内的脂解作用仅起次要作用^[30-31]。*ISG15*是脂肪细胞糖酵解的强调节因子, *ISG15*可以通过共价结合糖酵解酶降低其活

性减少乳酸产生, 从而介导 *IRF3*对脂肪细胞代谢重编程, 对脂肪产热产生影响^[28], 最终导致细胞内脂肪积累的发生。

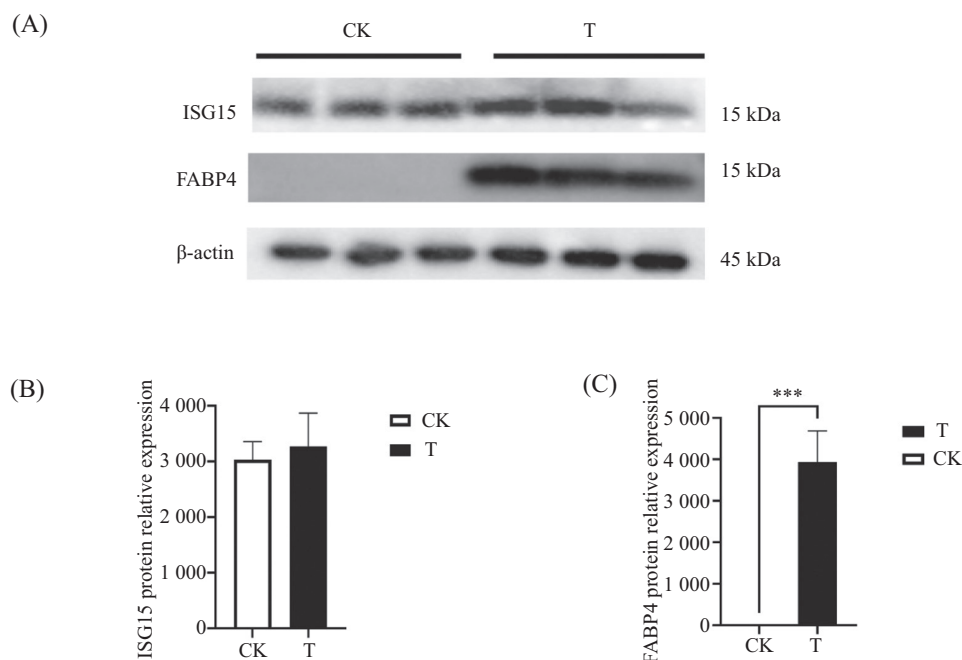
WB结果显示, *ISG15*蛋白在两组细胞中均有表达, 且没有表达量的明显区别(图7B), 荧光定量PCR结果显示T组细胞 *Isg15*表达量约为CK组细胞的87倍(图6A), 本文预测的理想结果是T组 *ISG15*含量高于CK组, 并基于此做出以下两种猜测: 在收集细胞进行检测时, T组细胞中的 *Isg15*虽已大量转录, 但尚未大量翻译为蛋白质, 即 *Isg15*的表达存在时空差异; 或者CK组细胞本身就已大量表达 *ISG15*蛋白, 导致



A: *Isg15*基因表达水平; B: *Fabp4*基因表达水平; C: *C/EBPa*基因表达水平; D: *Irf3*基因表达水平; E: *Pparγ*基因表达水平。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。
A: *Isg15* gene expression level; B: *Fabp4* gene expression level; C: *C/EBPa* gene expression level; D: *Irf3* gene expression level; E: *Pparγ* gene expression level. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

