

文章编号 1006-8147(2015)03-0203-05

论 著

PCAF 通过调控 FOXO1 活性参与 3T3-L1 前脂肪细胞分化

邹磊, 王玉华, 蔡春友, 魏凤江, 杨付花, 焦红肖, 凌超, 时文涛, 李卫东
(天津医科大学基础医学研究中心, 天津 300070)

摘要 目的: 在 3T3-L1 细胞模型中, 探讨组蛋白乙酰转移酶 PCAF 对脂肪细胞分化调控的分子机制。方法: 应用 Real-time PCR 和 Western blot 检测 PCAF 在 3T3-L1 细胞分化过程中的表达; 应用重组慢病毒感染细胞, shRNA 干扰或过表达 PCAF, 通过 Oil-Red-O 染色法观察 PCAF 表达量变化对细胞分化的影响; 应用 ChIP on chip 和 PCR array 的方法筛选 PCAF 调控的下游基因和通路; 应用 Western blot 和 ChIP qPCR 对潜在目的基因进行验证。结果: PCAF 在 3T3-L1 细胞分化过程中表达升高; PCAF 表达下调会抑制脂肪细胞的分化; PCAF 可以在细胞分化不同时间点诱导 PDPK1 和 FOXO1 的表达, 并间接影响了 FOXO1 磷酸化。结论: 组蛋白乙酰转移酶 PCAF 通过胰岛素通路 (PI3K/PDPK1/AKT/FOXO1) 参与对脂肪细胞分化的转录调控。

关键词 PCAF; 3T3-L1 细胞; FOXO1; 转录调控

中图分类号 Q254

文献标志码 A

P300/CBP associated factor regulates adipogenesis of 3T3-L1 cells by controlling FOXO1

ZOU Lei, WANG Yu-hua, CAI Chun-you, WEI Feng-jiang, YANG Fu-hua, JIAO Hong-xiao, LING Chao, SHI Wen-tao, LI Wei-dong
(Research Center of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To investigate the molecular mechanism of P300/CBP associated factor (PCAF) gene in regulation of adipocytes differentiation. **Methods:** PCAF expression levels were measured by Real-time PCR and Western blot in 3T3-L1 cells during differentiation; 3T3-L1 cells were transfected by recombinant Lentiviral ORF/shRNA and the effects of PCAF overexpression or knockdown on differentiation were observed by Oil-Red-O staining; ChIP on chip and PCR array were used to screen the signaling pathways regulated by PCAF; expressions of potential target genes and pathways were detected by Western blot and ChIP qPCR. **Results:** PCAF expression increased during 3T3-L1 cells differentiation and adipogenesis; the differentiation of 3T3-L1 might be interfered by knockdown of PCAF; expression of PDPK1 and FOXO1 were induced by PCAF at various time points during 3T3-L1 differentiation; the phosphorylation of FOXO1 was also regulated by PCAF indirectly. **Conclusion:** PCAF regulates preadipocytes differentiation through the insulin pathway (PI3K/PDPK1/AKT/FOXO1).

Key words P300/CBP associated factor; 3T3-L1 cell line; FOXO1; transcriptional control

在细胞水平上, 脂肪组织的沉积是脂肪细胞数目增加和单个细胞体积增大的结果。其中, 脂肪细胞数目由多潜能干细胞定向分化为前体脂肪细胞的程度决定, 而单个细胞体积则与其分化程度和甘油三酯积累量相关^[1-2]。对于脂肪细胞分化调控方面的了解主要来源于体外细胞培养模型, 这些细胞系能够在体外通过胰岛素、糖皮质激素、cAMP 激动剂以及血清中的促细胞分裂原 (合称 MDI 培养液) 的诱导模拟脂肪细胞分化过程。人们应用这些细胞模型发现了一些分化过程中的关键转录因子^[3], 但对于这些因子的表观遗传学水平调控, 仍需要更深入地

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (31201029, 81070576); 教育部博士点基金资助项目 (20111202120002); 天津市应用基础及前沿技术研究计划 (12JCZDJC24700)

作者简介 邹磊 (1984-), 男, 硕士在读, 研究方向: 病理与病理生理学; 通信作者: 时文涛, shiwentao@tjmu.edu.cn; 李卫东, liweidong98@tjmu.edu.cn。

