

Fkbp51 基因敲除小鼠肝脏与大脑海马区 RNA 表达谱系的分析比较

徐玉雪, 邱 彬, 魏 强, 雍伟东

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 通过分析野生型小鼠(WT)与 *Fkbp51* 基因敲除(KO)小鼠肝脏、海马 RNA 表达谱系之间的差异, 研究 *Fkbp51* 基因在代谢通路和神经通路中的作用。**方法** 利用第二代测序技术对 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠的肝脏与海马 mRNA 进行表达谱测序, 将测序结果用 BRB-ArrayTools 进行分析, 筛选出小鼠肝脏与海马的差异基因, 然后分别利用在线工具 DAVID 对差异基因进行 GO 本体分析, STRING 数据库对其进行蛋白质的相互作用网络分析, 并利用 Genecard 对基因进行注释。**结果** (1) *Fkbp51* 的缺失, 在肝脏中造成类固醇生物合成及代谢、脂类物质代谢以及氧化还原反应等相关基因表达水平的变化; (2) 在海马中造成机械刺激探测、学习或记忆、突触传递的调节、PPAR 信号通路、肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)等相关基因表达水平的变化; (3) 在肝脏与海马中, *Fkbp51* 的缺失同时造成了 11 个基因的共差异表达, 这 11 个基因的蛋白网络互作图显示: HMGCS2 与 INSIG1 及相关蛋白形成网络, 而 USP2 与 PER、CRY、DBP 等相关蛋白形成另一个网络。这两个网络既参与代谢也参与神经调节。**结论** *Fkbp51* 在代谢与神经中的作用既是相互独立又是相互联系的。

【关键词】 *Fkbp51* 基因敲除小鼠; 肝脏; 神经系统; RNA-seq

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 05-0040-09

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2016. 005. 006

The gene expression profiling difference of liver and brain hippocampus between wild type and *Fkbp51* knockout mice

XU Yu-xue, QIU Bin, WEI Qiang, YONG Wei-dong

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College (PUMC); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective The purpose of this study is to understand the function of *Fkbp51* in metabolic pathways and neural pathways by profiling gene expression of liver and hippocampus tissues of both *Fkbp51*KO and WT mice. **Methods** mRNAs of liver and hippocampus of *Fkbp51*KO and WT mice were isolated and expression profiling was performed using RNA-seq. Differentially expressed gene between KO and WT were analyzed using BRB-Array Tools. DAVID, STRING,

【基金项目】 国家自然科学基金(81272273); 协和青年基金和中央高校基本科研业务费专项资金资助(33320140151、3332015054、3320140086); 中国医学科学院医学实验动物研究所基本科研业务费专项资助(DWS201508)。

【作者简介】 徐玉雪(1988-), 女, 硕士, 研究方向: 基因与发育生物学。E-mail: 978268201@qq.com。

【通讯作者】 雍伟东(1967-), 男, 研究方向: 生殖与发育生物学。Email: wyong@cnilas.org; 魏强(1964-), 男, 研究方向: 实验动物病毒学。Email: weiqiang0430@sohu.com。

Genecard programs, the Gene Ontology, the Protein-protein Interaction Network and the Gene Annotation were applied to identify significant functional-relevant pathways. **Results** When compared differentially expressed genes between *Fkbp51*KO and WT in liver, we found that the loss of *Fkbp51* in liver has large effect on the genes related to steroid biosynthetic and metabolic process, lipid biosynthetic process and oxidation reduction. When differentially expressed gene in hippocampus was studied between genotypes, we found that elimination of *Fkbp51* has much effect on genes related to detection of mechanical stimulus, learning or memory, regulation of synaptic transmission and the pathway of PPAR and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) e. g. When intersection of gene lists between liver and hippocampus tissues, we identified 11 common differentially expression genes. In these genes, HMGCS2 and INSIG1 are grouped in one protein-protein interaction network, and USP2, PER, CRY and DBP are grouped in another network. **Conclusions** The role of *Fkbp51* in metabolism and nervous system is not only independent but also interactive.

【Key words】 *Fkbp51* knockout mice; Liver; Nervous system; RNA-seq

Fkbp51 是一种具有肽酰脯氨酰顺-反异构酶活性的免疫亲和蛋白,含有肽重复序列结构域,可介导蛋白与蛋白之间的相互作用。其作为一种共伴侣蛋白,能够直接与伴侣蛋白(热休克蛋白 HSP90/70 等)结合并参与激素-受体复合物的形成及调控^[1]。已有研究表明,*Fkbp51* 在代谢与神经方面发挥着重要作用。

研究发现,*Fkbp51* 可通过调节糖代谢和脂代谢在动物体代谢过程中发挥作用。在肝脏中,糖皮质激素(GC)的重要作用是促进糖异生,但 GC 的过度刺激往往会引发糖尿病和某些代谢综合征,如向心性肥胖、脂肪病变和胰岛素抵抗等^[2-3]。GC 激活糖皮质激素受体(GR)后可直接促进 *Fkbp51* 的表达,进而负反馈作用于 GR,使其对 GC 的敏感性降低^[4-6],促进机体稳态的平衡。此外,近些年 *Fkbp51* 在脂肪细胞分化中的作用也引起了研究者的关注,Toneatto J 等^[7]人发现 *Fkbp51* 可抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的分化,而 Stechschulte 等^[8]人的研究则发现脂肪的生成需要 *Fkbp51* 的参与,这些矛盾的体外实验结果,可能是由于培养和诱导体系不同所导致的。我们前期利用 *Fkbp51* 基因敲除小鼠(*Fkbp51*KO),通过高脂喂养模型,发现敲除 *Fkbp51* 基因可对抗高脂诱导的肥胖^[9],并且其体内脂肪含量明显减少。进一步的研究发现,*Fkbp51*KO 肝脏、肌肉和脂肪组织中 GR 的活性明显大于野生型小鼠(WT),提示 *Fkbp51* 可能通过调节 GR 活性及其下游基因在代谢中发挥作用^[10]。