图6 实时荧光定量PCR结果

Fig.6 Real-time fluorescence quantitative PCR results



A: ISG15、FABP4、β-actin蛋白WB结果; B: ISG15蛋白相对表达量; C: FABP4蛋白相对表达量。*** $P < 0.001$ 。

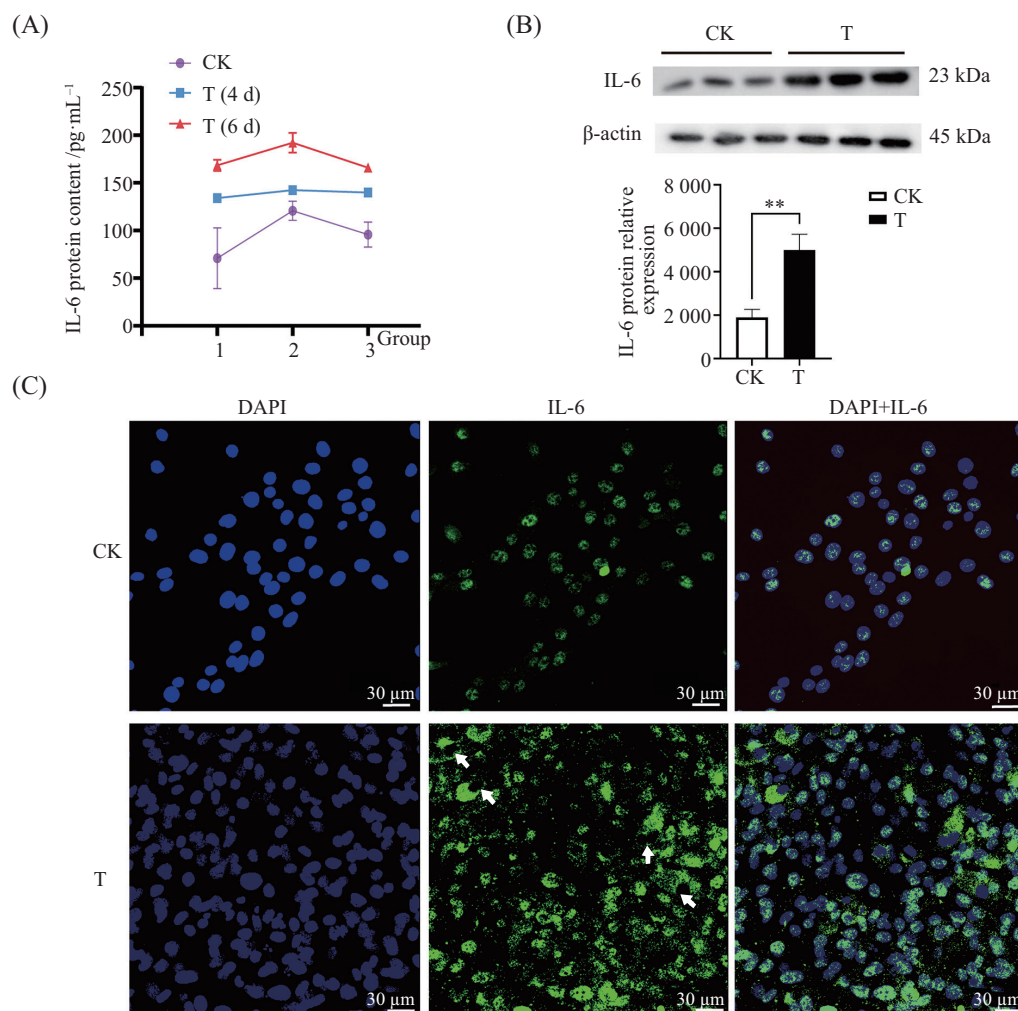
A: WB results of ISG15, FABP4, β-actin proteins; B: relative expression level of ISG15 protein; C: relative expression level of FABP4 protein. *** $P < 0.001$.

图7 ISG15、FABP4 蛋白免疫印迹杂交结果

Fig.7 Results of Western blot for ISG15 and FABP4 proteins

通过免疫印迹杂交无法明显区分两组的表达量差异。IRF(IRF1~9)家族中IRF3在脂肪细胞中已被验证为促ISG15表达的重要转录因子^[31],但在C2C12细

胞诱导脂肪积累过程中,*Irf3*未表现出明显表达上调(图6D),可见C2C12细胞中*Isg15*基因的上调可能存在两个原因:*Irf3*上调表达仅出现在脂肪积累开始阶



A: 细胞培养液中IL-6蛋白含量; B: 诱导前后细胞中IL-6蛋白相对表达量; C: 诱导前后细胞中IL-6蛋白免疫荧光染色。 ** $P < 0.01$ 。

A: IL-6 protein content in cell culture medium; B: relative expression of IL-6 protein in cells before and after induction; C: immunofluorescence staining of IL-6 protein in cells before and after induction. ** $P < 0.01$.

