

网络出版时间:2013-03-27 15:47

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130327.1547.009.html>

盐酸法舒地尔对 C3H10T1/2 细胞增殖与成脂分化的影响

屈长青^{1,2}, 常好才², 宫雯珺², 姬云涛²

(1 抗衰老中草药安徽省工程技术研究中心, 安徽 阜阳 236041; 2 阜阳师范学院 生命科学学院, 安徽 阜阳 236041)

[摘要] **【目的】**探讨 Rho 分子信号通路阻断剂盐酸法舒地尔(HA1077)对 C3H10T1/2 细胞体外增殖及成脂分化的影响。**【方法】**体外培养 C3H10T1/2 细胞株,用 HA1077 浓度梯度培养液(0(对照组),20,40,60,80,100 $\mu\text{mol/L}$)对其进行处理,通过 MTT 比色法和油红 O 染色法分别检测 C3H10T1/2 细胞的增殖和分化情况。**【结果】**HA1077 对 C3H10T1/2 细胞的体外增殖有一定的抑制作用,且呈现出一定的浓度依赖性。但 HA1077 可提高 C3H10T1/2 细胞的成脂分化效率,也呈浓度依赖性;且当 HA1077 浓度大于 60 $\mu\text{mol/L}$ 后,细胞成脂分化率与对照组差异极显著($P < 0.01$)。**【结论】**HA1077 可抑制 C3H10T1/2 细胞的增殖,但同时可以促进其成脂分化。

[关键词] 盐酸法舒地尔;C3H10T1/2;增殖;成脂分化

[中图分类号] Q253

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)04-0033-04

Effects of hydroxyl fasudil on proliferation and adipogenic differentiation of C3H10T1/2 cell lines

QU Chang-qing^{1,2}, CHANG Hao-cai², GONG Wen-jun², JI Yun-tao²

(1 Engineering Technology Research Center of Anti-aging Chinese Herbal Medicine, Fuyang, Anhui 236041, China; 2 School of Life Science, Fuyang Normal College, Fuyang, Anhui 236041, China)

Abstract: **【Objective】**This study aimed to explore the effects of Rho-kinase inhibitor fasudil hydrochloride (HA1077) on C3H10T1/2 cell lines. **【Method】**C3H10T1/2 cell lines were harvested and divided into two groups randomly, i. e., induction group and proliferation group with different HA1077 (20, 40, 60, 80, and 100 $\mu\text{mol/L}$). The effects of HA1077 on proliferation and differentiation of C3H10T1/2 cell lines were detected by MTT method and stained by oil red O separately. **【Result】**HA1077 could inhibit proliferation of C3H10T1/2 cell lines in a dose-dependent manner, while promote adipogenic differentiation of C3H10T1/2 cell lines in a dose-dependent manner as well. The cell adipogenic rate was significantly increased compared with the control group ($P < 0.01$) when the concentration of HA1077 increased to 60 $\mu\text{mol/L}$. **【Conclusion】**HA1077 has inhibition effects on proliferation of C3H10T1/2 cell lines and promoting effects on adipogenic differentiation. However, the specific mechanism of action remains unclear.

Key words: HA1077; C3H10T1/2; proliferation; adipogenic differentiation

脂肪生成是一个复杂的过程,受到环境及细胞 内外多个因子的综合调控。C3H10T1/2 细胞是鼠

[收稿日期] 2012-07-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31172182,31201788);安徽省级科研机构 2012 委托资助项目(2012KSLZX01ZD)

[作者简介] 屈长青(1972—),男,陕西西安人,副教授,硕士生导师,主要从事脂肪细胞增殖与分化机理研究。

E-mail: qucq518@163.com

[通信作者] 姬云涛(1972—),女,安徽阜阳人,副教授,博士,主要从事脂肪与肌肉发育调控研究。E-mail: jiyuntao@163.com

胚胎未分化的间充质干细胞,在不同因子作用下可向不同的细胞系分化,如成骨细胞、成软骨细胞、成肌细胞以及脂肪细胞^[1]等。在成脂诱导因子作用下,C3H10T1/2 细胞能定向分化为前体脂肪细胞,经过有丝分裂克隆扩增、终末分化等阶段,最终分化为成熟的脂肪细胞^[2],这个过程中会发生基因表达和细胞形态的变化^[3-4]。细胞形态的变化与细胞内的细胞骨架组装和解聚有关,细胞骨架系统通过整合素分子与细胞外基质相互作用,而整合素分子的信号传递依赖于 Ras 蛋白同源物(Ras homologue, Rho)途径,Rho 是一种低分子质量结合蛋白,其与鸟嘌呤三核苷酸磷酸(Guanosine Triphosphate, GTP)结合时呈现活化状态,而与鸟嘌呤二核苷酸磷酸(Guanosine Diphosphate, GDP)结合时则失去活性,通过这 2 种状态的转换,发挥着调控下游信号分子的开关作用。Rho 主要通过 Rho 激酶(Rho associated coil containing protein kinase, ROCK)信号转导通路调节肌动蛋白微丝骨架的聚合,影响细胞的极性和形态,从而在细胞生长、胞质分裂、细胞迁移、细胞-细胞和细胞-胞外基质的黏附、细胞的转化和侵袭等方面发挥作用^[5-6]。

