

# 雄激素缺乏对高脂高胆固醇饲喂小型猪肝 mRNA 可变剪接的影响

蔡兆伟\*, 吕建敏, 凌云, 黄俊杰, 刘军平, 潘永明

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究所, 杭州 310053)

**【摘要】目的** 通过分析高脂高胆固醇饲喂的不去势 (SHAM)、去势 (CAS) 和去势 + 睾酮处理 (CAS + T) 小型猪肝表达谱, 探讨雄激素缺乏对高脂高胆固醇饲喂小型猪肝 mRNA 可变剪接 (alternative splicing, AS) 的影响。**方法** 利用转录组测序 (RNA-Seq) 技术对 SHAM、CAS 和 CAS + T 小型猪肝表达谱进行测序, 使用 TopHat 软件筛选三组小型猪肝中差异 AS 基因, 并对三组样本中共有的差异 AS 基因进行基因注释和代谢通路富集分析。**结果** (1) 去势和睾酮处理能够引起高脂高胆固醇饲喂小型猪肝 mRNA 可变剪接发生变化; (2) SHAM vs. CAS 和 CAS + T vs. CAS 之间有 113 个共有差异 AS 基因, 其中包括 AGPAT6、NR1H4、PPARD 和 GK 等糖脂代谢有关基因; (3) GO 和 KEGG 分析结果表明, 上述 113 个差异 AS 基因主要参与脂肪酸代谢、甘油酯代谢、葡萄糖反应以及脂肪细胞因子信号等生物学过程和通路。**结论** 雄激素缺乏可导致高脂高胆固醇饲喂小型猪肝 mRNA 可变剪接发生改变, 并且可能通过调控肝糖脂代谢进而影响高脂诱导的脂肪肝发病。

**【关键词】** 雄激素; 小型猪; 脂肪肝; 可变剪接; 糖脂代谢

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 04-0424-07

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.04.003

## Testosterone deficiency regulates mRNA alternative splicing in the liver of miniature pigs fed a high-fat and high-cholesterol diet

CAI Zhaowei\*, LYU Jianmin, LING Yun, HUANG Junjie, LIU Junping, PAN Yongming

(Laboratory Animal Research Center/Institute of Comparative Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Corresponding author: CAI Zhaowei. E-mail: zwcai@zcmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** The aim of this study was to explore the effect of testosterone deficiency on mRNA alternative splicing in the liver of miniature pigs fed a high-fat and high-cholesterol diet (HFC). **Methods** RNA-Seq analysis was employed to characterize the global transcriptome changes in the liver of intact male pigs (SHAM), castrated male pigs (CAS) and castrated male pigs with testosterone treatment (CAS + T). TopHat was used to identify the testosterone-regulated alternative splicing (AS) events. After being annotated, Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were further performed for the identified common differentially expressed AS genes between the three groups. **Results** 1) Castration and testosterone treatment introduced new mRNA alternative splicing events in the liver of miniature pigs fed a HFC. 2) There were 113 common differentially expressed AS genes between SHAM vs. CAS and CAS + T vs. CAS groups, which including many lipid and glucose metabolism-related genes, i. e., AGPAT6, NR1H4, PPARD and GK. 3) According to the GO and KEGG

**【基金项目】** 浙江省自然科学基金项目 (No. LY18C040003); 国家自然科学基金项目 (No. 31200921)。

Funded by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (No. LY18C040003), National Natural Science Foundation of China (No. 31200921).

**【通信作者】** 蔡兆伟 (1983—), 男, 副研究员, 研究方向为动物分子遗传。E-mail: zwcai@zcmu.edu.cn

analysis, the 113 genes mainly enriched in fatty acid metabolic process, glycerolipid metabolism, responded to glucose and adipocytokine signaling pathway. **Conclusions** Testosterone deficiency affects mRNA alternative splicing in the liver of miniature pigs fed a HFC. Moreover, testosterone deficiency may promote diet-induced fatty liver disease through regulating the alternative splicing of genes involved in lipid and glucose metabolism. Further study is needed to explore the relationship between testosterone and the AS genes and their new transcripts.