图8 细胞炎症状态验证结果

Fig.8 Verification results of cell inflammation status

段, 或者*Isg15*基因上调存在其他的途径。

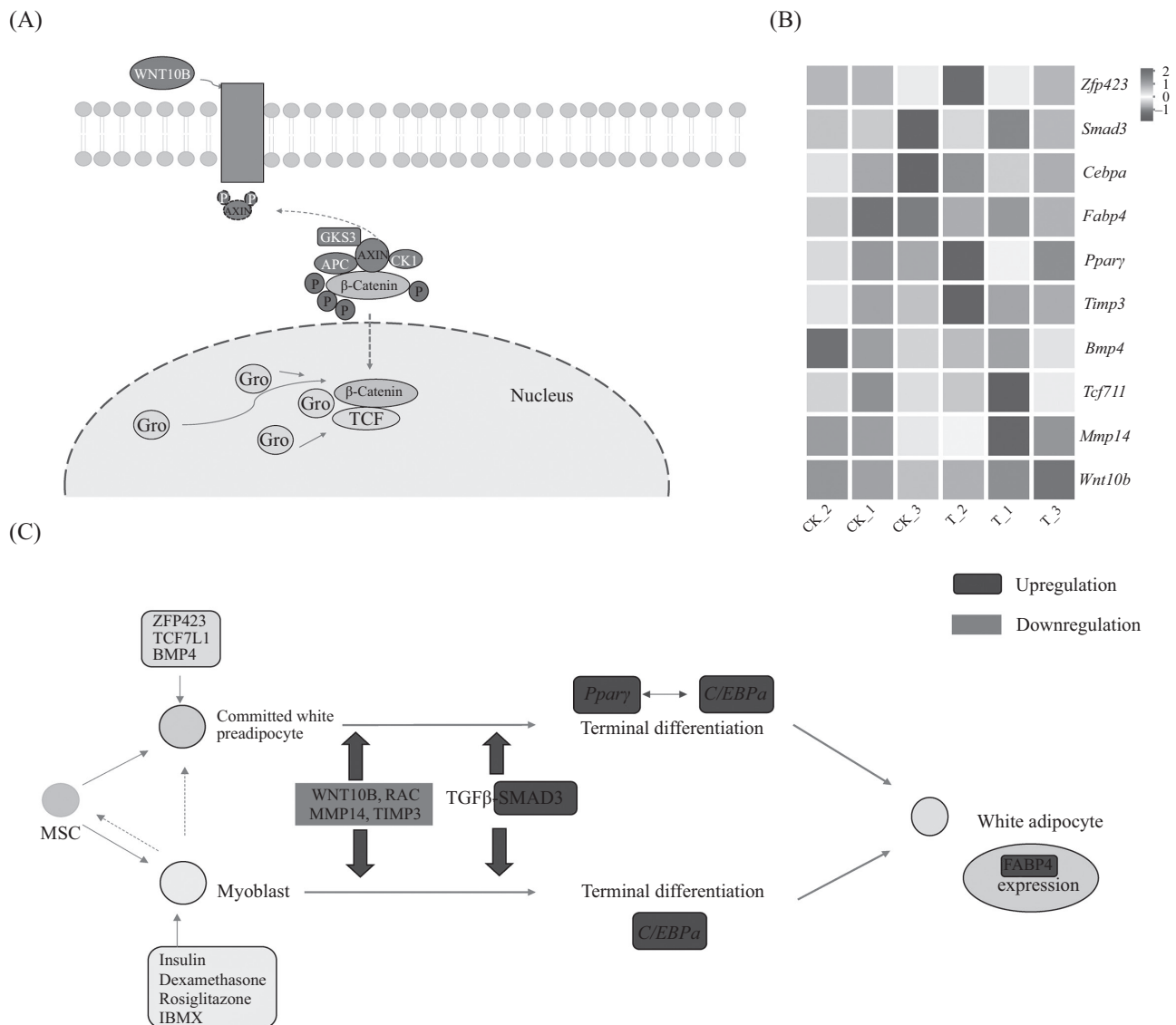
细胞内的脂肪积累过程受到多个信号通路调控, 其中最为经典的信号通路是Wnt信号通路^[32](图9A)。Wnt信号家族成员维持前脂肪细胞处于未分化状态, 抑制脂肪形成的早期阶段, 在经典Wnt信号通路中, Wnt通过 β -catenin传导信号, 抑制PPAR γ 和C/EBP α 的表达。当Wnt信号通路受到抑制时, C/EBP α 表达上调, 可使细胞表现出向成脂方向发展^[21]。在哺乳动物脂肪前体细胞中, C/EBP α 是脂肪细胞分化的关键调节因子^[33], FUX等^[34]的研究表明, C/EBP α 过表达足以将C2C12细胞转化为脂肪细胞。本研究中, C2C12细胞在脂肪积累过程中, 出现了C/EBP α 的显著上调, T组细胞C/EBP α 表达量约为CK组的7倍(图6C), 此结果表明Wnt途径被抑制。

