论著

文章编号:1000-5404(2013)15-1574-05

atRA 抑制大鼠骨髓间充质干细胞成脂分化

张 蔓,舒秀兰,李文迪,刘晶晶,陈 洁,刘友学 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院,儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市(儿童发育重大疾病诊治与预防)国际科技合作基地)

[摘要] **目的** 探讨高浓度全反式视黄酸(all-trans retinoic acid, atRA)抑制大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)向脂肪细胞分化的机制。**方法** 体外分离、培养和诱导大鼠 BMSCs;在成脂诱导液中加入0.1、0.5、1.0、5.0 μmol/L atRA,光学显微镜下观察细胞形态及油红 O 染色变化;油红 O 染色提取法分析不同浓度 atRA 对 BMSCs 成脂分化的影响;real-time PCR 测定细胞视黄酸受体(RARα、RARγ)、CCAAT 增强子结合蛋白 α(CEBPα)及过氧化物酶体增殖激活受体 γ2(PPARγ2)mRNA 水平的变化。**结果** 细胞形态及油红 O 染色观察发现,在 0.1、0.5、1.0、5.0 μmol/L atRA 作用下大鼠 BMSCs 向脂肪细胞分化受到抑制,且呈浓度依赖性;油红 O 染色提取法半定量测定结果显示,随着 atRA 浓度升高,分化细胞内脂肪含量降低($P<0.01$);real-time PCR 检测显示与血清组(未加 atRA)相比,加入 atRA 后,大鼠 BMSCs 的 CEBPα 和 PPARγ2 表达显著降低($P<0.05$),RARα 表达无显著差异[血清组 *vs* 1.0 μmol/L atRA 组:(0.008 4±0.001 9) *vs* (0.009 1±0.001 3),$P>0.05$],但 RARγ 表达显著增加[血清组 *vs* 1.0 μmol/L atRA 组:(0.022 6±0.001 2) *vs* (0.053 1±0.002 3),$P<0.01$]。**结论** 0.1、0.5、1.0、5.0 μmol/L atRA 可抑制大鼠 BMSCs 向脂肪细胞分化,其机制可能与 RARγ 的上调及 CEBPα、PPARγ2 的下调有关。

[关键词] 全反式视黄酸;骨髓间充质干细胞;成脂分化;视黄酸受体
[中图法分类号] R329.21; R331.22; R977.21 [文献标志码] A

AtRA inhibits adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats

Zhang Man, Shu Xiulan, Li Wendi, Liu Jingjing, Chen Jie, Liu Youxue (Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorder, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism of all-trans retinoic acid (atRA) to inhibit the adipogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** Rat BMSCs were isolated, incubated and induced to differentiate into adipocytes. AtRA at high concentration (0.1-5.0 μmol/L) was added to the medium for adipogenic induction. The morphologic changes of BMSCs during differentiation were observed under a light microscope. The effect of atRA on the adipogenic differentiation was analyzed by oil red O staining. The expression of retinoic acid receptors α and γ (RARα and RARγ), CCAAT/enhancer binding protein a (CEBPα) and peroxisome proliferators-activated receptor γ2 (PPARγ2) was analyzed by real-time PCR. **Results** At the concentration of 0.1-5.0 μmol/L, atRA inhibited rBMSCs from differentiating into adipocytes in a dose-dependent manner. The fat content in differentiated cells was decreased along with the increase of atRA concentration ($P<0.05$). Compared with the control group (without adding atRA), the mRNA expression levels of CEBPα and PPARγ2 were decreased significantly in the atRA groups ($P<0.05$). Compared with the control group, the mRNA expression of RARα in the atRA group (1.0 μmol/L) was not significantly different (0.008 4±0.001 9 *vs* 0.009 1±0.001 3, $P>0.05$), while the mRNA expression of RARγ significantly was increased (0.022 6±0.001 2 *vs* 0.053 1±0.002 3, $P<0.01$). **Conclusion** AtRA (0.1-5.0 μmol/L) can inhibit the adipogenic differentiation of rBMSCs by up-regulating the expression of RARγ and down-regulating the expression of CEBPα and PPARγ2.