研究。胰岛素与前脂肪细胞表面的胰岛素受体结合后, 通过 PI3K (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase)、PDPK1 (3-phosphoinositide dependent protein kinase 1)、AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1) 通路的一系列磷酸化反应活化 AKT。AKT 可以进一步磷酸化 FOXO1 (forkhead box O1), 引起 FOXO1 由细胞核到细胞浆的转位, 暂时抑制 FOXO1 在细胞核中发挥的转录调控作用^[4-5]。PCAF (P300/CBP associated factor) 是本课题组在群体水平发现的一个与肥胖关联的基因。作为一个组蛋白乙酰转移酶, PCAF 可以通过催化核心组蛋白上赖氨酸残基的乙酰化, 使染色质处于活化状态, 促进基因的转录。本研究旨在探讨 PCAF 在体外脂肪细胞分化模型中是否发挥转录调控作用及其发挥作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 3T3-L1 细胞系由天津医科大学基础医

学院杨洁教授课题组惠赠;DMEM 培养基和胎牛血清(Gibco);胰酶、青霉素和链霉素(Solarbio);胰岛素(Sigma);地塞米松(Solarbio);3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(Sigma);油红 O 染料(Sigma);PCAF 的 shRNA、ORF 序列、慢病毒载体和病毒包装试剂盒(GeneCopeia);Trizol 试剂(Invitrogen);ChIP 试剂盒(Cell signaling Technology);蛋白定量试剂盒、ECL 发光液(普利莱);PCAF 抗体(Cell signaling Technology);Foxo1 抗体(Santa Cruz Biotechnology);p-Foxo1(S256)抗体(Cell signaling Technology); β -actin 抗体(Bioss);引物(Invitrogen);qPCR Mix(全式金);Real-time PCR array(Qiagen)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和计数 3T3-L1 细胞复苏后接种于含 10%FBS 的 DMEM 培养液中,37℃、5%CO₂ 培养;用细胞计数板进行细胞计数。

1.2.2 病毒包装及稳定细胞株构建 参照 GeneCopeia 公司 Lenti-Pac 慢病毒包装试剂盒说明书。将包含目的基因 ORF 或 shRNA 序列的表达质粒与 HIV packaging mix 用脂质体转入 293T 细胞,转染后 48 h 收培养液上清,0.45 μ m PES 膜过滤后,即为病毒悬液。24 孔板接种 3T3-L1 细胞,用 0.1~0.5 mL 病毒悬液感染细胞。用嘌呤霉素筛选细胞后,再用流式细胞仪进行分选,得到稳定细胞株。

1.2.3 前脂肪细胞的诱导和 Oil-Red-O 染色 在细胞融合 48 h 后,换诱导培养基(含 0.5 mmol/L 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、1 μ mol/L 地塞米松、10 μ mol/L 胰岛素以及 10%FBS 的 DMEM),当天记为 Day0;在 Day2 更换为仅含胰岛素的全培养液。在不同时间点(如诱导后 10 min,1 h,1 d,2 d)收集细胞。在分化第 8 天进行 Oil-Red-O 染色:用异丙醇配制 0.5%的 Oil-Red-O 储存液,用时取 6 mL 加三蒸水 4 mL 混匀,定性滤纸过滤。细胞弃培养液,PBS 洗涤后,加入 10%中性甲醛固定,加入 Oil-Red-O 室温染色 30 min,洗掉多余的染料,镜下观察照相。

1.2.4 ChIP 实验 在正常 3T3-L1 细胞培养基中加入甲醛使蛋白与 DNA 交联,裂解细胞离心收集细胞核,将交联的蛋白-DNA 复合物用超声波打断成 200~1 000 bp 的片段;用抗 PCAF 抗体与蛋白-DNA 复合物在 4℃孵育过夜(同 Normal IgG 共同孵育的为阴性对照组);加入 ProteinG 磁珠 4℃孵育 2 h。高盐洗液清洗后,用磁力架收集磁珠,用洗脱缓冲液进行洗脱。蛋白酶 K 消化蛋白后,纯化得到 DNA。回收的 DNA 片段用于 ChIP on chip 实验;设计针对候选基因启动子区的引物,用 ChIP qPCR 进行

PCAF 与目的基因启动子区结合的定量分析。

1.2.5 PCR array 实验 参照 QIAGEN 公司 RT2 Profiler PCR Array 手册。收集文献中发表的某疾病或生理过程基因的 Real-time PCR 扩增引物整合进一个 96 孔板中,即为 1 个 Array,所有引物的扩增条件相同。将不同条件下提取 RNA 逆转录出的 cDNA 和 SYBR reaction mix 加入到 96 孔板中,可以比较出不同样本中相关基因表达量的差异。本研究所采用的 Mouse Adipogenesis PCR Array 包括与脂肪细胞分化、成熟相关的 84 个基因。扩增结果经在线软件分析(<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>),得到不同样本间各基因的表达差异。