由于成肌细胞与成脂细胞源于共同的多能间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)^[35], 所以本研究对比了C2C12细胞生脂前后与已被证实的脂肪前体细胞生脂前后的基因表达差异。根据转录组分析结果(图9B), C2C12细胞在诱导液的作用下, 表现出*Wnt10b*表达下调, 若WNT10B蛋白水平降低, 则会导致Wnt信号通路受到抑制。此外, *Rac1*、*Mmp14*、*Timp3*的相对表达下调也与脂肪前体细胞生脂过程中的部分蛋白下调有相符之处。尽管SMAD3在调控脂肪生成的体内体外实验中的作用存在争议, 但已有实验证明, *Smad3*基因缺失的小鼠能够抵制饮食诱导的肥胖, 且脂肪形成能力下降^[36], 说明SMAD3参与的TGF β -SMAD3信号通路对脂肪形成有重要影响。尽管二者有诸多相似, 但在本研

究中仍然发现了C2C12细胞与脂肪前体细胞生脂过程中的不同,在脂肪前体细胞中,Wnt信号通路被抑制后,PPAR γ 和C/EBP α 在终末分化阶段表现为上调表达,且二者相互影响。但在C2C12细胞生脂分化中,转录组分析结果显示仅C/EBP α 表达上调,且最终标志物FABP4蛋白表达量显著升高,这表明细胞已完成转脂分化。对此我们做出两种可能猜测,其一为C2C12细胞中原本的*Ppar γ* 含量较高,所以在生脂过程前后仅C/EBP α 表现出表达上调,其二为*Ppar γ* 上调表达仅出现在分化过程中,一旦出现脂肪蓄积或者脂肪积累到一定程度,PPAR γ 将不再继

续上调表达。

虽然成肌细胞能够向脂肪细胞分化这一现象已得到证实,但其具体分化途径尚未被完全阐明,尤其是其在分化过程中表现出与脂肪前体细胞基因调控上存在许多不同,所以我们推测有三种可能。其一为成肌细胞在添加诱导液后生存环境改变,从而具备MSC细胞部分功能,能够被诱导成为脂肪前体细胞;其二为成肌细胞在诱导液作用下可以发挥部分脂肪前体细胞功能,完成向脂肪细胞的转化;其三为成肌细胞本身具备脂肪蓄积的能力,在诱导液作用下可以完成脂肪积累,分化成为脂肪细胞样细胞,



A: Wnt信号通路模式图; B: 转脂分化相关基因热图; C: 成肌细胞转脂分化模式图。

A: Wnt signaling pathway pattern diagram; B: heatmap of genes related to translipid differentiation; C: diagram of myoblast translipid differentiation pattern.

图9 Wnt信号通路与成肌细胞转脂分化模式图

Fig.9 Pattern of Wnt signaling pathway and myoblast translipid differentiation

但其能否分化成为具有正常功能的脂肪细胞仍需后续研究证明。

IL-6过量表达是多种炎症发病机制的核心, IL-6受体缺失突变的患者, 通常表现为反复感染、异常急性期反应、IgE升高、湿疹和嗜酸性粒细胞增多^[37]。IL-6已被证实在诸如类风湿性关节炎、幼年特发性关节炎和巨细胞动脉炎等炎症疾病发病机制中发挥核心作用^[38]。人体中IL-6血清浓度通常在50 pg/mL以下, 正常状态下巨噬细胞^[39]、脂肪细胞和肌肉细胞中IL-6表达水平较低^[40]。然而, 当细胞遭遇环境变化、病毒感染或理化性质改变时, IL-6表达能力显著增强, 水平呈倍数增加, 进入活跃表达状态^[41]。本研究通过对IL-6蛋白在细胞内的分布、培养基中含量检测、细胞内含量检测3个维度证实了其在诱导分化前后呈表达上升趋势, 与转录组结果相互印证, 导致炎症相关基因上调表达的原因是C2C12细胞在成脂分化的过程中处于炎症状态。

综上, C2C12细胞出现脂肪积累时处于炎症状态, 上调表达*Ddx58*、*Ifit3*、*Irgm2*、*Eif2ak2*、*Irf9*、*Stat1*基因以应对细胞炎症反应保证细胞存活, 并向成脂方向发展。

参考文献 (References)