**[Key words]** testosterone; miniature pigs; fatty liver; alternative splicing; lipid and glucose metabolism

**Conflict of interest statement:** We declare that we have no conflict of interest statement.

肝是人体最重要的代谢器官,负责体内糖类、脂类和蛋白质等众多物质的代谢,对维持整个机体的能量平衡具有重要作用,肝代谢紊乱会导致包括肥胖、糖尿病和非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)等多种疾病的发生<sup>[1]</sup>。雄性激素(主要是睾酮)作为一种固醇激素,其作用不仅局限于生殖系统,在肝糖脂代谢和胰岛素敏感性等方面也起着非常重要的作用。最近发现,雄激素缺乏会加重高脂饮食诱导的小鼠糖脂代谢紊乱并导致 NAFLD 的发生<sup>[2]</sup>,而睾酮处理可调控高脂饮食小鼠肝葡萄糖吸收和脂质生成相关基因的表达来改善 NAFLD<sup>[3]</sup>。我们前期研究也发现,去势不仅加速高脂高胆固醇诱导的小型猪血脂代谢紊乱,还促进脂质在肝内大量沉积<sup>[4]</sup>。尽管以往的研究证实雄激素在肝代谢紊乱过程中发挥重要作用,但雄激素缺乏引起 NAFLD 发病的机制至今仍不明确。

可变剪接(alternative splicing, AS)是基因的 mRNA 前体通过不同的剪接方式产生多种 mRNA 成熟体的过程,广泛存在于真核生物基因的转录过程中,是真核生物基因表达调控的方式,也是产生蛋白质功能多样性的主要途径。异常的可变剪接可导致多种疾病,如肌萎缩侧索硬化症、扩张性心肌病、阿尔兹海默病和癌症等<sup>[5]</sup>。最近许多研究表明,可变剪接在 NAFLD 发病过程中也发挥重要作用。胆汁酸受体(FXR/NR1H4)存在 4 种可变剪接体(FXR $\alpha$ 1-4),其中  $\alpha$ 1 和  $\alpha$ 2 型 FXR 最近被证实能够减少肝细胞脂质沉积并改善胰岛素抵抗<sup>[6]</sup>。Krüppel 样因子 6 (KLF6) 基因的新可变剪接体(KLF6-SV1)在 NAFLD 肝细胞中表达增高,并通过负调控葡萄糖激酶(GCK)活性参与小鼠 NAFLD 过程<sup>[7]</sup>,另外,酰基辅酶 A 脱氢酶 8 (ACAD8) 基因内含子 1 突变会引起异常剪接,而携带这种点突变的小鼠肝线粒体功能紊乱,容易发生脂肪肝<sup>[8]</sup>。这些研究证实,基因可变剪接对 NAFLD 发病具有重要作用。

鉴于雄激素缺乏在 NAFLD 发病中的作用以及已有可变剪接和 NAFLD 相关性的报道,本研究应用转录组测序(RNA-Seq)技术来检测高脂高胆固醇饲料的不去势、去势和去势+睾酮处理小型猪肝组织基因可变剪接事件,分析各组样本间发生的差异 AS 基因,并着重分析三组样本间的共有 AS 基因及其参与的生物学过程和信号通路,为探讨雄激素缺乏促进高脂诱导小型猪肝脂质沉积和脂肪肝发病的机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

18 只普通级雄性五指山小型猪,体重(11.72 ± 0.38)kg,6 ~ 7 月龄,购自广东大华农动物保健品股份有限公司【SCXK(粤)2013-0022】,饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心【SYXK(浙)2013-0183】,环境温度(22 ± 1)℃,相对湿度 40% ~ 65%,自由饮水,12 h/12 h 明暗交替。所有小型猪经适应性饲养 4 周后,开始正式试验。手术去势是在无菌和麻醉环境下将小型猪阴囊处切口后去除睾丸,不去势组小型猪进行伪手术处理,去势+睾酮组小型猪是在去势小型猪后腿外侧肌肉注射丙酸睾酮注射液(10 mg/kg 体重),每周一次,具体实验方案见文献<sup>[4]</sup>。