1.2.6 Western blot 实验 提取细胞总蛋白,测定蛋白浓度后,进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后利用湿转法将凝胶上的蛋白条带转至 PVDF 膜上,经 5%脱脂奶粉封闭后分别用 PCAF(1:1 000)、Foxo1(1:500)、p-Foxo1(1:2 000)、 β -actin(1:2 000)抗体 4℃孵育过夜,用相应的 HRP 标记的二抗(1:10 000)室温孵育 1 h,最后应用 G-BOX 照相系统检测目的蛋白。

1.3 统计学方法 应用 SPSS18.0 软件进行定量实验的统计学分析,计量资料统计描述采用 $\bar{x} \pm s$,两组样本的比较采用独立样本的 *t* 检验,检验水准为 0.05。

2 结果

2.1 PCAF 在细胞分化过程中的表达 在细胞分化的 Day0、Day2、Day4、Day6 和 Day8 提取细胞总 RNA,用 Real-time PCR 检测 PCAF 的 mRNA 表达情况,结果发现 PCAF 在 Day2 的表达量最高,比 Day0 提高了约 2 倍($P < 0.05$)。由于某些调控因子的表达存在瞬时性,又在更细化的时间点 10 min、1 h、day1 和 day2 检测了 PCAF 表达,发现相对 Day0、10 min、1 h、6 h 和 day2 的 PCAF 表达量均略有上调,但 day1 的表达量却发生了下调(图 1)。

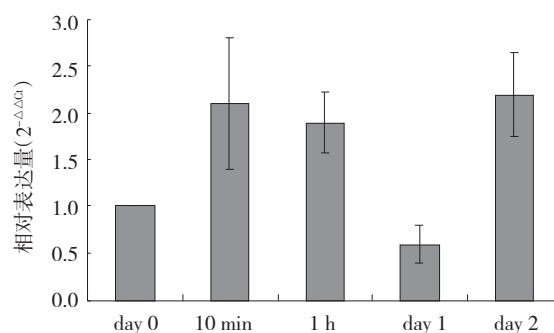


图 1 Real-time PCR 检测 PCAF 在 3T3-L1 细胞分化过程中的表达量

Fig 1 PCAF expression during 3T3-L1 differentiation detected by Real-time PCR

2.2 PCAF参与脂肪细胞分化的调控 包装含有PCAF的ORF、shRNA及无意义序列的慢病毒颗粒并感染3T3-L1细胞。用嘌呤霉素和BD Aria II流式细胞仪进行两轮筛选。转入无意义序列的细胞系命名为3T3-control;应用Real-time PCR定量分析,筛选得到的RNA干扰细胞株(3T3-sh1),PCAF的表达量下调了73%($P<0.05$);过表达细胞株(3T3-PCAF),PCAF的表达量上调3.8倍($P<0.05$);在蛋白水平也观察到了表达量的变化(图2)。将3种细胞系培养7d,进行细胞计数,发现PCAF表达量的上调或下调对细胞的增殖能力无明显影响(图3)。应用Oil-Red-O染色法对诱导分化8d的3种细胞系进行染色,发现过表达PCAF对细胞的分化能力没有明显的影响(图4),但PCAF敲低细胞系的分化能力明显下降。结果提示,PCAF确实参与了前体脂肪细胞向成熟脂肪细胞分化的调控。