[**Key words**] all-trans retinoic acid; bone marrow mesenchymal stem cells; adipogenesis; regulation

Corresponding author: Liu Youxue, Tel: 86-23-63632994, E-mail: lyxliu@126.com

[通信作者] 刘友学,电话:(023)63632994,E-mail:lyxliu@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130313.0841.005.html(2013-03-13)

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs),是骨髓基质系统中具有多向分化潜能的细胞,在体内外可被诱导为成骨细胞、软骨细胞及脂肪细胞等[1-2]。目前已公认脂肪细胞来自间充质干细胞(MSCs)[3],且高脂饲料诱导的肥胖大鼠体内存在MSCs向脂肪细胞分化被异常激活的现象,因此进一步研究BMSCs向脂肪细胞分化的干预机制及调控因子对于肥胖的预防和治疗具有重要意义。

视黄酸(retinoic acid, RA)是维生素A在体内发挥生物学作用的活性形式,影响细胞分化进程。Berry等[4]研究发现atRA使3T3-L1细胞维持在前脂肪状态,阻止其向脂肪细胞分化。林亚秋等[5]研究发现高浓度(1~10 μmol/L)RA抑制猪前体脂肪细胞向脂肪细胞分化。PPARγ是调控脂肪分化的重要核受体,其PPARγ2亚型主要存在于脂肪组织,在调节脂肪分化过程中起重要作用[6]。在RA对BMSCs向脂肪细胞分化过程中如何发挥作用还缺乏深入研究。本实验采用高浓度atRA干预BMSCs成脂分化模型,探讨atRA对大鼠BMSCs成脂分化的调节作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

细胞培养基DMEM/F12、胎牛血清(FBS)、成脂诱导液、全反式视黄酸(atRA)、油红O购自HyClone公司,胰酶替代物(Tryple)购自Gibcol公司,青链霉素混合液购自北京鼎国昌盛公司,高纯度总RNA快速提取试剂盒(离心柱型)购自百泰克公司,反转录试剂盒购自TaKaRa公司,SsoFast EvaGreen Supermix购自Bio-Rad公司,引物委托北京华大公司合成。

1.2 大鼠BMSCs的分离培养

SD大鼠购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心,在重庆医科大学附属儿童医院实验动物中心SPF级饲养。原代BMSCs取自4周龄SD大鼠,具体分离培养参照江和碧等[7]的方法。当细胞达到90%融合时用胰酶替代物进行消化传代(3~5 d长满)。后续实验均用第4代细胞。

1.3 大鼠BMSCs成脂诱导及油红O染色

取第4代细胞,以2×10^6接种于6孔板,培养至细胞融合,每孔加入含10% FBS和双抗的成脂诱导液2 mL,记为诱导第1天,每3天换1次液,至诱导第15天结束。取诱导结束的细胞进行油红O染色:弃去诱导液,用PBS洗3次,10%甲醛固定60 min,PBS洗3次,油红O工作液染色10 min,60%异丙醇分色20 s,三蒸水冲洗至澄清。显微镜观察拍照。

1.4 atRA对大鼠BMSCs成脂分化的影响

将细胞分为空白对照组(未加诱导液),血清组(不加atRA),0.1、0.5、1.0、5.0 μmol/L组(分别于成脂分化开始时加入成脂诱导液,并加入相应浓度的atRA,每3天换液,维持atRA浓度至分化第15天)。

1.5 油红O染色提取法测定细胞内脂肪含量

取培养至15 d的6孔板,吸净培养基,用PBS洗3次。用10%甲醛固定60 min,PBS冲洗,加油红O工作液染色2 h,吸去工作液,PBS洗净残余的工作液,加入1 mL纯异丙醇萃取与胞内脂肪结合的油红O,分光光度计在波长510 nm处比色记录光密度值[$D(510)$]。

