文章编号:1000-5404(2012)05-0415-04

论著

Ⅰ型去乙酰化酶抑制剂MS-275对间充质干细胞C3H/10T1/2成脂分化的影响

李智耀,王奎栋,吴 伟,龚雨琴,季煜华 (510632 广州,暨南大学生命科学技术学院组织移植与免疫研究中心)

[摘要] **目的** 探讨Ⅰ型去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor,HDACi)MS-275对间充质干细胞(mesenchymal stem cells,MSCs)成脂分化的影响。**方法** 利用噻唑蓝(MTT)和碘化乙啶(PI)染色结合流式细胞术(FCM)分别检测不同浓度MS-275对C3H/10T1/2细胞活性和细胞周期的影响;油红O染色分析MS-275对C3H/10T1/2细胞成脂分化能力的影响;同时应用实时定量PCR(real-time PCR)检测MS-275对成脂分化标志物:脂结合蛋白(aP2)、围脂素(perilipin)、脂联素(Adipoq),以及成脂分化关键转录因子:过氧化物酶体增殖物激活受体-γ2(PPAR-γ2)mRNA转录水平的影响。**结果** 随着MS-275浓度升高,其对C3H/10T1/2细胞的抑制率也随着增高,IC_{50}约为8 μmol/L($P<0.05$);流式结果表明,MS-275将C3H/10T1/2细胞周期阻滞在G_0/G_1期;0.5 μmol/L的MS-275明显减少C3H/10T1/2细胞的脂滴积累;同时成脂分化标志物aP2、perilipin、Adipoq及成脂关键转录因子PPAR-γ2的转录水平也显著降低($P<0.05$)。**结论** MS-275减弱了间充质干细胞成脂分化的能力,表明抑制Ⅰ型HDACs的活性可部分抑制MSCs向成脂分化。

[关键词] 间充质干细胞;成脂分化;MS-275;组蛋白去乙酰化酶
[中图法分类号] R329-33;R329.24;R329.26 [文献标志码] A

Class Ⅰ histone deacetylase inhibitor MS-275 inhibits adipogenic differentiation in mesenchymal stem cells C3H/10T1/2

Li Zhiyao, Wang Kuidong, Wu Wei, Gong Yuqin, Ji Yuhua (Institute of Tissue Transplantation and Immunology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou, Guangdong Province, 510632, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of MS-275, a class Ⅰ histone deacetylase inhibitor, on the adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells C3H/10T1/2. **Methods** MTT assay and FCM analysis was used to detect the effect of MS-275 on cell viability and cell cycle of C3H/10T1/2 cells. The effect of MS-275 on the adipogenic capacity of C3H/10T1/2 cells were determined by Oil red O staining. Real-time quantitative polymerase chain reaction (real-time PCR) was employed to detect the mRNA transcription levels of adipogenic differentiation markers, including fat binding protein (aP2), perilipin, adiponectin (Adipoq) and adipogenic differentiation key transcription factor peroxisome proliferators-actiated receptor-gamma 2 (PPAR-γ2) after MS-275 treatment. **Results** MS-275 inhibited the viability of C3H/10T1/2 cells in a dose-dependent manner, and the IC_{50} was identified nearly to 8 μmol/L ($P<0.05$). FCM analysis showed that the cell cycle of C3H/10T1/2 was arrested at G_0/G_1 phase after MS-275 treatment. Oil red O staining showed that 0.5 μmol/L MS-275 significantly reduced lipid drops accumulation in C3H/10T1/2 cells, and the mRNA transcription levels of aP2, perilipin, Adipoq and adipogenic differentiation key transcription factor PPAR-γ2 were decreased correspondingly ($P<0.05$). **Conclusion** MS-275 attenuates the adipogenic differentiation capacity of mesenchymal stem cells, suggesting that inhibiting the activity of class Ⅰ HDACs may partially suppress mesenchymal stem cells into adipogenesis.