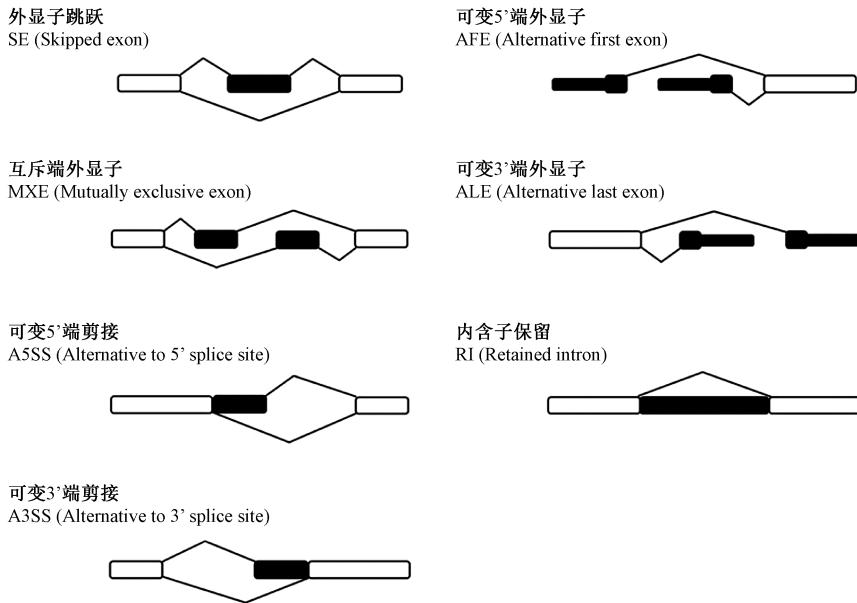
### 1.2 样品采集和转录组测序

所有小型猪在高脂高胆固醇饲料 12 周结束时处死,采集其肝组织样本并置入液氮中速冻,随后保存在 -80℃ 备用。分别选取 3 只不去势组(SHAM)、去势组(CAS)和去势+睾酮组(CAS+T)小型猪,提取肝组织总 RNA,采用安基伦 2100 生物分析仪(Agilent, 美国)和 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, 美国)检测所提 RNA 的质量。待样品检测合格后,分别将每组 3 个个体的 RNA 样品等量混合,构建 cDNA 测序文库,使用 Illumina HiSeq 2000 测序平台进行高通量测序,测序读长为 2 × 100 bp。

### 1.3 可变剪接位点鉴定

将测序得到原始数据去除低质量、污染序列和接头后,三个样本(SHAM、CAS 和 CAS + T)分别获得 4.06 G、4.54 G 和 3.23 G 可用于注释分析的序列片段(clean reads),本文仅使用这些 clean reads 鉴定可变剪接事件,分析去势和睾酮处理对高脂高胆固醇饲喂小型猪肝基因可变剪接的影响。首先从数据库中下载猪的全基因组序列及相关注释文件(ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-74/fasta/sus\_scrofa/dna/),然后采用 TopHat 软件将上述过滤得到的 clean reads 与猪的基因组序列进行比对,再用 Cufflinks 软件对读

段进行组装和注释。在此基础上,使用 ASD 软件(<http://www.novelbio.com/asd/ASD.html>)对每个样品的 AS 事件分别进行分类和统计,分析不同组小型猪肝中发生的差异 AS 位点<sup>[9]</sup>。一般根据 AS 发生的位置将基因可变剪接分为以下 7 种类型,即外显子跳跃(Skipped exon, SE)、互斥外显子(mutually exclusive exon, MXE)、可变 5' 端剪接(alternative to 5' splice site, A5SS)、可变 3' 端剪接(alternative to 3' splice site, A3SS)、可变 5' 端外显子(alternative first exon, AFE)、可变 3' 端外显子(alternative last exon, ALE)和内含子保留(retrained intron, RI)(图 1)。



注:白色框代表侧翼区外显子,黑色框代表选择性可变剪接外显子/区域、黑线代表拼接连接。

图 1 可变剪接事件分类示意图

Note. White boxes, flanking constitutive exons. Black boxes, alternative spliced exons/regions. Solid lines, splice junctions supporting the exclusion or inclusion isoform.

Figure 1 Schematic diagrams of seven main alternative splicing (AS) types

### 1.4 差异可变剪接基因的 GO 功能和 KEGG 通路分析

我们采用 Venny 在线软件(<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)比较三组小型猪肝差异 AS 转录本,统计三组样本中发生的共有可变剪接基因的数量。利用 GO 数据库和 KEGG 数据库对筛选出的共有可变剪接基因进行 GO 和信号通路富集分析,采用 Fisher 精确检验和卡方检验计算 GO 和 Pathway 的 P 值,并用 FDR(false discovery ratio)方法校正 P 值,以校正后  $P < 0.05$  表示有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 可变剪接方式位点分析