此外,*Fkbp51* 在神经方面也发挥着重要作用。海马是应激反应的整合部位,在海马中存在糖皮质激素受体(GR)和盐皮质激素受体(MR),下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)的负反馈调节就是通过 GR 和 MR 调节实现的。HPA 轴通过释放皮质类固醇激素

来应对外界的各种压力,这类激素的释放可激活神经元中 GR 活性和一些与应激反应相关的基因^[11],但这些调控机制的紊乱则会导致与压力相关脑疾病的产生。Binder 和他的同事发现 *Fkbp51* 基因的单核苷酸多态性(SNPs)与抑郁症及其治疗密切相关,这一发现为抗抑郁药物的研究提供了新的方向^[12]。研究还发现,这些存在于 *Fkbp51* 基因组中的 SNPs 能够使 *Fkbp51* 蛋白表达量增加,进而导致 GR 活性下降,引起 HPA 轴调节的紊乱。持续的 GR 抵抗使个体极易发生与压力相关的精神疾病。近年的研究还发现 *Fkbp51* 基因的 SNPs 变异与多种精神疾病的发病具有高度相关性,包括重度抑郁、双相情感障碍以及创伤后应激障碍(PTSD)等^[13-14]。

本实验通过分析 *Fkbp51* 基因敲除小鼠肝脏、海马 RNA 表达谱系与野生型小鼠之间的差异,研究 *Fkbp51* 基因在代谢通路与神经通路以及共同通路中的差异基因,进而进一步研究 *Fkbp51* 在生物体中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

2 月龄清洁级 *Fkbp51*KO 与同窝野生型雄鼠,由中国医学科学院医学实验动物研究所提供【SYXK(京)2014-0029】【SCXK(京)2014-0004】,体重 20g~24g。动物实验方案经过中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会(IACUC)批准。在使用实验动物的过程中充分考虑到动物的福利原则,尊重动物生命,善待动物,减少动物的应激、痛苦和伤害,采取脱颈的方法处置动物。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及测序

脱颈处死同窝 *Fkbp51*KO 与 WT 雄鼠各 3 只,取肝脏和海马,利用 Trizol 法提取组织的 RNA,样品交由华大基因测序。

1.2.2 差异表达基因的筛选

利用 BRB-ArrayTools 软件对数据进行统计学分析。该软件基本功能包括数据可视化、标准化处理、差异基因筛选、聚类分析等。BRB-ArrayTools 以 Excel 加载宏的形式呈现,计算由 Excel 外部的分析工具完成,用来比较两个组间的基因表达差异,集中关注一组显著上调或下调的基因,以此来阐述不同处理对样本产生的影响或揭示其中的生物学意义。

1.2.3 差异基因的 GO 本体分析以及 KEGG 通路分析

通过在线工具 DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 对差异基因进行分析。基因本体数据库 GO (Gene Ontology) 具有 3 个结构化的网络,从生物学过程、细胞成分和分子功能三个方面分别对肝脏与海马的差异基因进行注释。

1.2.4 差异表达基因的相互作用网络分析

STRING (<http://string-db.org/>) 数据库是一个

有关已知或预测蛋白质间相互作用的数据库,这些相互作用包括物理上的直接作用和功能上的间接关系。它们主要来自高通量实验、共表达分析、基因组内容、已有的知识这四个资源数据子库。本文主要利用此数据库进行肝脏与海马共差异基因的相互作用网络分析,来进一步研究蛋白之间的直接与间接相互作用。

1.2.5 Genecard 注释及分析

通过在线工具 Genecard (<http://www.genecards.org/>) 对基因进行注释。Genecard 是一个全面的,综合的收集了所有已知的或者预测的基因。它整合了跟基因相关的基因组、转录组、蛋白质组、临床等相关信息,收集整理了超过 100 个网站的数据。