[**Key words**] adipogenesis; mesenchymal stem cells; MS-275; histone deacetylases

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30600587, 30900563, 81071483), the Fundamental Research Funds for Central Universities, and the Natural Science Foundation of Jiangsu Higher Education Institutions (10KJB180006). Corresponding author: Ji Yuhua, Tel: 86-20-85227730, E-mail: tjyh@jnu.edu.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(30600587;30900563;81071483);中央高校基础研究资金;江苏省高教厅自然科学资金(10KJB180006)
[通信作者] 季煜华,电话:(020)85227730,E-mail:tjyh@jnu.edu.cn

脂肪形成(adipogenesis)的异常与肥胖、骨质疏松、心血管疾病、Ⅱ型糖尿病等疾病密切相关[1-2]。已知脂肪形成是由C/EBP、SREBPs、和PPAR-γ等一系列成脂相关转录因子调控,通过改变基因的表达,进而调节脂质生成、转运、存储的复杂过程[3]。近年研究发现,组蛋白乙酰化引致的染色质重构是转录调节的关键环节。组蛋白乙酰化是由组蛋白乙酰化酶(histone acetyltransferases, HATs)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs)两大酶家族共同调控的动态过程:HATs通过乙酰化组蛋白赖氨酸残基,激活基因转录;HDACs则使组蛋白去乙酰化,而抑制基因转录[4]。根据HDACs的结构、功能、亚细胞定位以及表达模式,HDACs可被分为4种类型:Ⅰ型HDACs(HDAC1,2,3和8)广泛表达,有效地使组蛋白去乙酰化;Ⅱa型HDACs(HDAC4,5,7和9)在肌肉与神经组织中特异性表达,催化活性小;Ⅱb型HDACs(HDAC6和10)是细胞质中的主要去乙酰化酶;而目前对于Ⅳ型HDAC(HDAC11)的认识较少[4]。

HDACi可通过抑制HDACs的活性,进而增加蛋白质的乙酰化[5],它阻滞细胞周期、引起细胞凋亡,被认为是一种新型的抗肿瘤药物[6]。HDACi也影响细胞分化的进程,近来的研究发现,成脂分化的关键转录因子PPAR-γ与HATs和HDACs可相互作用并影响成脂分化的进程[7-8]。但目前对于不同类型的HDACs在成脂分化过程中如何发挥作用仍然缺乏了解。MS-275,属于苯甲酰胺类衍生物,是一种新型的HDACi,可特异性地抑制Ⅰ型HDACs的活性[9]。因此本研究建立了C3H/10T1/2的成脂分化模型,并以MS-275作用于该模型,探讨其对MSCs增殖及成脂分化的影响。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

C3H/10T1/2 clone 8细胞系购自美国模式培养物典藏馆(ATCC)。

1.2 主要试剂

MS-275购自Selleck,低糖DMEM培养基、高糖DMEM培养基购自HyClone公司,3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(IBMX)、地塞米松、吲哚美辛、油红O、碘化乙啶(PI)购自Sigma,Trizol购自Invitrogen,cDNA第1链合成试剂盒购自TaKaRa,SYBR Green Master Mix购自Tiangen。

1.3 C3H/10T1/2细胞的培养

用完全培养基(含体积分数为10%胎牛血清的低糖DMEM),在体积分数为5% CO_2,37℃的培养箱中进行培养。细胞在培养过程中要及时传代,保持汇合度在70%以下,按1∶4的比例传代。

1.4 C3H/10T1/2细胞的成脂分化

以$5.0\times10^3/cm^2$的细胞密度,接种于12孔板,直至细胞单层融合75%~80%后,换为含有0.5 μmol/L地塞米松、0.5 μmol/L吲哚美辛、50 μmol/L IBMX、10%胎牛血清的DMEM高糖培养基(成脂分化培养基:adipocyte differentiation media, ADM),诱导细胞分化,3~4 d更换1次培养基,分化12 d。阴性对照组仅用完全培养基维持。

1.5 油红O染色及半定量分析

预冷PBS清洗细胞3次,4%多聚甲醛4 ℃下固定10 min,油红O室温染色30 min,蒸馏水清洗非特异性染料,镜检拍照;随后加入无水异丙醇(每孔300 μl)溶解与脂滴结合的油红O,酶标仪500 nm下测定光密度值[$D(500)$]。