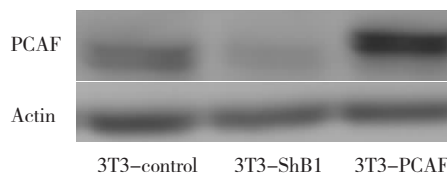


图2 Western blot检测PCAF在RNA干扰和过表达细胞株中的表达

Fig 2 Knockdown and overexpression of PCAF detected by Western blot

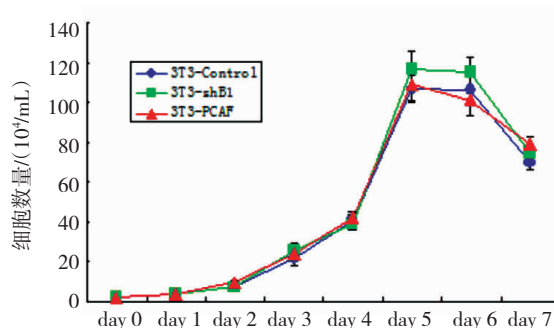


图3 PCAF表达上调/下调及对照组3T3-L1细胞的生长曲线

Fig 3 Growth curve of PCAF knockdown/overexpression/control cell lines

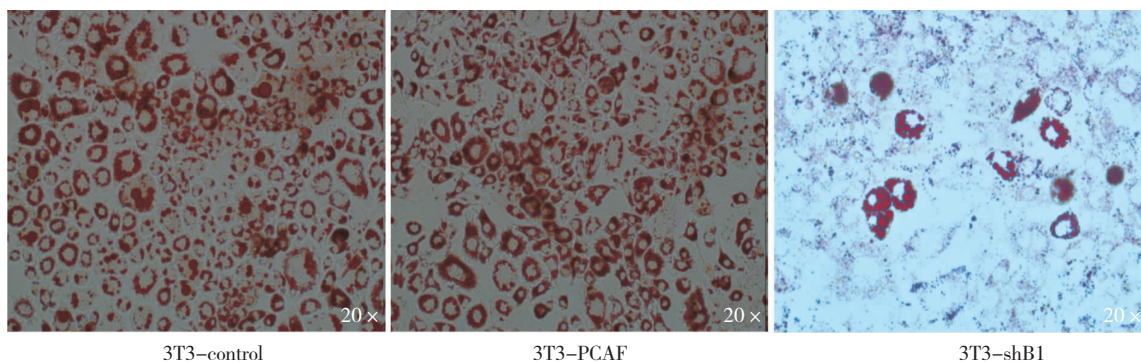


图4 PCAF表达上调/下调对细胞分化能力的影响(Oil-Red-O染色)

Fig 4 Effect of PCAF knockdown/overexpression on adipocyte differentiation (Oil-Red-O staining)

2.3 PCAF参与脂肪细胞分化调控的分子机制 分别收集诱导分化前(day0)和分化后两天(day2)的3T3-control细胞样品,应用PCAF抗体进行ChIP on chip实验,实验结果经PATHWAY(<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)分析,发现胰岛素信号通路(KEGG:mmu04910)很可能是PCAF调控的靶通路之一。分别收集诱导分化前(day0)和分化后两天(day2)的3T3-control,3T3-shB1和3T3-PCAF样品,应用PCR array技术筛选随PCAF表达上调、下调而发生表达变化的脂肪细胞分化相关基因,结果显示胰岛素通路关键信号分子FOXO1的表达随PCAF表达的上调/下调而升高和降低。用ChIP-qPCR检测了正常3T3-L1细胞内,在分化不同时间

点PCAF与胰岛素通路中的PI3K、PDPK1、AKT以及FOXO1基因启动子区的结合程度,结果发现,PCAF与PI3K、AKT启动子区的结合在不同时间点没有明显区别;但PCAF与PDPK1启动子区在1h和day1结合较强,在10min和day2相对较弱;而PCAF与FOXO1启动子区在10min、1h、day1结合较弱,在day2结合较强(图5)。相应的,PDPK1在10min、1h、day1的表达水平相对较高(图6);FOXO1的磷酸化程度在day0较强,10min减弱;在1h和day1有所加强,day2又减弱;且在1h和day1,FOXO1的磷酸化水平受PCAF表达水平的影响(图7)。FOXO1总表达量在day2的表达升高,并且受到PCAF表达水平的影响(图7)。