2 结果

2.1 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠肝脏差异表达基因的分析

2.1.1 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠肝脏差异表达基因的 GO 本体分析

利用 BRB-ArrayTools 软件对 *Fkbp51*KO 和 WT

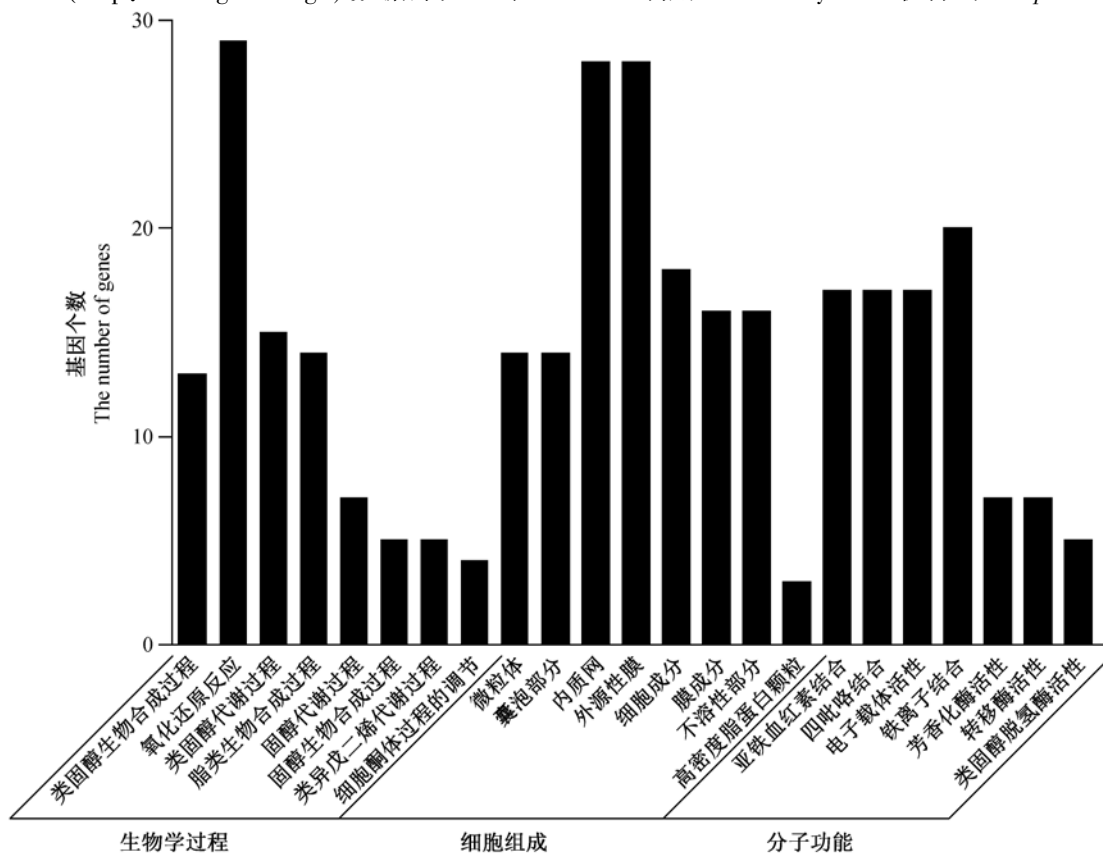


图 1 KO 与 WT 小鼠肝脏差异基因 GO 本体分析

Fig. 1 GO analysis of the liver differentially expressed genes in KO and WT mice

小鼠的肝脏基因进行差异筛选,共筛选出 206 个差异基因,其中 154 个基因呈现上调趋势,52 个基因呈现下调趋势。通过在线工具 DAVID 对肝脏的差异基因进行 GO 本体分析,分别从生物学过程、细胞组成和分子功能对基因进行注释(图 1),并统计每个注释中的上调基因和下调基因个数(表 1)。从图中可以看出,肝脏中的差异基因主要涉及与脂类物质代谢相关的生物学过程,在细胞组成中涉及到高

密度脂蛋白颗粒,在分子功能中涉及到芳香化酶活性、转移酶活性以及类固醇脱氢酶活性。这一分析也进一步验证了这些差异基因在肝脏中的重要性。

对这些差异表达基因进行生物学过程分析发现:主要涉及类固醇生物合成过程、氧化还原反应、类固醇代谢过程、脂类生物合成过程等生物学过程(表 2)。

表 1 KO 与 WT 小鼠肝脏差异基因的变化趋势

Tab. 1 Variation tendency of the liver differentially expressed genes in KO and WT

名称 Name	GO 本体分析 GO analysis	基因上调个数 Number of increasing genes	基因下调个数 Number of decreasing genes
生物学过程 Biological process	类固醇生物合成过程	8	5
	氧化还原反应	22	7
	类固醇代谢过程	9	5
	脂类生物合成过程	8	6
	固醇代谢过程	5	2
	固醇生物合成过程	3	2
	类异戊二烯代谢过程	3	2
	细胞酮体过程的调节	2	2
细胞组成 cellular component	微粒体	8	6
	囊泡部分	9	5
	内质网	19	9
	外源性膜	10	8
	细胞成分	11	7
	膜成分	10	6
	不溶性部分	8	8
	高密度脂蛋白颗粒	2	1
分子功能 molecular function	亚铁血红素结合	10	7
	四吡咯结合	9	8
	电子载体活性	11	6
	铁离子结合	12	8
	芳香化酶活性	4	4
	转移酶活性	4	3
	类固醇脱氢酶活性	4	3

表 2 KO 与 WT 小鼠肝脏差异基因的生物学过程

Tab. 2 Biological process of the liver differentially expressed genes in KO and WT