1.6 Real-time PCR检测视黄酸信号通路和脂肪细胞分化标志基因

取诱导前(第0天)及诱导后第1、3、5、15天培养的BMSCs提取总RNA,以TaKaRa试剂盒反转录cDNA第1链。根据本实验室设计的RARα、RARγ引物[8]进行扩增,RARα上游:5′-ATTGCCGACCAGATTACC-3′,下游:5′-AAAGCCAGCGTTGTGC-3′,产物长度为147 bp;RARγ上游:5′-CTGACCCTGAACCGAACC-3′,下游:5′-CACAGATGAGGCAGATAGCA-3′,产物长度为142 bp。根据GenBank公布的大鼠CEBPα、PPARγ2和GAPDH基因序列,Primer3设计上下游引物。CEBPα上游:5′-GGTGGATAAGAACAGCAACGA-3′,下游:5′-TCAACTCCAACACCTTCTGCT-3′,产物长度为122 bp;PPARγ2上游:5′-CCTCCCTGAATAAAGATGG-3′,下游:5′-CACAGCAAACTCAAACTTAGGC-3′,产物长度为125 bp;GAPDH上游:5′-CCTGGAGAAACCTGCCAAG-3′,下游:5′-CACAGGAGACAACCTGGTCC-3′,产物长度为110 bp。反应体系包括cDNA、PCR上下游引物、SsoFast EvaGreen Supermix、去离子水。反应条件:95 ℃预变性30 s、95 ℃变性5 s、退火30 s、65~95 ℃每上升0.5 ℃采集荧光。用$2^{-\Delta\Delta Ct}$分析,以GAPDH作为内参。

1.7 统计学分析

采用Prism 5进行数据分析和作图,数据以$\bar{x}\pm s$表示,各组与血清组比较采用t检验。

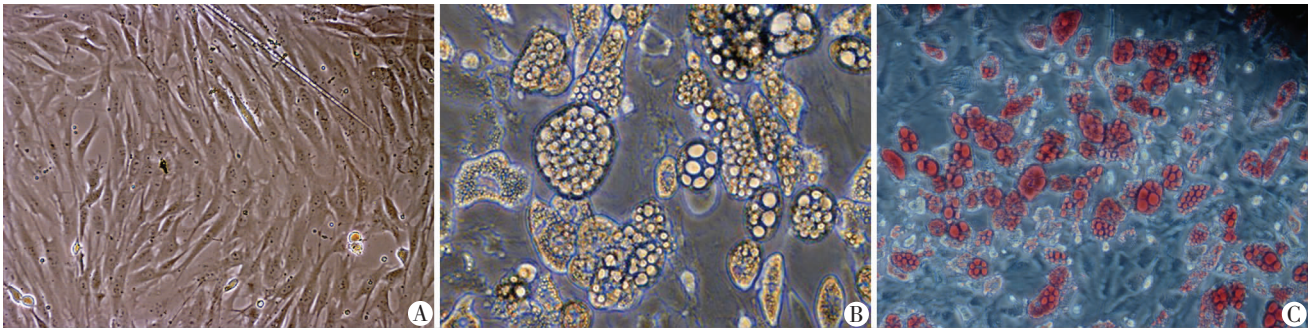
2 结果

2.1 成脂分化形态学观察

原代大鼠BMSCs呈梭形,细胞核椭圆,核仁2~3个清晰可见(图1A)。大鼠BMSCs经成脂诱导72 h后,镜下观察可看到细胞由梭形变为椭圆或圆形;诱导5 d时可见个别细胞细胞质内有折光性强的小脂滴,多出现在细胞核周围。随着诱导时间的延长,脂滴逐渐增多增大并融合(图1B)。经油红O染色后,脂滴呈红色,细胞核、细胞质不着色(图1C)。