1.6 细胞活性检测

取对数生长期的细胞,以$5.0\times10^3/cm^2$的细胞密度,接种于96孔培养板,每孔200 μl完全培养基。24 h后换为含有不同浓度MS-275的完全培养基200 μl,继续培养48 h后,镜下观察细胞形态后每孔加入20 μl 0.5 mg/ml MTT溶液。37 ℃孵育4 h,吸掉上清,每孔加入DMSO 150 μl,轻度振荡。酶标仪490 nm下测定光密度值[$D(490)$],并估算IC_{50}。

1.7 细胞周期分析

取对数生长期的细胞,以$5.0\times10^3/cm^2$的细胞密度,培养于6孔板,每孔1 ml的完全培养基。24 h后,换含有0、0.25、0.5、1 μmol/L MS-275的完全培养基,继续培养48 h后,收集细胞。加入30 μg/ml的RNAase,30 μg/ml的PI各250 μl,37 ℃避光反应60 min。筛网过滤,上机检测,Modfit软件分析结果。

1.8 实时定量PCR检测成脂分化标志物与成脂关键转录因子

以Trizol试剂提取细胞总RNA,cDNA第1链合成参照TaKaRa试剂盒步骤进行。实时定量PCR反应体系包括cDNA(1∶5稀释),PCR上游引物,PCR下游引物,2.5×SYBR Green,去离子水。反应条件:95 ℃热启动10 min;94 ℃变性15 s,60 ℃退火15 s,72 ℃延伸30 s,72 ℃采集荧光,共40个循环;退火反应,55~95 ℃每上升0.5 ℃采集1次荧光。用$2^{-\Delta\Delta CT}$法分析实验结果,实时定量PCR引物:18 sRNA作为内参,上游5′-CCTGGATACCGCAGCTAGGA-3′,下游5′-GCGGCGCAATACGAATGCCGC-3′;Adipoq上游5′-GATGGCAGAGATGGCACTCC-3′,下游5′-CTGCCAGTGCTGCCGTCAT-3′;aP2上游5′-AAGACAGCTCCTCCTCGAAGGTT-3′,下游5′-TGACCAATCGCCATATACGC-3′;perilipin上游5′-GGTGGCGGTCTGCTGCACG-3′,下游5′-CCAGGCCTCTGCAGGCCAAC-3′;PPAR-γ2上游5′-GGTGCCTTCGCTGATGCACTG-3′,下游5′-ATCGCGCTCGCCTTGGCTATG-3′。

1.9 统计学分析

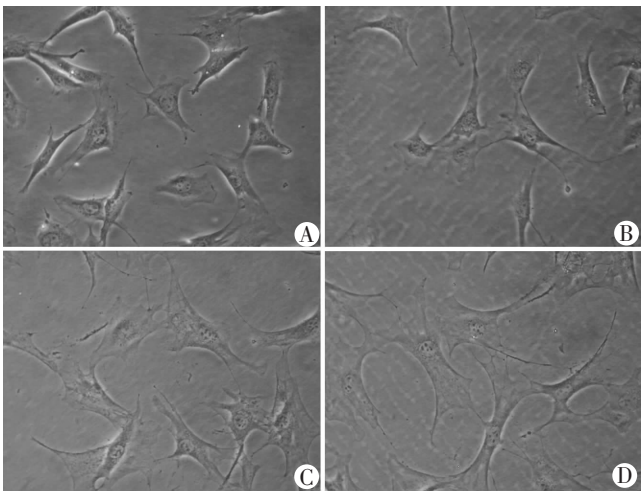
采用Excel进行数据处理,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,进行配对t检验。

2 结果

2.1 MS-275改变C3H/10T1/2细胞的形态并抑制其增殖活性

正常培养的C3H/10T1/2细胞呈多角形;MS-275处理细胞48 h后,细胞形态发生明显改变,呈扁平形状,突起变长,体积较大,且随着浓度升高,形态改变越明显(图1)。MTT结果显示MS-275降低了C3H/10T1/2细胞的增殖活性,并呈剂量依赖关系。浓度<0.5 μmol/L时,对细胞的增殖影响轻微($P<0.05$);