生物进程 Biological process	基因数目 Number of genes	基因名称 Name of genes	P-值 P-value	Benjamini 值 Benjamini-value
类固醇生物合成过程 Steroid biosynthesis	13	<i>Hmgcs2</i> . <i>Akr1c20</i> . <i>Akr1c6</i> . <i>Cyp17a1</i> . <i>Cyp39a1</i> . <i>Cyp21a1</i> . <i>Hsd3b2</i> . <i>Hsd3b3</i> . <i>Hsd3b5</i> . <i>Insig1</i> . <i>Fdps</i> . <i>Sc5d</i> . <i>Sc4molL</i> . <i>Gm3571</i>	5.7E-12	6.1E-9
氧化还原反应 oxidation-reduction reaction	29	<i>adh1</i> . <i>adh4</i> . <i>Aox3</i> . <i>Akr1c</i> 族. <i>Cyp2a</i> 族. <i>Hsd3b</i> 族. <i>Retsat</i> . <i>Cyp4a</i> 族. <i>Gm</i> . <i>Sc4molL</i>	1.3E-10	7.0E-8
类固醇代谢过程 Steroid metabolism process	15	<i>Hmgcs2</i> . <i>Akr1c6/20</i> . <i>Cyp17a1</i> . <i>Cyp21a1</i> . <i>Cyp39a1</i> . <i>Hsd3b2/3/5</i> . <i>Insig1</i> . <i>Serpian6</i> . <i>Fdps</i> . <i>Gm</i> . <i>Sreb1</i> . <i>Sc4mol</i> . <i>Sc5d</i>	9.0E-10	3.2E-7
脂类生物合成过程 Lipid biosynthesis	14	<i>Hmgcs2</i> . <i>Elov15</i> . <i>Akr1c6/20</i> . <i>Cyp17a1</i> . <i>Cyp21a1</i> . <i>Hsd3b2/3/5</i> . <i>Cyp39a1</i> . <i>Fdps</i> . <i>Gm</i> . <i>Sc4mol</i> . <i>Sc5d</i> .	6.6E-6	1.8E-3

注: Fisher 检验, $P < 0.001$; Benjamini-Hochberg 校正, $P < 0.01$ 。
Note: Fisher's exact test, $P < 0.001$; Benjamini-Hochberg corrected, $P < 0.01$.

2.2.2 *Fkbp*51KO 与 WT 小鼠肝脏差异表达基因的 KEGG 通路分析

同时 DAVID 在线工具对上述差异基因进行 KEGG 通路分析发现,这些差异基因主要参与药物代谢、视黄醇代谢、细胞色素 P450 外源性代谢、花生四烯酸代谢、亚油酸代谢等信号通路(表 3)。

2.2 *Fkbp*51KO 与 WT 小鼠海马差异表达基因的分析

2.2.1 *Fkbp*51KO 与 WT 小鼠海马差异表达基因的 GO 本体分析

利用 BRB-ArrayTools 软件对 *Fkbp*51KO 和 WT 小鼠的海马基因进行差异筛选,共筛选出 364 个差异基因,其中 172 个上调基因,192 个下调基因。通

过在线工具 DAVID 对海马的差异基因进行 GO 本体分析,分别从生物学过程、细胞组成和分子功能对基因进行注释(图 2),并统计每个注释中的上调基因和下调基因个数(表 4)。从图中可以看出,海马中的差异基因主要涉及与神经调节相关的生物学过程,在细胞组成方面涉及到与神经调节相关的纤维以及微管,在分子功能上涉及顺-反异构酶等的活性。这一统计也正进一步验证了这些差异基因在海马中的重要性。

通过对这些差异表达基因进行生物学过程分析发现:主要涉及机械刺激探测、学习或记忆、多糖分解过程、突触传递的调节等生物学过程(表 5)。

表 3 KO 与 WT 小鼠肝脏差异基因的 KEGG 通路

Tab. 3 KEGG pathway of the liver differentially expressed genes in KO and WT

KEGG 通路 KEGG pathway	基因数目 Number of genes	P-值 P-value	Benjamini 值 Benjamini-value
药物代谢 Drug metabolism	14	1.0E-11	1.0E-9
视黄醇代谢 Retinoids metabolism	13	5.6E-11	2.7E-9
细胞色素 P450 外源性代谢 Cytochrome P450 exogenous metabolism	12	7.3E-10	2.3E-8
花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism	8	1.1E-4	2.6E-3
亚油酸代谢 Linoleic acid metabolism	6	3.4E-4	6.6E-3

注: Fisher 检验, $P < 0.001$; Benjamini-Hochberg 校正, $P < 0.01$ 。

Note: Fisher's exact test, $P < 0.001$; Benjamini-Hochberg corrected, $P < 0.01$.

表 4 KO 与 WT 小鼠海马差异基因的变化趋势

Tab. 4 Variation tendency of the Hippocampus differentially expressed genes in KO and WT

名称 Name	GO 本体分析 GO analysis	基因上调个数 Number of decreasing genes	基因下调个数 Number of increasing genes
生物学过程 Biological process	机械刺激探测	1	3
	学习或记忆	4	3
	多糖分解过程	3	1
	突触传递的调节	5	2
	神经冲动传送的调节	4	3
	细胞蛋白复合体装配	4	3
	几丁质分解代谢过程	2	1
细胞组成 cellular component	行为	8	7
	细胞投射	9	14
	内质网	13	14
	肌原纤维	3	4
	收缩性纤维	2	5
	外源性膜	10	9
	Z 椎间盘	3	2
分子功能 molecular function	质膜	28	42
	微管相关的复合物	3	3
	离子束缚作用	50	49
	ATPase 活性	8	6
	金属肽酶活性	6	5
	阳离子结合作用	45	50
	顺-反异构酶活性	2	3
	金属离子结合活性	43	48
	几丁质酶活性	2	1