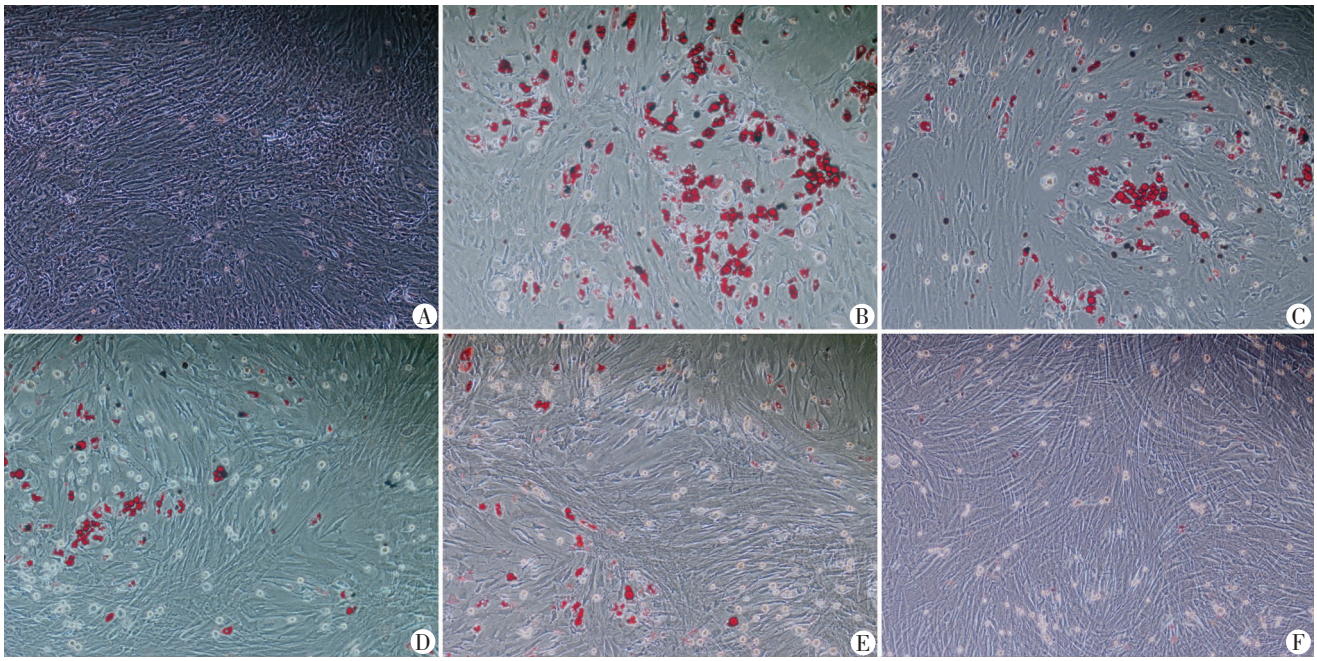
2.2 atRA对大鼠BMSCs成脂分化的影响

2.2.1 不同浓度atRA对大鼠BMSCs成脂分化的影响 在成脂诱导培养基中加入0.1、0.5、1.0、5.0 μmol/L atRA后,成脂分化受到显著抑制(图2)。在不同浓度atRA持续作用下,与血清组相比,除0.1 μmol/L差异不显著外,其余各浓度均抑制成脂分化,且呈浓度依赖性;在1.0、5.0 μmol/L时,成脂分化出现明显抑制($P<0.01$)。经油红O染色提取法半定量测定细胞内脂肪含量,检测到与镜下观察相一致的抑制效应(图3)。



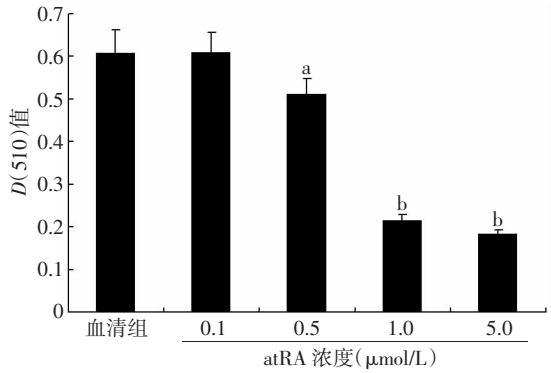
A:原代培养5 d的大鼠BMSCs;B:成脂诱导第15天未染色;C:成脂诱导第15天油红O染色