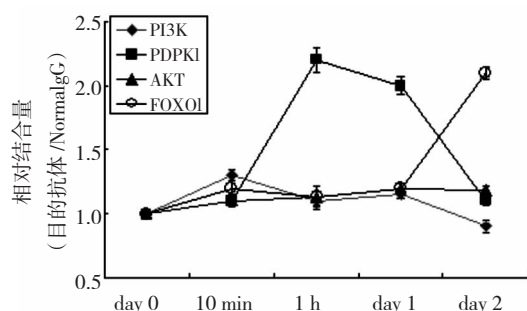


图 5 ChIP-qPCR 检测 PCAF 与 PI3K、PDPK1、AKT、FOXO1 启动子区的结合

Fig 5 ChIP assay of PCAF over promoters of PI3K, PDPK1, AKT and FOXO1 genes

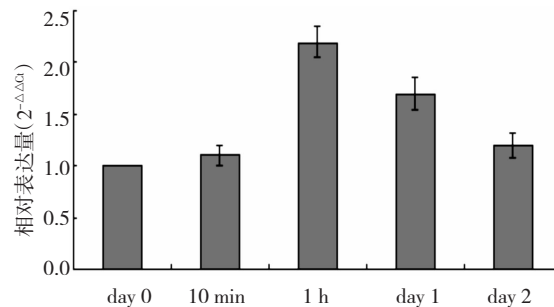
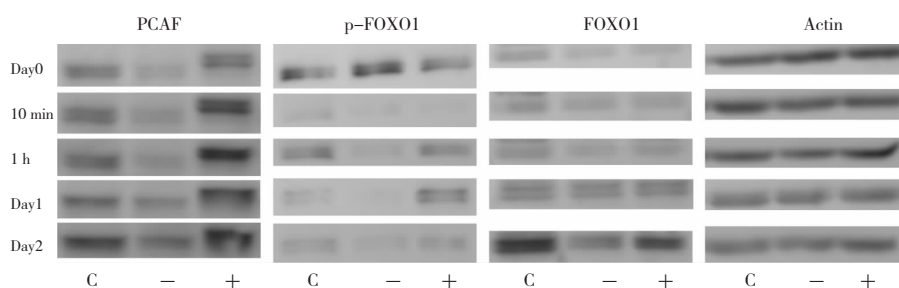


图 6 Real-time PCR 检测 PDPK1 在不同分化时间点的表达

Fig 6 Real-time PCR detection of PDPK1 expression during 3T3-L1 differentiation



C: 对照组; -: 干扰组; +: 过表达组

图 7 Western blot 检测分化不同时间点 FOXO1 的表达及 FOXO1 的磷酸化水平

Fig 7 Expression and phosphorylation of FOXO1 in different stages of adipogenesis of 3T3-L1 cells detected by Western blot

3 讨论

Wiper-Bergeron 等^[6]的研究认为 GCN5 在 3T3-L1 细胞中可以诱导 C/EBP β 和组蛋白的乙酰化,促进细胞分化,而 PCAF 在 3T3-L1 细胞中完全不表达。但 Wei 等^[7-8]的研究表明,在 3T3-L1 细胞的增殖过程中,PCAF 可以与 GRIP1 形成复合体,结合在 TR2 基因的启动子区调控 TR2 的表达,也就是说 PCAF 在 3T3-L1 细胞中是正常表达的。因此,作者在本研究中首先明确了 PCAF 的表达情况,结果通过 Real-time PCR 和 Western blot 发现 PCAF 在未分化和分化后的 3T3-L1 细胞中均有表达,且在分化后的细胞中表达量升高。

Montminy 等^[9]通过 PCAF 敲除小鼠研究发现,PCAF 对肝脏内由胰高血糖素诱导的糖异生途径有非常重要的调控作用,可以同 WDR5、CRTC2、CREB 等转录因子共同结合到 CRE 元件,促进 G6PC 等糖异生途径关键酶的转录。他们还发现 PCAF 所参与调控的基因数量不多,且主要集中在糖代谢和脂代谢等相关通路。而本研究显示,PCAF 也参与了胰岛素诱导的脂肪细胞分化,其发挥作用的途径与调控糖异生时不同,是作用于 PI3K/PDPK1/AKT/FOXO1

通路,并且在细胞分化的不同时间点,对不同基因的转录依次发挥了转录水平的调控作用。在分化的初始阶段(10 min~day1),PCAF 促进了 PDPK1 的表达,并进一步增强了 AKT 及 FOXO1 的磷酸化程度;在分化的中间阶段(day2),PCAF 又促进了 FOXO1 的表达,帮助细胞从克隆增殖阶段转入终末分化阶段。

前体脂肪细胞被诱导分化为成熟脂肪细胞的过程大致分两个阶段^[3,10]:(1)克隆增殖阶段:成纤维样的前体脂肪细胞发生融合和接触抑制后,在生脂激素及促有丝分裂复合物的作用下,马上重新进入细胞周期,并至少进行两次有丝分裂。(2)终末分化阶段:此阶段细胞重新进入生长静息阶段并退出细胞增殖期,细胞骨架和细胞外基质逐渐发生变化,细胞开始由不成熟脂肪细胞向成熟脂肪细胞类型转变。Nakae 等^[4]应用 3T3-F442A 发现,FOXO1 的活性在脂肪细胞分化前呈非磷酸化状态,在克隆增殖阶段因磷酸化被抑制,从而抑制了 p21 的活性,诱导细胞的有丝分裂。但是,细胞发生两次有丝分裂后,FOXO1 的表达升高并重新活化,在细胞核内同 PPAR γ 一起触发生长抑制,诱导细胞进入终末分化阶段^[4,11-13]。本课题应用 3T3-L1 细胞系研究发现,FOXO1 在分化不同时间点的磷酸化状态与 Nakae