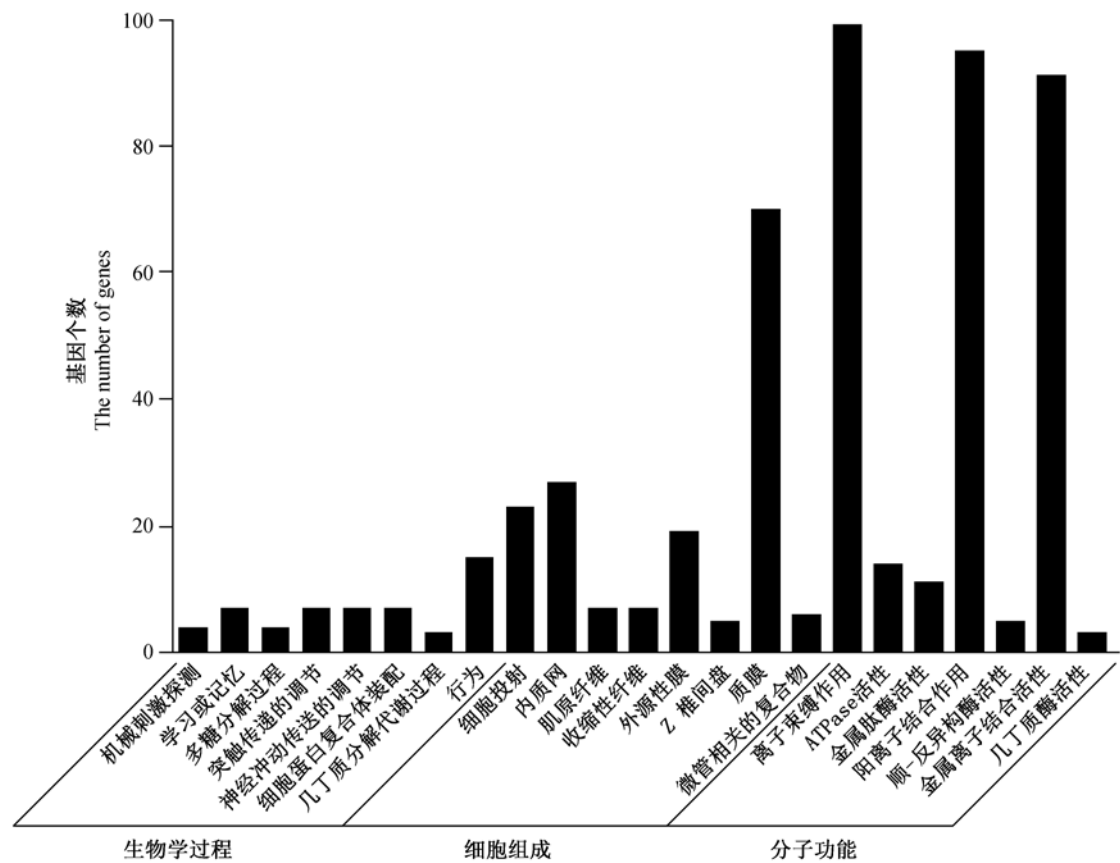


图 2 KO 与 WT 小鼠海马差异基因 GO 本体分析

Fig. 2 GO analysis of the Hippocampus differentially expressed genes in KO and WT

表 5 WT 与 *Fkbp51*KO 小鼠海马差异基因的生物学过程

Tab. 5 Biological process of the hippocampus differentially expressed genes in KO and WT

生物进程 Biological process	基因数目 Number of genes	基因名称 Name of genes	P-值 P-value	Benjamini 值 Benjamini-value
机械刺激探测 Mechanical stimulation to detect	4	<i>Atp2b2</i> 、 <i>Sox2</i> 、 <i>Grin2b</i> 、 <i>Phk1</i>	3. 2E-3	9. 9E-1
学习或记忆 Learning and memory	7	<i>Hmgcr</i> 、 <i>Drd5</i> 、 <i>Bdnf</i> 、 <i>park2</i> 、 <i>Slc11a2</i> 、 <i>Grm4</i> 、 <i>Slc11a2</i>	5. 2E-3	9. 8E-1
多糖分解过程 Polysaccharide decomposition	4	<i>Chi3l1</i> 、 <i>Chia</i> 、 <i>Pygm</i> 、 <i>Ovgp1</i>	5. 9E-3	9. 5E-1
突触传递的调节 The regulation of synaptic transmission	7	<i>Atp2b2</i> 、 <i>park2</i> 、 <i>Bdnf</i> 、 <i>Drd5</i> 、 <i>Gria2</i> 、 <i>Gria2b</i> 、 <i>ppp3ca</i>	9. 1E-3	9. 7E-1

注: Fisher 检验, $P < 0.001$ 。
Note: Fisher's exact test, $P < 0.001$.

表 6 WT 与 *Fkbp51*KO 小鼠海马差异基因的 KEGG 通路

Tab. 6 Biological process of the hippocampus differentially expressed genes in KO and WT

KEGG 通路 KEGG pathway	基因数目 Number of genes	P-值 P-value	Benjamini 值 Benjamini-value
PPAR 信号通路	7	2. 4E-3	2. 2E-1
肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (ALS)	4	7. 7E-2	9. 8E-1
轴突导向通路	6	7. 8E-2	9. 4E-1
神经配体-受体相互作用通路	9	8. 3E-2	8. 9E-1

注: Fisher 检验, $P < 0.001$ 。
Note: Fisher's exact test, $P < 0.001$.