图1 大鼠BMSCs原代培养及成脂分化染色观察 (倒置显微镜 ×200)



A:空白对照组;B:血清组;C~F:分别为0.1、0.5、1.0、5.0 μmol/L atRA组

图2 不同浓度atRA对大鼠BMSCs成脂分化的影响 (倒置显微镜 ×100)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与血清组比较

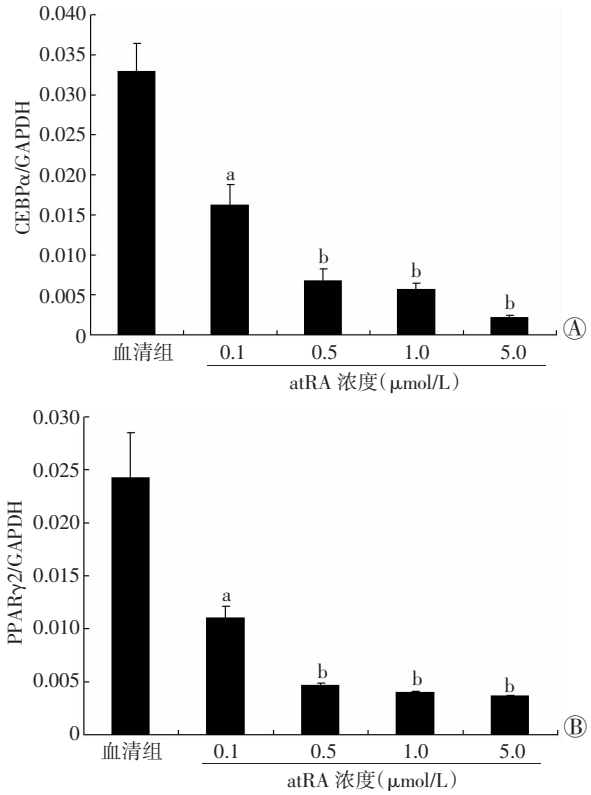
图3 不同浓度atRA抑制rBMSCs成脂分化

2.2.2 atRA对大鼠BMSCs成脂分化过程中CEBPα、PPARγ2的调控作用 Real-time PCR检测atRA对大鼠BMSCs成脂诱导分化细胞培养15 d后的CEBPα、PPARγ2 mRNA转录水平的影响。与血清组相比,随着atRA浓度的升高,CEBPα、PPARγ2受到抑制愈加明显($P<0.05$),呈浓度依赖性,即atRA浓度越高,抑制作用越强(图4)。

2.2.3 atRA作用不同时间对CEBPα、PPARγ2的影响 从油红O染色提取法检测atRA对大鼠BMSCs成脂诱导分化的抑制效果发现,当atRA浓度为1.0 μmol/L时明显抑制了成脂分化。因此我们选取在1.0 μmol/L atRA的条件下观察其在不同时间对CEBPα、PPARγ2的调控作用。发现,无论是CEBPα还是PPARγ2,从开始诱导到成脂诱导的第5天,atRA对它们的表达影响并不明显,而第15天时其抑制效果非常显著($P<0.01$,图5)。