我们采用 TopHat 软件对 SHAM、CAS 和 CAS + T 样本转录本的可变剪接位点进行了统计(表 1),由表 1 可见,SHAM vs. CAS 共发生 22299 个 AS 事件,其中 471 个 AS 具有显著意义(adjust  $P$  value  $< 0.05$ ),在这些显著的 AS 中,发生频率最高的为外显子跳跃型即 SE 型,有 201 个,其余分别是 MXE (28 个)、A5SS (56 个)、A3SS (64 个)、AFE (87 个)、ALE (29 个)和 RI (6 个);CAS + T vs. CAS 共发生 21320 个 AS 事件,其中 472 个 AS 具有显著意义,发生数最高的也是 SE 型,有 191 个。

表 1 小型猪肝组织可变剪接统计

Table 1 Summary of the different alternative splicing (AS) events identified in the livers of miniature pigs

类型 (Types)	不去势 vs. 去势 SHAM vs. CAS		去势 + 睾酮 vs. 去势 CAS + T vs. CAS	
	可变剪接 AS events	差异可变剪接 Differential AS events	可变剪接 AS events	差异可变剪接 Differential AS events
	外显子跳跃型 Skipped exon (SE)	7119	201	6252
互斥外显子 Mutually exclusive exon (MXE)	520	28	938	25
可变的 5' 剪接位点 Alternative to 5' splice site (A5SS)	2967	56	2996	58
可变的 3' 剪接位点 Alternative to 3' splice site (A3SS)	4156	64	4068	61
可变 5' 外显子 Alternative first exon (AFE)	5276	87	5212	88
可变 3' 外显子 Alternative last exon (ALE)	1631	29	1672	35
内含子保留 Retained intron (RI)	630	6	610	14
总共 Total	22299	471	21748	472

2.2 共有差异可变剪接基因分析

通过基因注释我们得到, SHAM vs. CAS 和 CAS + T vs. CAS 之间的差异 AS 基因分别为 471 和 470 个, 我们进一步将两组差异 AS 基因取交集, 结果发现 SHAM vs. CAS 和 CAS + T vs. CAS 之间共有的差异 AS 基因有 113 个(图 2), 提示这些发生 AS 的基因可能在雄激素调控高脂诱导的小型猪肝代谢过程中起重要作用。

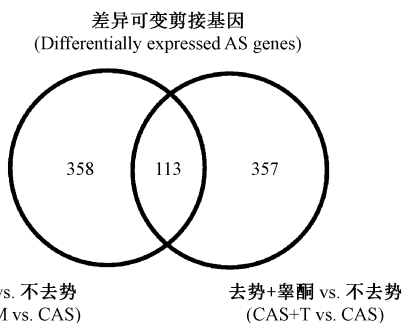


图 2 三组小型猪共有差异可变剪接基因

Figure 2 The common differentially alternative spliced genes between the three groups of miniature pigs

通过基因注释发现, 这 113 个基因中许多基因都和糖脂代谢有关。例如, 发生 SE 型的血小板

活化因子乙酰水解酶(PAFAH2)、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\delta$ (PPARD)、葡萄糖激酶(GK)和肉毒碱 O - 乙酰基转移酶(CRAT); 发生 AFE 型的磷酸甘油酰基转移酶 6 (AGPAT6)、胆汁酸受体(FXR/NR1H4)和水解酶 3 (ABHD3)。上述结果说明, 去势和睾酮处理能够导致高脂高胆固醇饲喂小型猪肝中糖脂代谢相关基因的可变剪接方式发生改变(见表 2)。

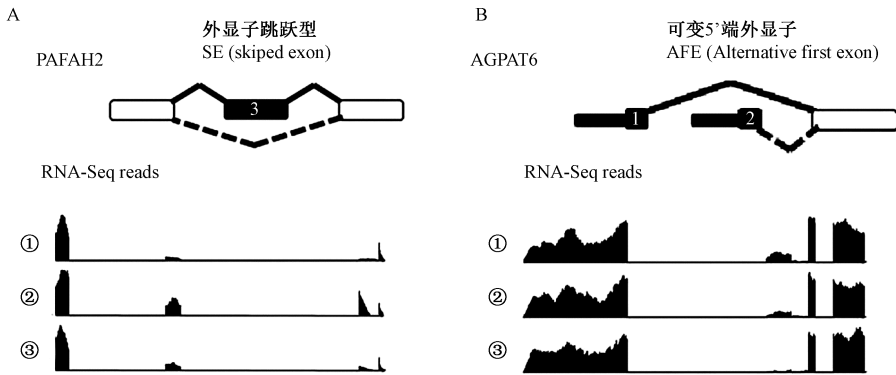
为更直观的观察去势和睾酮处理对高脂高胆固醇饲喂小型猪肝基因可变剪接的影响, 我们选择其中 PAFAH2 和 AGPAT6 两个基因, 并采用可视化的方式展示了它们在三组小型猪肝中的可变剪接类型及其相应的表达丰度(图 3)。