2.2.2 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠海马差异表达基因的 KEGG 通路分析

同时 DAVID 在线工具对上述差异基因进行 KEGG 通路分析发现,这些差异基因主要参与 PPAR 信号通路、肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)、轴突导向通路、神经配体-受体相互作用通路等信号通路(表 6)。

2.3 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠肝脏与海马共差异表达基因的分析

2.3.1 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠肝脏与海马共差异表达基因的筛选

通过 BRB-ArrayTools 工具对两样本分类比较后一共找出 11 个共差异表达基因(图 3),其中 *Abca3*、*Cela1*、*Fkbp5*、*Glo1*、*Hmgcs2*、*Insig1*、*Per3*、*Usp2* 在肝脏与海马中的变化趋势相同,而 *Cml1*、*Dbp*、*Gstm6* 变化趋势相反,具体见表 7。

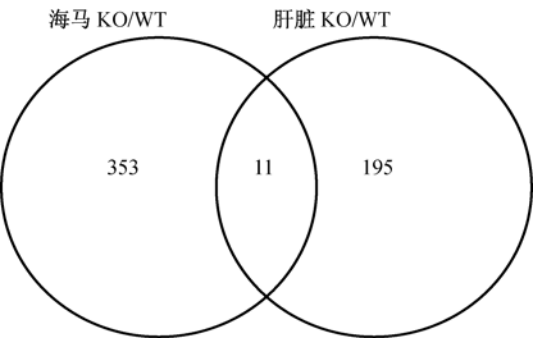


图 3 海马与肝脏共差异表达基因
Fig.3 Coexpression analysis of liver and hippocampus differentially expressed genes

表 7 KO 与 WT 小鼠肝脏与海马差异基因
Tab.7 Liver and hippocampus differentially expressed genes differentially expressed genes in KO and WT

序号 Number	基因名称 Name of genes	KO/WT 倍数 (肝脏) KO/WTmultiple (liver)	KO/WT 倍数 (海马) KO/WTmultiple (hippocampus)
1	<i>Abca3</i>	4.4964 ↑	1.1996 ↑
2	<i>Cela1</i>	4.3763 ↑	2.0984 ↑
3	<i>Cml1</i>	3.4376 ↑	0.6860 ↓
4	<i>Dbp</i>	31.4498 ↑	0.9561 ↓
5	<i>Fkbp5</i>	0.0180 ↓	0.1159 ↓
6	<i>Glo1</i>	2.5599 ↑	2.0965 ↑
7	<i>Gstm6</i>	2.5472 ↑	0.6540 ↓
8	<i>Hmgcs2</i>	0.4022 ↓	0.4807 ↓
9	<i>Insig1</i>	3.2643 ↑	1.3971 ↑
10	<i>Per3</i>	10.4440 ↑	1.2905 ↑
11	<i>Usp2</i>	4.9330 ↑	1.2301 ↑

2.3.2 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠肝脏与海马共差异表达基因的蛋白网络互作分析

通过 STRING 在线工具对 11 个差异表达基因编码的蛋白进行蛋白-蛋白相互作用网络分析(图 4-左),发现 PER3、DBP 与 USP2 之间存在相互作用关系,HMGCS2 与 INSIG1 之间存在互作关系,而其他蛋白之间无网络关系。进一步的网络互作分析发现, *Fkbp51* 通过 HSP90AA1、CSNK1E 与 PER3、USP2、DBP、PER1、PER2、CLOCK、CRY1、CRY2、ARNT1 形成相互作用的网络,而 HMGCS2、INSIG1 与 SREBF2、SCAP 形成网络关系(图 4-右、表 8)。HSP90AA1、CSNK1E、PER1、PER2、CLOCK、CRY1、CRY2、ARNT1、SREBF2 以及 SCAP 虽然未出现在我们的测序数据里,但是为我们研究这些共差异蛋白在脂类代谢与神经调节中的作用提供了一个明确的思路,具有非常重要的意义。

表 8 肝脏与海马共差异表达基因的可能作用基因
Tab.8 The probably interaction genes of liver and hippocampus differentially coexpressed genes

序号 Number	基因名称 Name of genes	基因注释 Gene annotation
1	<i>Cry1</i>	隐色素生物钟蛋白 1;黄素腺嘌呤二核苷酸结合蛋白
2	<i>Cry2</i>	隐色素生物钟蛋白 2;黄素腺嘌呤二核苷酸结合蛋白
3	<i>Clock</i>	生理运动输出周期;ARNTL / 2-CLOCK 异质二聚体激活 E-box 元素
4	<i>Arntl</i>	芳基碳氢化合物受体核转运蛋白;ARNTL-CLOCK 异质二聚体激活 E-box
5	<i>Per1</i>	生物钟蛋白 1;生物钟的组成部分
6	<i>Per2</i>	生物钟蛋白 2;生物钟的组成部分
7	<i>Scap</i>	SREBP 伴侣蛋白;调节胆固醇以及脂质体内平衡
8	<i>Srebf2</i>	甾体调节元件结合因子 2;脂类代谢所需的转录因子
9	<i>Csnk1e</i>	酪蛋白激酶 1e
10	<i>Hsp90aa1</i>	热休克蛋白 90aa1