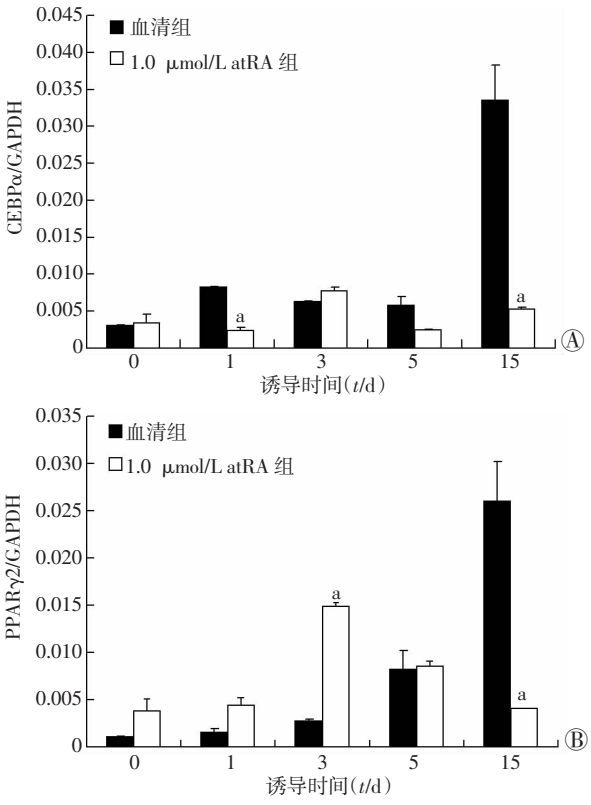
2.3 atRA对RARα、RARγ的影响

在大鼠BMSCs成脂诱导分化过程中,经1.0 μmol/L atRA持续作用15 d后,与血清组相比,RARα表达无明显改变($P>0.05$),而RARγ表达明显增加($P<0.01$)。加入1.0 μmol/L atRA的大鼠BMSCs在成脂诱导分化过程中,第0、1、3、5、15天其RARα表达与血清组相比无明显差异($P>0.05$)。RARγ在第1、15天表达明显增强($P<0.01$)。见图6。



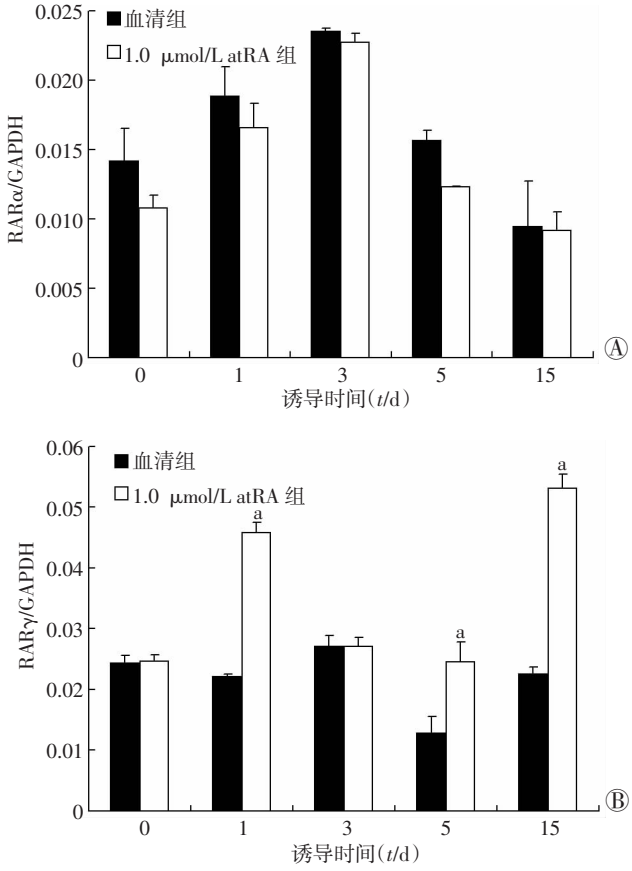
A:atRA 对 CEBPα 的调控;B: atRA 对 PPARγ2 的调控;a: $P<0.05$, b:$P<0.01$, 与血清组比较