- [1] AVESANI C M, DE ABREU A M, RIBEIRO H S, et al. Muscle fat infiltration in chronic kidney disease: a marker related to muscle quality, muscle strength and sarcopenia [J]. *J Nephrol*, 2023, 36(3): 895-910.
- [2] KIM H K, KIM C H. Quality matters as much as quantity of skeletal muscle: clinical implications of myosteatosis in cardiometabolic health [J]. *Endocrinol Metab*, 2021, 36(6): 1161-74.
- [3] GOUTALLIER D, POSTEL J M, BERNAGEAU J, et al. Fatty muscle degeneration in cuff ruptures. Pre- and postoperative evaluation by CT scan [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1994(304): 78-83.
- [4] 卢白雪, 高伟成. 肌内脂肪浸润的研究进展[J]. *组织工程与重建外科*(LU B X, GAO W C. Research progress of intramuscular fat infiltration [J]. *Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery*), 2024, 20(4): 481-5.
- [5] VETTOR R, MILAN G, FRANZIN C, et al. The origin of intermuscular adipose tissue and its pathophysiological implications [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297(5): E987-98.
- [6] PAGANO A F, BRIOCHE T, ARC-CHAGNAUD C, et al. Short-term disuse promotes fatty acid infiltration into skeletal muscle [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2018, 9(2): 335-47.
- [7] BIRBRAIR A, ZHANG T, WWANG Z M, et al. Role of pericytes in skeletal muscle regeneration and fat accumulation [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(16): 2298-314.
- [8] KOMIYA Y, SAWANO S, MASHIMA D, et al. Mouse soleus (slow) muscle shows greater intramyocellular lipid droplet accumulation than EDL (fast) muscle: fiber type-specific analysis [J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 2017, 38(2): 163-73.
- [9] LIU Y, LIU Z, LUO Q, et al. Cinnamaldehyde affects lipid droplets metabolism after adipogenic differentiation of C2C12 cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2023, 50(3): 2033-9.
- [10] LIU S, WU D, FAN Z, et al. FABP4 in obesity-associated carcinogenesis: novel insights into mechanisms and therapeutic implications [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 973955.
- [11] YEOW K, PHILLIPS B, DANI C, et al. Inhibition of myogenesis enables adipogenic trans-differentiation in the C2C12 myogenic cell line [J]. *FEBS Lett*, 2001, 506(2): 157-62.
- [12] HE Q, CHEN Y, WANG Z, et al. Cellular uptake, metabolism and sensing of long-chain fatty acids [J]. *Front Biosci*, 2023, 28(1): 10.
- [13] 齐仁立, 王琪, 王敬, 等. 共轭亚油酸对C2C12肌细胞生脂和生肌分化的影响[J]. *动物营养学报*(QI R L, WANG Q, WANG J, et al. Effect of conjugated linoleic acid on adipogenic and myogenic differentiation of C2C12 muscle cells [J]. *Journal of Animal Nutrition*), 2016, 28(9): 2778-85.
- [14] KALINKOVICH A, LIVSHITS G. Sarcopenic obesity or obese sarcopenia: a cross talk between age-associated adipose tissue and skeletal muscle inflammation as a main mechanism of the pathogenesis [J]. *Ageing Res Rev*, 2017, 35: 200-21.
- [15] HUANG Z, XIE X. Chemerin induces insulin resistance in C2C12 cells through nuclear factor- κ B pathway-mediated inflammatory reaction [J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2015, 31(6): 725-9.
- [16] TSUKAHARA T, HANIU H. Nanoparticle-mediated intracellular lipid accumulation during C2C12 cell differentiation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(4): 558-63.
- [17] KHROMOVA N, PEREPELINA K, IVANOVA O, et al. R482L mutation of the LMNA gene affects dynamics of C2C12 myogenic differentiation and stimulates formation of intramuscular lipid droplets [J]. *Biochemistry*, 2019, 84(3): 241-9.
- [18] XIAO T, LIU L, LI H, et al. Long noncoding RNA ADINR regulates adipogenesis by transcriptionally activating C/EBP α [J]. *Stem Cell Rep*, 2021, 16(4): 1006-8.
- [19] VAN D, SHEEDFAR F, MORRISON M, et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice [J]. *Aging*, 2015, 7(4): 256-68.
- [20] ZUBIAGA A. Foreword special issue cell cycle and regulation [J]. *Genes*, 2020, 11(3): 254.
- [21] FRIETZE K K, BROWN A M, DAS D, et al. Lipotoxicity reduces DDX58/Rig-I expression and activity leading to impaired autophagy and cell death [J]. *Autophagy*, 2022, 18(1): 142-60.
- [22] CHEN H, KING K, TU J, et al. The roles of IRF-3 and IRF-7 in innate antiviral immunity against dengue virus [J]. *J Immunol*, 2013, 191(8): 4194-201.
- [23] EREN E, PLANÈS R, BAGAYOKO S, et al. Irgm2 and Gate-16 cooperatively dampen Gram-negative bacteria-induced caspase-11 response [J]. *EMBO Rep*, 2020, 21(11): e50829.
- [24] XIE M, YU Y, KANG R, et al. PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 13280.
- [25] JIANG Z, WENG P, XU X, et al. IRF9 promotes apoptosis and innate immunity by inhibiting SIRT1-p53 axis in fish [J]. *Fish*