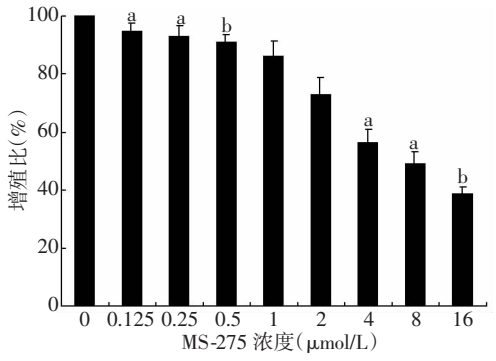
浓度处于 1 ~ 16 μmol/L 时，明显抑制了细胞的增殖，IC_{50} 约为 8 μmol/L（$P < 0.05$）（图 2），因此选择 0.25、0.5 μmol/L 和 1 μmol/L 浓度进行后续实验。



A：0 μmol/L；B：0.25 μmol/L；C：0.5 μmol/L；D：1 μmol/L

图 1 不同浓度 MS-275 改变 C3H/10T1/2 细胞形态

（倒置显微镜 ×250）



a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与 0 μmol/L 比较

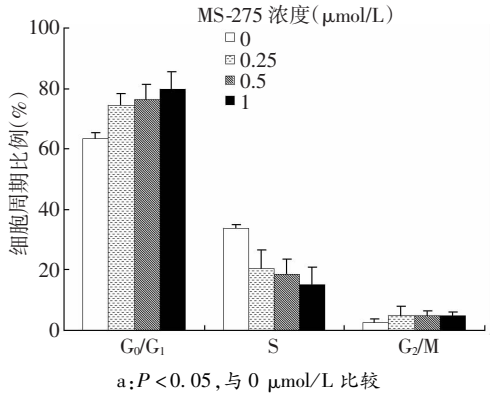
图 2 MS-275 降低了 C3H/10T1/2 细胞的增殖活性

2.2 MS-275 对 C3H/10T1/2 细胞周期的影响

流式细胞术检测不同浓度的 MS-275 处理对 C3H/10T1/2 细胞周期分布的影响。随着 MS-275 浓度升高，与 0 μmol/L 相比，细胞出现明显的 G_0/G_1 期阻滞，所占比率从 63.09% 增加到 78.81%，而 S 期细胞的比率则从 34.20% 下降到 16.11%。此外所选取的 MS-275 浓度不引起细胞的凋亡（图 3）。

2.3 MS-275 对 C3H/10T1/2 细胞成脂分化的影响

倒置显微镜下可见分化成熟的脂肪细胞的细胞质内充满了脂滴（图 4A、B）。以含不同浓度 MS-275 的成脂分化培养基处



a：$P < 0.05$，与 0 μmol/L 比较

图 3 不同浓度 MS-275 对 C3H/10T1/2 细胞周期的影响

理 C3H/10T1/2 细胞 12 d，油红 O 染色分析 MS-275 对 C3H/10T1/2 细胞成脂分化的影响。0.25 μmol/L 的 MS-275 对脂滴形成的影响轻微（图 4C），随着浓度升高（0.5 μmol/L 和 1 μmol/L），MS-275 抑制脂滴形成效果越明显（图 4D、E），向脂肪分化的细胞与细胞内脂滴数量明显减少，脂滴体积变小，单室脂滴完全消失，但并不能完全抑制小脂滴的形成。为了量化 MS-275 对成脂分化的影响，油红 O 半定量分析的结果与染色结果相一致，随着浓度的增加抑制效果越明显。1 μmol/L MS-275 处理组的 $D(500)$ 值为 ADM 组的 0.47 倍，但仍为阴性对照组的（2.42 ± 0.05）倍（$P < 0.05$）。

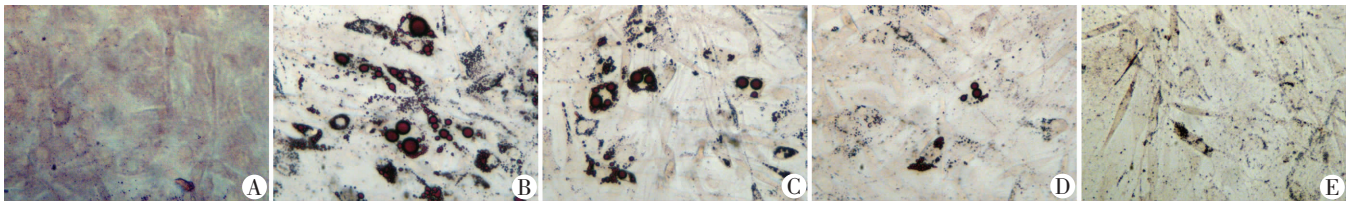
2.4 MS-275 对 C3H/10T1/2 成脂关键转录因子及成脂分化标志物的影响