图4 不同浓度 atRA 对 CEBPα、PPARγ2 的调控作用



A:对 CEBPα 的影响 a:$P<0.01$,与血清组比较;B:对 PPARγ2 的影响 a:$P<0.01$,与血清组比较

图5 1.0 μmol/L atRA 作用不同时间对 CEBPα、PPARγ2 的影响



a:$P<0.01$,与血清组比较

图6 1.0 μmol/L atRA 作用不同时间对 RARα、RARγ 的影响

3 讨论

目前关于 RA 对成脂作用的研究大多集中在前体脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化这一阶段[4,9],而体内脂肪细胞的来源已经被证实是 BMSCs,因此研究 BMSCs 向前脂肪细胞、脂肪细胞的分化过程、调节机制以及调节因子将为预治肥胖的发生提供重要的理论依据,具有明显的应用价值和前景。

atRA 是维生素 A 在体内发挥作用的活性形式,其对细胞分化、增殖有重要作用。体外研究证实 RA 对脂肪细胞的分化形成具有调节作用。本研究发现,加入 atRA 后(0.1 ~0.5 μmol/L)大鼠 BMSCs 成脂分化受到抑制,与血清组相比其脂滴出现时间晚,细胞内脂滴大小及含脂滴细胞数均低。油红 O 染色提取法半定量检测显示:atRA 对大鼠 BMSCs 成脂分化的抑制作用呈浓度依赖性,这与王方等[10]用 atRA 处理人 BMSCs 的结果一致。Teboul 等[11]用 RA 干预 ob17 前脂肪细胞系发现:0.1 μmol/L RA 部分抑制,1.0 ~10.0 μmol/L RA 完全抑制其向脂肪细胞分化,低于 10.0 nmol/L 抑制效果不明显。本研究发现,与血清组(10% FBS 含 RA 约 42 nmol/L)相比,在加入 10、50 nmol/L atRA 时,大鼠 BMSCs 成脂未受到明显抑制;当浓度达到 3.0 ~10.0 μmol/L 时成脂分化被完全

抑制,出现此不同是否由实验所用细胞种类不同及细胞所处阶段不同导致,需要进一步研究证实。

RA发挥作用是通过其核受体RARs实现的,RARα及RARγ在脂肪组织中均表达丰富。Xue等[12]研究发现,在3T3-L1前脂肪细胞向脂肪细胞分化过程中:RARα mRNA水平基本不变,RARγ mRNA水平下降,但加入RA后RARγ的下调被阻止。日本学者用1 μmol/L的atRA处理3T3-L1细胞后,RARγ mRNA表达增加了4~5倍[13],RA通过上调RARγ基因的表达以维持其处于前脂肪细胞阶段[4]。本研究也发现:用1.0 μmol/L atRA处理大鼠BMSCs时,RARγ mRNA水平较血清对照组显著增加,但RARα无明显变化。而且RARγ的表达在诱导第1天和第15天均显著高于血清对照组,说明RARγ的作用在脂肪分化过程中持续存在。

Berry等[14]通过3T3-L1前脂肪细胞和在体实验发现:视黄酸是通过RAR调节前脂肪细胞分化,导致体质量下降和改善胰岛素敏感性。在脂肪分化过程中,CCAAT增强子结合蛋白家族(包括CEBPα、β等)与过氧化物酶体增殖激活受体γ(PPARγ)是重要调控因子[6]:首先早期的CEBPβ上调,进而诱导CEBPα和PPARγ。后者不仅是脂肪形成的决定因素,也是维持分化状态所必需的。研究表明:高浓度RA通过抑制CEBPα、PPARγ等阻止前脂肪细胞向脂肪细胞分化[9,15];本研究发现,高浓度的atRA抑制BMSCs向脂肪细胞分化,并伴随着CEBPα和PPARγ2的下调。在诱导分化的前5 d atRA并未表现出明显的抑制作用,但持续作用15 d时其抑制作用显著。陈国柱等[16]用10.0 μmol/L atRA处理猪脂肪间充质细胞24、48、72 h后均抑制其向脂肪细胞分化。日本学者发现:在3T3-L1细胞向脂肪细胞分化开始时加入1.0 μmol/L atRA,40 h后检测到PPARγ2表达下降[13]。这与本研究结果不一致,分析原因可能是:在BMSCs成脂分化过程中要经历不同的细胞阶段,每个阶段细胞有其特异性基因表达高峰,且这些基因间存在相互作用[17]。