2.3 差异可变剪接基因 GO 功能注释和 KEGG 代谢通路分析

为了研究上述发生 AS 的基因的功能, 我们对这 113 个共有可变剪接基因进行了 GO 注功能释分析(表 3)。结果表明, 这些基因主要富集到负调控神经元死亡、蛋白酶活性激活、磷酸化信号转导、脂质代谢过程、脂肪酸代谢过程、细胞脂质代谢过程、葡萄糖反应、小分子代谢过程和负调控 RNA 聚合酶 II 启动子转录等生物学过程。

**表 2** 共有可变剪接基因示例  
**Table 2** Examples of the common alternative spliced genes identified in the three groups of miniature pigs

基因名称 Gene ID	注释 Description	可变剪接类型 AS Types
ABHD3	Abhydrolase domain-containing protein 3	AFE
AGPAT6	Glycerol - 3-phosphate acyltransferase 4	AFE
CRAT	carnitine O-acetyltransferase	SE
FAXDC2	Fatty acid hydroxylase domain-containing protein 2	AFE
GK	Glycerol kinase	SE
NR1H4	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	AFE
PAFAH2	platelet-activating factor acetylhydrolase 2	SE
PPARD	Peroxisome proliferative activated receptor delta	SE



注: A. PAFAH2 基因外显子跳跃型可变剪接模式示意图; B. AGPAT6 基因可变 5' 外显子型可变剪接模式示意图。黑色框代表选择性可变剪接外显子/区域, 白色框侧翼区外显子, 黑线代表拼接连接。①: 不去势组小型猪 (SHAM); ②: 去势组小型猪 (CAS); ③: 去势 + 睾酮组小型猪 (CAS + T)。

**图 3** 三组小型猪肝 PAFAH2 和 AGPAT6 基因可变剪接方式

Note. A. Schematic diagram of the SE for PAFAH2; B. Schematic diagram of the AFE for AGPAT6; White boxes, flanking constitutive exons; black boxes, alternative spliced exons/regions; solid lines, splice junctions supporting the exclusion or inclusion isoform. ①: Sham-operated (SHAM); ②: Castration (CAS); ③: Castration with testosterone treatment (CAS + T).

**Figure 3** Alternative splicing events of PAFAH2 and AGPAT6 in the livers of three groups of miniature pigs

为研究这些基因参与的代谢通路, 我们进一步做了 KEGG 通路分析 (表 4)。从表中可以看出, 上述共有可变剪接的基因富集的信号通路主要包括脂肪细胞因子信号通路、维他命的消化和吸收、甘油酯代谢和花生四烯酸代谢等。其中, 富集在脂肪细胞因子信号通路上的基因有 B 细胞编码  $\kappa$  轻链

多肽抑制基因 (IKBKG)、腺苷单磷酸活化蛋白激酶  $\gamma 2$  (PRKAG2) 和肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (TRAF2), 它们主要参与调节免疫、炎症和细胞存活等; 富集在甘油酯代谢信号通路上的基因包括 AGPAT6 和 GK, 主要参与三酰甘油合成和糖代谢的调节。

**表 3** 共有可变剪接基因 GO 分析

**Table 3** GO annotations of the common alternative spliced genes in the three groups of miniature pigs

名称 Category	P 值 P-Value
负调节神经元死亡 Negative regulation of neuron death	0.000 591 7
JNK 级联 JNK cascade	0.000 694 6
蛋白酶活性激活 Activation of protein kinase activity	0.001 551 9
磷酸化信号转导 Signal transduction by phosphorylation	0.001 738 5
脂质代谢过程 Lipid metabolic process	0.001 781 5
RNA 聚合酶 II 启动子转录起始 Transcription initiation from RNA polymerase II promoter	0.002 786 7
脂肪酸代谢过程 Fatty acid metabolic process	0.002 973 5
细胞脂质代谢过程 Cellular lipid metabolic process	0.003 879 2
葡萄糖反应 Response to glucose	0.004 061 9
小分子代谢过程 Small molecule metabolic process	0.005 094 4
蛋白质复合体组装 Protein complex assembly	0.008 422 9
负调控 RNA 聚合酶 II 启动子转录 Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	0.035 822