以 Real-time PCR 检测 MS-275 对 C3H/10T1/2 成脂分化过程中的关键转录因子 PPAR-γ2、成脂分化标志物 aP2、perilipin、Adipoq mRNA 转录水平的影响。如表 1 所示，ADM 组的 4 个基因的表达量均远远高于阴性对照（$P < 0.05$）；随着 MS-275 浓度的增加，4 个基因的转录水平逐渐降低，但仍高于阴性对照组（$P < 0.05$）。

表 1 Real-time PCR 分析 MS-275 对 PPAR-γ2、aP2、perilipin、Adipoq mRNA 相对表达量的影响（$n = 3, \bar{x} \pm s$）

组别	PPAR-γ2	aP2	perilipin	Adipoq]
阴性对照	1	1	1	1
ADM 组	638.71 ± 85.85[a]	353.17 ± 38.01[a]	2 150.60 ± 194.59[a]	19 036.28 ± 1 212.11[a]
ADM + 0.25 μmol/L MS-275 组	544.25 ± 79.54[a]	263.37 ± 76.36	1 676.67 ± 203.19[a]	16 971.97 ± 831.52[a]
ADM + 0.5 μmol/L MS-275 组	432.48 ± 102.50[a]	169.31 ± 54.62	1 174.67 ± 97.11[b]	14 231.33 ± 1 946.94[a]
ADM + 1 μmol/L MS-275 组	233.50 ± 36.06[b]	119.31 ± 29.63[a]	626.59 ± 194.59[a]	9 741.12 ± 2 270.81

a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$，与阴性对照比较



A：阴性对照；B：ADM 组；C：ADM + 0.25 μmol/L MS-275；D：ADM + 0.5 μmol/L MS-275；E：ADM + 1 μmol/L MS-275

图 4 油红 O 染色检测 MS-275 对 C3H/10T1/2 细胞成脂分化的影响（倒置显微镜 ×250）

3 讨论

间充质干细胞(mesenchymal stem cells MSCs)主要存在于骨髓、脂肪组织和脐血中,具有自我更新和多向分化潜能,被认为是理想的组织工程种子细胞,也是研究包括成脂分化在内的间充质干细胞多向分化机制的良好模型[10-11]。组蛋白乙酰化修饰是一种表观遗传调控的重要机制,组蛋白翻译后修饰所引起的染色质结构重塑在真核生物基因表达调控中发挥着重要的作用,近年来的研究发现蛋白质的乙酰化修饰参与调节多种细胞生物学功能,如增殖、分化和凋亡[12]。

MS-275是一种特异性的Ⅰ型HDACi,为了探讨Ⅰ型HDACs对MSCs增殖与成脂分化的影响,我们建立了C3H/10T1/2细胞的成脂分化模型,并检测了MS-275对C3H/10T1/2细胞增殖和成脂分化的影响。结果表明MS-275改变了细胞的形态,抑制C3H/10T1/2细胞的活性并将其阻滞在G_0/G_1期。该结果与已有报道不尽相同,已有的研究显示两种泛组蛋白去乙酰化酶抑制剂,VPA与NaBu,可将来源于人脐血与脂肪组织的MSCs阻滞在G_2/M期[13]。此外,与诱导肿瘤细胞凋亡不同,本研究并未观察到凋亡的发生。上述这些差异提示不同类型的HDACi对不同类型细胞的周期抑制作用具有不同的作用,其机制值得进一步研究。