- Shellfish Immunol, 2020, 103: 220-8.
- [26] KIM H S, LEE M S. STAT1 as a key modulator of cell death [J]. Cell Signal, 2007, 19(3): 454-65.
- [27] TOLOMEO M, CAVALLI A, CASCIO A. STAT1 and its crucial role in the control of viral infections [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(8): 4095.
- [28] SHIN H, MA Y, CHANTURIYA T, et al. Lipolysis in brown adipocytes is not essential for cold-induced thermogenesis in mice [J]. Cell Metab, 2017, 26(5): 764.
- [29] SCHREIBER R, DIWOKY C, SCHOISWOHL G, et al. Cold-induced thermogenesis depends on ATGL-mediated lipolysis in cardiac muscle, but not brown adipose tissue [J]. Cell Metab, 2017, 26(5): 753-63, e7.
- [30] JEONG J, CHANG J, JO Y. Intracellular glycolysis in brown adipose tissue is essential for optogenetically induced nonshivering thermogenesis in mice [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 6672.
- [31] YAN S, KUMARI M, XIAO H, et al. IRF3 reduces adipose thermogenesis via ISG15-mediated reprogramming of glycolysis [J]. J Clin Invest, 2021, 131(7): e144888.
- [32] CRISTANCHO A, LAZAR M. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(11): 722-34.
- [33] YOON S, HUANG K, ANDRIKAKOU P, et al. Targeted delivery of C/EBP α -saRNA by RNA aptamers shows anti-tumor effects in a mouse model of advanced PDAC [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2019, 18: 142-54.
- [34] FUX C, MITTA B, KRAMER B, et al. Dual-regulated expression of C/EBP- α and BMP-2 enables differential differentiation of C2C12 cells into adipocytes and osteoblasts [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(1): e1.
- [35] CHEN Q, SHOU P, ZHENG C, et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts [J]. Cell Death Differ, 2016, 23(7): 1128-39.
- [36] YADAV H, QUIJANO C, KAMARAJU A K, et al. Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF- β /Smad3 signaling [J]. Cell Metab, 2011, 14(14): 67-79.
- [37] SPENCER S, KÖSTEL BAL S, EGNER W, et al. Loss of the interleukin-6 receptor causes immunodeficiency, atopy, and abnormal inflammatory responses [J]. J Exp Med, 2019, 216(9): 1986-98.
- [38] TANAKA T, NARAZAKI M, KISHIMOTO T. Interleukin (IL-6) immunotherapy [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(8): a028456.
- [39] 孙紫杭, 鞠艺朵, 徐若昕, 等. 肠道菌群代谢物DAT通过KLF4影响巨噬细胞IL-6产生[J]. 徐州医科大学学报(SUN Z H, JU Y D, XU R X, et al. The gut microbiota metabolite DAT affects macrophage IL-6 production through KLF4 [J]. Acta Academiae Medicinae Xuzhou), 2024, 44(11): 796-9.
- [40] 刘春辉, 刘兆润, 董丽, 等. 炎症性肠病患者的血清IL-6、sICAM-1、chemerin的水平变化与意义[J]. 中国医学创新(LIU C H, LIU Z R, DONG L, et al. Changes and significance of serum IL-6, sICAM-1 and chemerin levels in patients with inflammatory bowel disease [J]. Medical Innovation of China), 2022, 19(5): 119-23.
- [41] CSERI K, SZENTESI P, CSERNOCH L. IL-6 production of C2C12 cells is enhanced in the presence of macrophages and pravastatin [J]. Gen Physiol Biophys, 2021, 40(4): 307-15.