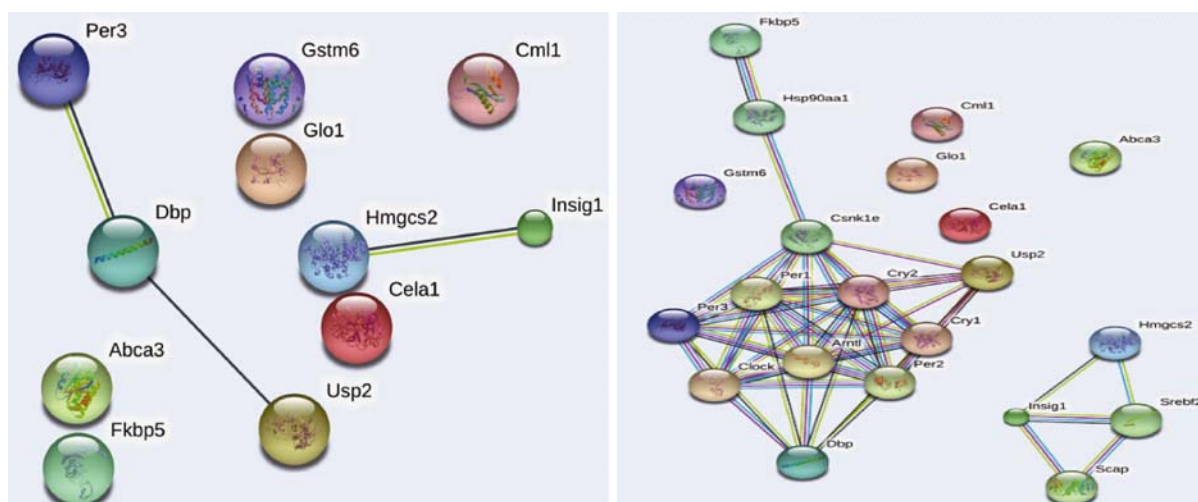


图 4 肝脏与海马共差异表达基因蛋白互作网络图

Fig. 4 Protein-protein interaction network of the differentially expressed genes

3 讨论

Fkbp51 在代谢与神经中的具体作用机制目前仍不清楚,其作用机制可能涉及多个方面,这是一个多基因、多途径、多步骤、多信号通路相互作用和相互影响的过程。因此,研究 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠的肝脏与海马 RNA-seq,对于从分子水平揭示 *Fkbp51* 在生物体内的作用是一个重要的突破口。

首先,对 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠的肝脏数据进行挖掘,共筛选出 206 个差异表达基因。通过进一步的 GO 本体和 KEGG 通路分析,我们发现这些差异表达基因主要参与类固醇生物合成与代谢、脂类代谢、药物代谢通路、视黄醇代谢通路、细胞色素 P450 外源性代谢通路、花生四烯酸以及亚油酸代谢通路等分子生物过程及信号通路。而 *Akr1c*、*Hsd3b*、*Sc4molL* 和 *Fdps* 几乎参与上述所有过程。研究报告:*Akr1c* 编码酮类还原酶家族,此家族包含 40 种已知的酶。这些酶利用 NADH/NADPH 催化醛与酮之间的转换;*Hsd3b* 编码的蛋白为一种双功能酶,在类固醇的所有生物合成阶段发挥重要作用;*Sc4molL* 编码甲基固醇单加氧酶,位于内质网膜,在内源性胆固醇合成中扮演重要角色;而 *Fdps* 编码法尼基焦磷酸合酶,可以催化合成香叶基焦磷酸酯和法尼基焦磷酸酯,而法尼基焦磷酸酯是胆固醇和甾醇生物合成过程中重要的中间物质。因此深入研究 *Fkbp51* 与这些基因之间的关系,对于探究 *Fkbp51* 在脂代谢中的作用具有重要意义。

然后,对 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠的海马数据进行挖掘,共筛选出 364 个差异表达基因。这些差异基因主要参与机械刺激探测、学习或记忆、多糖分

解过程、突触传递的调节等生物学过程以及 PPAR 信号通路、肌萎缩性脊髓侧索硬化症 (ALS)、轴突导向通路、神经配体-受体相互作用通路等信号通路。同时我们对这些差异表达基因进行蛋白-蛋白相互作用网络分析发现泛素蛋白 C (Ubiquitin C, UBC) 居于网络中心,我们通过文献检索发现 UBC 与蛋白降解、DNA 修复、细胞周期调控、激酶修饰以及细胞内吞作用均有关,且该蛋白参与 PI-3K 级联反应。

最后,在肝脏与海马的共差异表达分析中,我们发现 HMGCS2 与 INSIG1 存在互作关系。*Hmgcs2* 编码 3-羟基-3 甲基戊二酰辅酶 A 合酶 2,是一种线粒体酶,催化生酮反应的第一步反应,主要在碳水化合物缺失 (比如禁食) 时发挥作用,研究显示野生型小鼠体重减轻时,此蛋白表达量也随之降低。*Insig1* 是胰岛素诱发基因 1,编码内质网膜蛋白,研究发现此蛋白具有促进胆固醇合成和抑制脂类生成的作用。进一步分析发现,SCAP 和 SREBF2 也参与此互作关系。*Srebf2* 是固醇调节元件结合因子 2,调节低密度脂蛋白、胆固醇和脂肪酸的转录,维持脂类稳态。SCAP 是 SREBP 的伴侣蛋白,在高胆固醇和氧甾醇密集时,SREBP-SCAP 复合物通过内质网保留蛋白 INSIG1 的作用滞留在内质网上;而在低胆固醇时,SREBP-SCAP 复合物离开内质网进入细胞核激活靶基因的转录,进而促进固醇、脂肪酸以及甘油三酯等物质的合成^[15]。在 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠的测序数据中,我们发现 KO 与 WT 小鼠相比,其 HMGCS2 表达量下降,而 INSIG1 表达量升高,这些均提示敲除 *Fkbp51* 基因可能通过这些基因调节脂类合成和代谢^[16]。