等在3T3-F442A细胞系中的发现有一定差别。在day0(即未加入诱导剂前),FOXO1呈磷酸化失活状态;在加入诱导剂后10 min,FOXO1即呈现去磷酸化状态;在1 h和day1,其磷酸化状态又有所加强,协助细胞的有丝分裂;在day2,FOXO1的磷酸化状态又再次减弱,重新活化并协助细胞的终末分化。两项研究存在差别的原因可能有两点:(1)本课题对收集细胞样品的时间点进行了更细致的划分,观察到了加入诱导剂后短时间内FOXO1磷酸化水平的变化;(2)两项研究应用了不同的细胞系3T3-L1和3T3-F442A,虽然两个细胞系均分离自SWISS小鼠胚胎,但分化过程还存在一定差别,如3T3-F442A细胞系的分化仅需要胰岛素(或IGF1)单一刺激就能成功^[14]。

本研究初步阐明了组蛋白乙酰转移酶PCAF在3T3-L1前脂肪细胞分化过程中起较为重要的作用,其分子机制可能与FOXO1通路的活化有关。当然,本研究还存在一些未解决的问题,如FOXO1在加入诱导剂后发生了短时间的活化(即去磷酸化),这个步骤有何意义,是否有蛋白磷酸酶参与其中,值得我们深入研究。

参考文献:

- [1] Rosen E D, Spiegelman B M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis[J]. *Nature*, 2006, 444(7121): 847
- [2] Ju D P, Zhan L X. Developments in regulation of adipocytes differentiation[J]. *Chin J Cell Biol*, 2010, 32(5): 690
- [3] Farmer S R. Transcriptional control of adipocyte formation[J]. *Cell Metab*, 2006, 4(4): 263
- [4] Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, et al. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation[J]. *Dev Cell*, 2003, 4(1): 119
- [5] Davis K E, Moldes M, Farmer S R. The forkhead transcription factor FoxC2 inhibits white adipocyte differentiation [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(41): 42453
- [6] Wipier-Bergeron N, Salem H A, Tomlinson J J, et al. Glucocorticoid-stimulated preadipocyte differentiation is mediated through acetylation of C/EBPbeta by GCN5[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(8): 2703
- [7] Gupta P, Park S W, Farooqui M, et al. Orphan nuclear receptor TR2, a mediator of preadipocyte proliferation, is differentially regulated by RA through exchange of coactivator PCAF with corepressor RIP140 on a platform molecule GRIP1[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(7): 2269
- [8] Park S W, Huang W H, Persaud S D, et al. RIP140 in thyroid hormone -repression and chromatin remodeling of Crabp1 gene during adipocyte differentiation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(21): 7085
- [9] Ravnskjaer K, Hogan M F, Lackey D, et al. Glucagon regulates gluconeogenesis through KAT2B- and WDR5-mediated epigenetic effects[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(10): 4318
- [10] Zhou Y F, Peng J, Jiang S W. Role of histone acetyltransferases and histone deacetylases in adipocyte differentiation and adipogenesis [J]. *Eur J Cell Biol*, 2014, 93(4): 170
- [11] Nakae J, Kitamura T, Ogawa W, et al. Insulin regulation of gene expression through the forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) requires kinases distinct from Akt[J]. *Biochemistry*, 2001, 40(39): 11768
- [12] Nakae J, Biggs W H, Kitamura T, et al. Regulation of insulin action and pancreatic beta-cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1 [J]. *Nat Genet*, 2002, 32(2): 245
- [13] Nakae J, Barr V, Accili D. Differential regulation of gene expression by insulin and IGF-1 receptors correlates with phosphorylation of a single amino acid residue in the forkhead transcription factor FKHR [J]. *EMBO J*, 2000, 19(5): 989
- [14] 金生浩, 廖侃. 脂肪细胞分化的转录调控[J]. *生命的化学*, 1999, 19(5): 216

(2014-11-06 收稿)

欢迎投稿

欢迎订阅