表 4 共有可变剪接基因 KEGG 分析

Table 4 KEGG pathways of the common alternative spliced genes in the three groups of miniature pigs

KEGG 通路 KEGG pathway	基因 Gene	P 值 P-Value
脂肪细胞因子信号通路 Adipocytokine signaling pathway	IKBK G、PRKAG2、TRAF2	0.003 928 4
维他命的消化和吸收 Vitamin digestion and absorption	SLC19A1、BTD	0.006 693 9
病毒致癌作用 Viral carcinogenesis	IL6ST、IKBK G、TRAF2、SLA - 5	0.010 550 1
单纯疱疹病毒感染 Herpes simplex infection	GTF21、IKBK G、TRAF2、SLA - 5	0.015 055
甘油酯代谢 Glycerolipid metabolism	AGPAT6、GK	0.020 226 6
急性髓性白血病 Acute myeloid leukemia	PPARD、IKBK G	0.034 585 3
花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism	ALOX12、GGT1	0.039 610 3
EB 病毒感染 Epstein-Barr virus infection	IKBK G、TRAF2、SLA - 5	0.043 021 2

### 3 讨论

虽然近年来 NAFLD 的发病率逐年增长,已引起研究者的广泛关注,但其发病机制至今仍未完全阐明。转录组分析是揭示疾病发生发展机制的一个重要手段。以往的转录组分析的结果证实,转录调节异常可能是引起 NAFLD 发病的重要特征,然而这些研究大多只关注转录水平上基因表达的改变,很少从转录后水平探讨 NAFLD 的发病机制。可变剪接是基因转录后调控的重要方式,更是真核生物中普遍存在的现象。为探讨 AS 是否参与雄激素缺乏引起高脂高胆固醇饲喂小型猪 NAFLD 的形成,本研究采用 RNA-Seq 技术分析了高脂高胆固醇饲喂的 SHAM、CAS 和 CAS + T 小型猪肝组织中的可变剪接事件,结果在 SHAM vs. CAS 和 CAS + T vs. CAS 组中分别筛选出 471 和 470 个差异 AS 基因,其中发生频率最高的为 SE 型,这和其他研究发现的结果一致<sup>[9-10]</sup>。另外我们发现,在筛选出来的这些 AS 基因中,许多编码蛋白的转录本存在 2 个及以上的可变剪接,提示高脂高胆固醇饲喂小型猪体内剪接调控模式的复杂性。

我们对各组样本间发生的共有 AS 基因进行了分析,结果发现 SHAM vs. CAS 和 CAS + T vs. CAS 之间存在 113 个共有 AS 基因,其中包括许多与脂质代谢和葡萄糖反应有关的基因,包括 PPARD、CRAT、AGPAT6、NR1H4 和 GK 等。PPARD 是过氧化物酶体增殖物激活型受体家族的一员,与糖脂代谢及胰岛素抵抗密切相关,最近有研究发现其在肝

脂肪酸氧化和 NAFLD 发生过程中也发挥重要调节作用<sup>[11]</sup>。AGPAT6 是三酰甘油合 (TG) 成的关键酶,在决定肝 TG 含量和成分上起重要作用<sup>[12]</sup>。CRAT 是一种线粒体基质蛋白,在脂肪酸  $\beta$  氧化以及糖代谢过程中起到关键作用<sup>[13]</sup>。NR1H4 在胆汁酸合成、糖脂代谢等方面发挥重要作用,其表达异常与 NAFLD 密切相关<sup>[14]</sup>。值得一提的是,最近有研究揭示 NR1H4 和 PPARD 等基因存在 AS 现象<sup>[6,15]</sup>,所以其功能可能影响 NAFLD,今后需要进一步研究上述差异 AS 基因在雄激素缺乏引起的 NAFLD 发病中的作用。本研究结果表明,去势和睾酮处理能够引起高脂高胆固醇饲喂小型猪肝中许多糖脂代谢基因的 AS 发生改变。通过分析,我们发现这些共有 AS 基因主要参与脂肪酸代谢、甘油酯代谢、葡萄糖反应以及脂肪细胞因子信号等生物学过程和通路,进一步证实这些 AS 基因可能在雄激素缺乏引起的 NAFLD 发病过程中起重要作用。