从共差异表达蛋白网络互作图中,我们还发现

USP2 与 PER、CRY、DBP 等蛋白存在相互作用。*Usp2* 基因编码泛素特异性肽酶 2, 具有去泛素化作用, 主要靶蛋白为脂肪酸合成酶、小鼠双微粒 2 (MDM2) 以及细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1), 并且在肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和核因子 κ B (NF- κ B) 信号通路中发挥重要作用。其中 *Mdm2* 是肿瘤抑制基因 *P53* 的负性调节因子, 而细胞周期蛋白 D1 在细胞周期 G1/S 转换中发挥重要作用。*Dbp* 基因编码白蛋白启动子 D 位点结合蛋白, 可结合白蛋白、*Cyp2a4* 和 *Cyp2a5* 等基因的启动子区, 此外还能够调节与生物节律相关的基因的表达。而 *Per3* 基因编码的蛋白属于生物钟节律蛋白, 是自发活动、代谢、行为的生物周期节律的蛋白组件, 主要参与生物节律通路。CLOCK/ARNTL 异二聚体可以上调该蛋白, 而 PER/CRY 异二聚体可以通过结合 CLOCK/ARNTL 进而抑制其上调作用。在代谢方面有研究报道, 小鼠肝脏中的 USP2A 可以通过促进 CRY1 去泛素化来增加其稳定性, 以此来对抗炎症反应, 而这一稳定性的维持则是通过抑制 *Per2* 启动子活性实现的。有趣的是, 促炎症因子、TNF- α 可以使 CRY1 蛋白表达水平增加并抑制与生物钟相关的基因表达^[17]。在神经方面研究报道称, USP2 的去泛素化作用与生物节律蛋白密切相关, 在低光照强度下 *Usp2*^{-/-} 小鼠比 WT 小鼠的相位延迟明显提高。最近的流行病学研究显示: 生物节律的混乱会造成代谢上的紊乱^[17-18]。在我们的测序数据中, USP2、PER 与 DBP 蛋白在肝脏与海马中的变化正是说明代谢调节与神经调节是紧密联系的。

本研究通过对 *Fkbp51*KO 与 WT 小鼠的肝脏与海马 RNA-Seq 数据分析后, 发现 *Fkbp51* 在脂类代谢和神经调节中的作用既是相互独立又是相互联系的, 也为下一步深入研究 *Fkbp51* 基因在脂类代谢和神经调节中作用的分子机制提供了理论基础。未来我们将继续展开工作, 对这些数据分析进行后续分子生物学实验, 以期进一步验证这些分析的可靠性。

参考文献:

- [1] Zannas A S, Wiechmann T, Gassen N C, et al. Gene-Stress-Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications[J]. Neuropsychopharmacology, 2015, 16(2): 33-42.
- [2] Vegiopoulos A, Herzig S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases[J]. Mol Cell Endocrinol, 2007, 275(1-2): 43-61.
- [3] Sapolsky R M, Romero L M, Munck A U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions[J]. Endocr Rev, 2000, 21(1): 55-89.
- [4] Hubler T R, Scammell J G. Intronic hormone response elements mediate regulation of FKBP5 by progestins and glucocorticoids[J]. Cell Stress Chaperones, 2004, 9(3): 243-252.
- [5] U M, Shen L, Oshida T, et al. Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor[J]. Leukemia, 2004, 18(11): 1850-1856.
- [6] Paakinaho V, Makkonen H, Jaaskelainen T, et al. Glucocorticoid receptor activates poised FKBP51 locus through long-distance interactions[J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(3): 511-525.
- [7] Toneatto J, Guber S, Charo N L, et al. Dynamic mitochondrial-nuclear redistribution of the immunophilin FKBP51 is regulated by the PKA signaling pathway to control gene expression during adipocyte differentiation[J]. J Cell Sci, 2013, 126(Pt 23): 5357-5368.
- [8] Stechschulte L A, Hinds T J, Khuder S S, et al. FKBP51 controls cellular adipogenesis through p38 kinase-mediated phosphorylation of GR α and PPAR γ [J]. Mol Endocrinol, 2014, 28(8): 1265-1275.
- [9] 张曼, 邱彬, 曹勇, 等. 伴侣蛋白 FKBP51 在高脂诱导肥胖中的作用[J]. 中国比较医学杂志, 2015(07): 53-58.
- [10] Ratajczak T, Cluning C, Ward B K. Steroid Receptor-Associated Immunophilins: A Gateway to Steroid Signalling [J]. Clin Biochem Rev, 2015, 36(2): 31-52.
- [11] de Kloet E R, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease[J]. Nat Rev Neurosci, 2005, 6(6): 463-475.
- [12] Binder E B, Salyakina D, Lichtner P, et al. Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment[J]. Nat Genet, 2004, 36(12): 1319-1325.
- [13] Binder E B. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders[J]. Psychoneuroendocrinology, 2009, 34 Suppl 1: S186-S195.
- [14] Ratajczak T, Cluning C, Ward B K. Steroid Receptor-Associated Immunophilins: A Gateway to Steroid Signalling [J]. Clin Biochem Rev, 2015, 36(2): 31-52.
- [15] Zheng W, Reem R E, Omarova S, et al. Spatial distribution of the pathways of cholesterol homeostasis in human retina[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37926.
- [16] Gao J, He J, Zhai Y, et al. The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity[J]. J Biol Chem, 2009, 284(38): 25984-25992.
- [17] Tong X, Buelow K, Guha A, et al. USP2a protein deubiquitinates and stabilizes the circadian protein CRY1 in response to inflammatory signals[J]. J Biol Chem, 2012, 287(30): 25280-25291.
- [18] Shimba S. The roles of clock genes in obesity[J]. Nihon Rinsho, 2013, 71(2): 244-248.

[修回日期]2016-01-10