RA受体位于细胞核,其发挥作用须形成二聚体,如RAR:RXR、RXR:PPARγ。在RA抑制3T3-L1细胞系向脂肪细胞分化的研究中发现,RA上调RARγ同时下调RXRα,这可能是因为在脂肪形成过程中RA对RAR:RXR异二聚体形成的抑制强于对RXR:PPARγ异二聚体形成的抑制。

既往研究认为RA是在前脂肪细胞分化早期起作用,分化开始后就不能阻止其向脂肪细胞分化[15]。此差异可能是因为:前脂肪细胞已是定向分化细胞,只能分化为成熟脂肪细胞,而BMSCs是多向分化干细胞且在诱导条件去除后部分细胞又恢复其干细胞特性。因此,atRA在BMSCs向脂肪细胞分化的哪个时间段发挥作用还需进一步研究。本研究证明atRA在大鼠BMSCs向脂肪细胞分化过程中是通过RARγ发挥其抑制作用的。

参考文献:

[1] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.

[2] Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, *et al*. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of *in vitro* differentiated bone-marrow stromal cells[J]. Eur J Neurosci, 2001, 14(11): 1771-1776.

[3] Rosen E D, MacDougald O A. Adipocyte differentiation from the inside out[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(12): 885-896.

[4] Berry D C, DeSantis D, Soltanian H, *et al*. Retinoic acid upregulates preadipocyte genes to block adipogenesis and suppress diet-induced obesity[J]. Diabetes, 2012, 61(5): 1112-1121.

[5] 林亚秋, 庄合林, 杨公社. 9-顺式维甲酸在原代培养猪前体脂肪细胞分化中的调控作用[J]. 分子细胞生物学学报, 2007, 40(3): 211-216.

[6] Tang Q Q, Lane M D. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte[J]. Annu Rev Biochem, 2012, 81: 715-736.

[7] 江和碧, 卓本慧, 代英, 等. bFGF促进大鼠骨髓间充质干细胞向神经元转化及机制[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(2): 98-101.

[8] Bi Y, Gong M, Zhang X, *et al*. Pre-activation of retinoid signaling facilitates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Dev Growth Differ, 2010, 52(5): 419-431.

[9] Pereira S, Saboya C, Chaves G, *et al*. Class III obesity and its relationship with the nutritional status of vitamin A in pre- and postoperative gastric bypass[J]. Obes Surg, 2009, 19(6): 738-744.

[10] 王方, 梁辉, 陶荣. ATRA对人骨髓间充质干细胞成脂肪细胞分化及瘦素生成的影响[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2010, 30(3): 299-304.

[11] Teboul M, Bismuth J, Gharbi-Chihi J, *et al*. Retinoic acid decreases nuclear triiodothyronine receptor expression and impairs an early step of adipose differentiation in the thyroid hormone-sensitive mouse Ob 17 preadipocyte cell line[J]. Endocrinology, 1992, 130(3): 1475-1482.

[12] Xue J C, Schwarz E J, Chawla A, *et al*. Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPARgamma[J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(4): 1567-1575.

[13] Kawada T, Kamei Y, Fujita A, *et al*. Carotenoids and retinoids as suppressors on adipocyte differentiation *via* nuclear receptors[J]. Biofactors, 2000, 13(1/4): 103-109.

[14] Berry D C, Noy N. All-trans-retinoic acid represses obesity and insulin resistance by activating both peroxisome proliferation-activated receptor beta/delta and retinoic acid receptor[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(12): 3286-3296.

[15] Hisada K, Hata K, Ichida F, *et al*. Retinoic acid regulates commitment of undifferentiated mesenchymal stem cells into osteoblasts and adipocytes[J]. J Bone Miner Metab, 2013, 31(1): 53-63.

[16] 陈国柱, 林亚秋, 庞卫军, 等. 全反式维甲酸抑制猪脂肪间充质干细胞成脂分化[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(6): 474-479.

[17] Ntambi J M, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression[J]. J Nutr, 2000, 130(12): 3122S-3126S.

(**收稿**:2012-12-24;**修回**:2013-02-04)

(编辑 张 维)