综上所述,通过对高脂高胆固醇饲喂的小型猪肝转录组数据进行分析,我们发现去势小型猪肝存在大量的 AS 事件,并且在所检测到的不同 AS 类型中,SE 型的发生比例最高。通过对这些 AS 基因注释和功能分析发现,这些基因主要参与脂肪酸代谢和葡萄糖反应等生物学过程,表明可 AS 可能在雄激素调控高脂诱导的 NAFLD 发病过程中发挥重要作用,但这些基因的 AS 准确位置以及形成的不同转录本的作用还有待于通过实验进一步证实。

#### 参 考 文 献 (References)

[1] Fabbrini E, Sullivan S, Klein S. Obesity and nonalcoholic fatty

- liver disease; biochemical, metabolic, and clinical implications [J]. *Hepatology*, 2010, 51(2): 679–689.
- [ 2 ] Dubois V, Laurent MR, Jardi F, et al. Androgen deficiency exacerbates high-fat diet-induced metabolic alterations in male mice [J]. *Endocrinology*, 2015, 157(2): 648–665.
- [ 3 ] Kelly DM, Akhtar S, Sellers DJ, et al. Testosterone differentially regulates targets of lipid and glucose metabolism in liver, muscle and adipose tissues of the testicular feminised mouse [J]. *Endocrine*, 2016, 54(2): 504–515.
- [ 4 ] 蔡兆伟,潘永明,陈亮,等. 睾酮缺乏对高脂饮食小型猪血脂和肝内脂质沉积的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(1): 40–44.
- Cai ZW, Pan YM, Chen L, et al. Effects of testosterone deficiency on serum lipid levels and hepatic lipid accumulation in miniature pigs fed a high-fat diet [J]. *Chin J Comp Med*, 2015, 25(1): 40–44.
- [ 5 ] Cieply B, Carstens RP. Functional roles of alternative splicing factors in human disease [J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2015, 6(3): 311–326.
- [ 6 ] Correia JC, Massart J, de Boer JF, et al. Bioenergetic cues shift FXR splicing towards FXR $\alpha$ 2 to modulate hepatic lipolysis and fatty acid metabolism [J]. *Mol Metab*, 2015, 4(12): 891–902.
- [ 7 ] Bechmann LP, Gastaldelli A, Vetter D, et al. Glucokinase links Krüppel-like factor 6 to the regulation of hepatic insulin sensitivity in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2012, 55(4): 1083–1093.
- [ 8 ] Sabbagha NG, Kao HJ, Yang CF, et al. Alternative splicing in *Acad8* resulting a mitochondrial defect and progressive hepatic steatosis in mice [J]. *Pediatr Res*, 2011, 70(1): 31–36.
- [ 9 ] Zhou X, Wu W, Li H, et al. Transcriptome analysis of alternative splicing events regulated by SRSF10 reveals position-dependent splicing modulation [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(6): 4019–4030.
- [ 10 ] Lin L, Park JW, Ramachandran S, et al. Transcriptome sequencing reveals aberrant alternative splicing in Huntington's disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2016, 25(16): 3454–3466.
- [ 11 ] Bojic LA, Telford DE, Fullerton MD, et al. PPAR $\delta$  activation attenuates hepatic steatosis in *Ldlr*<sup>-/-</sup> mice by enhanced fat oxidation, reduced lipogenesis, and improved insulin sensitivity [J]. *J Lipid Res*, 2014, 55(7): 1254–1266.
- [ 12 ] Chen YQ, Kuo MS, Li S, et al. AGPAT6 is a novel microsomal glycerol-3-phosphate acyltransferase [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(15): 10048–10057.
- [ 13 ] Seiler SE, Martin OJ, Noland RC, et al. Obesity and lipid stress inhibit carnitine acetyltransferase activity [J]. *J Lipid Res*, 2014, 55(4): 635–644.
- [ 14 ] Chow MD, Lee YH, Guo GL. The role of bile acids in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Mol Aspects Med*, 2017, 56: 34–44.
- [ 15 ] Lundell K, Thulin P, Hamsten A, et al. Alternative splicing of human peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta): effects on translation efficiency and transactivation ability [J]. *BMC Mol Biol*, 2007, 8(1): 70.

[收稿日期] 2018-03-15