最近,Haberland等[14]报道了在3T3-L1成脂模型中,敲除HDAC1和HDAC2能有效地抑制脂滴的积累。与Haberland等的报道类似,本研究结果也显示Ⅰ型HDACi MS-275可明显降低C3H10T1/2细胞的成脂分化,且其抑制作用呈现剂量依赖性,表明Ⅰ型HDACs参与成脂分化进程的调节。但与多种泛HDACi相比,如TSA和SAHA,MS-275对MSCs成脂分化的抑制作用较弱。油红O染色显示MS-275可以抑制单室脂肪细胞的出现,但并不能使小脂滴全部消失;其对PPAR-γ2、aP2、perilipin、Adipoq的转录水平的影响也说明了MS-275只可部分抑制MSCs的成脂分化。这可能与低浓度的MS-275仅可特异性地抑制HDAC1与3[9],而其他泛HDACi则对多种HDACs具有广泛的抑制作用相关,提示除了Ⅰ型HDACs外,多种其他类型的HDACs也参与了MSCs的成脂分化的调节过程,比如,最近就有研究发现HDAC4[15]和HDAC9[16]都有可能是成脂分化调节的关键因子。此外,除了通过上述的转录水平影响成脂分化的进程外,还可能存在着其他的途径,近来的研究还发现除组蛋白外,细胞内还存在着大量乙酰化修饰的非组蛋白,这些蛋白的乙酰化修饰可影响细胞内物质与能量的代谢[12]。因此,对参与成脂分化过程中HDACs的种类和作用的具体机制还有待的进一步研究,这也将有助于发展特异性更强、抑制效果更好的HDACi应用到肥胖症等疾病的治疗中。

参考文献:

[1] Arner P, Arner E, Hammarstedt A, *et al*. Genetic predisposition for Type 2 diabetes, but not for overweight/obesity, is associated with a restricted adipogenesis[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18284.

[2] Flegal K M, Graubard B I, Williamson D F, *et al*. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity[J]. JAMA, 2007, 298(17): 2028-2037.

[3] Lefterova M I, Zhang Y, Steger D J, *et al*. PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale[J]. Genes Dev, 2008, 22(21): 2941-2952.

[4] Haberland M, Montgomery R L, Olson E N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(1): 32-42.

[5] Prince H M, Bishton M J, Harrison S J. Clinical studies of histone deacetylase inhibitors[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(12): 3958-3969.

[6] Liu S, Cheng H, Kwan W, *et al*. Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest, apoptosis, and differentiation in clear cell sarcoma models[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(6): 1751-1761.

[7] Farmer S R. Transcriptional control of adipocyte formation[J]. Cell Metab, 2006, 4(4): 263-273.

[8] Yoo E J, Chung J J, Choe S S, *et al*. Down-regulation of histone deacetylases stimulates adipocyte differentiation[J]. J Biol Chem, 2006, 281(10): 6608-6615.

[9] Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, *et al*. MS-275, a novel histone deacetylase inhibitor with selectivity against HDAC1, induces degradation of FLT3 via inhibition of chaperone function of heat shock protein 90 in AML cells[J]. Leuk Res, 2008, 32(9): 1382-1392.

[10] Garcia-Gomez I, Elvira G, Zapata A G, *et al*. Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications[J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10(10): 1453-1468.

[11] 黄宏, 朱方强, 孙宏振, 等. 脂肪来源干细胞体外成骨诱导和成脂诱导分化[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(13): 1219-1222.

[12] Zhao S, Xu W, Jiang W, *et al*. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation[J]. Science, 2010, 327(5968): 1000-1004.

[13] Lee S, Park J R, Seo M S, *et al*. Histone deacetylase inhibitors decrease proliferation potential and multilineage differentiation capability of human mesenchymal stem cells[J]. Cell Prolif, 2009, 42(6): 711-720.

[14] Haberland M, Carrer M, Mokalled M H, *et al*. Redundant control of adipogenesis by histone deacetylases 1 and 2[J]. J Biol Chem, 2010, 285(19): 14663-14670.

[15] Kim S N, Choi H Y, Kim Y K. Regulation of adipocyte differentiation by histone deacetylase inhibitors[J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(4): 535-541.

[16] Chatterjee T K, Idelman G, Blanco V, *et al*. Histone deacetylase 9 is a negative regulator of adipogenic differentiation[J]. J Biol Chem, 2011, 286(31): 27836-27847.

(**收稿**:2011-09-30;**修回**:2011-11-19)

(编辑 张 维)