盐酸法舒地尔(Fasudil),别名 HA1077,化学名为六氢-1-(5-磺酰基异喹啉)-1(H)-1,4-氮杂,是一种特异性抑制 Rho 激酶的新型药物,它主要通过抑制 Rho 激酶的活性而发挥广泛的药理作用^[7-8]。本试验利用 MTT 比色法和油红 O 染色提取法初步探讨 HA1077 对 C3H10T1/2 细胞增殖和分化的影响,旨在为调控体脂沉积提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试细胞 C3H10T1/2 细胞株购于中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所。

1.1.2 主要试剂及仪器 主要试剂有高糖 DMEM 和油红 O(Gibco 公司)、胎牛血清 FBS(Hyclone 公司)、HA1077(Selleck 公司)、四甲基偶氮唑蓝(MTT, Solarbio 试剂)、胰岛素(40 U/mL,为速效胰岛素制剂,江苏万邦生化医药股份有限公司)、地塞米松(索莱宝)、1-甲基-3-异丁基黄嘌呤 IBMX 和二甲基亚砷 DMSO(Sigma 公司)。成脂分化诱导液 I(DMEM 培养液中含体积分数 10% 胎牛血清、1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松、100 nmol/L 胰岛素、0.5 mmol/L IBMX),诱导液 II(DMEM 培养液含体积分数 10%

胎牛血清、100 nmol/L 胰岛素)。

主要设备有 CO₂ 培养箱(Forma Scientific 公司)、全自动酶标仪(Bio-Tek 公司)、自动双重纯水蒸馏器(MILLIPORE 公司)和倒置显微镜(OLYMPUS)。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养 C3H10T1/2 细胞用含体积分数 10% 胎牛血清、100 U/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素的 DMEM 高糖培养液在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养,细胞接近融合时用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化,1 000 r/min 离心传代培养,每 2~3 d 传代 1 次。

1.2.2 细胞增殖 将对数生长期的 C3H10T1/2 细胞接种于 96 孔培养板中,加完全培养基置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养,1 d 后细胞单层覆盖率可达 60% 左右,吸弃孔内培养液,换加含不同浓度(0, 20, 40, 60, 80 和 100 $\mu\text{mol/L}$)的 HA1077 培养液继续培养,每处理设 8 个复孔,每孔 120 μL ;3 d 后,每孔分别加入 20 μL MTT(质量浓度为 5 mg/mL)溶液,放入细胞培养箱中继续培养 5 h,然后吸弃孔内溶液,用 PBS 缓慢冲洗 3 次,每孔分别加入 120 μL DMSO 溶液,将 96 孔培养板放于微孔振荡器上振荡(100 r/min, 10 min),使蓝紫色结晶物充分溶解,用酶标仪于波长 490 nm 处测定各孔吸光度(OD₄₉₀),每处理重复测 3 次。计算细胞增殖抑制率:增殖抑制率=(对照组 OD₄₉₀ - 药物组 OD₄₉₀)/对照组 OD₄₉₀ × 100%。

1.2.3 细胞成脂分化 将传代的 C3H10T1/2 细胞接种于 96 孔培养板中,设诱导对照组(成脂分化诱导液 I)和不同浓度 HA1077 药物诱导试验组(成脂分化诱导液 I, HA1077 浓度分别为 20, 40, 60, 80 和 100 $\mu\text{mol/L}$),每处理设 8 个复孔,共 48 个孔,然后放置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养。2~3 d 后细胞单层覆盖率可达 90% 左右,吸弃孔内完全培养液,换成诱导液 I,2 d 后换成诱导液 II,之后再换成诱导液 I,2 d 后再换成诱导液 II,如此重复 2 次,以后都用完全培养液培养,直至 90% 以上的细胞都分化为成熟的脂肪细胞。取不同时间段(10, 12, 14 和 16 d)的分化细胞进行油红 O 染色后进行显微观察并拍照。

油红 O 染色检测参照 Li 等^[9]的方法。取出分化培养 15 d 的 96 孔细胞培养板,吸弃孔内培养液,用 PBS 缓慢冲洗 3 次,之后用质量分数 4% 的多聚甲醛固定 30 min,吸弃固定液后用 PBS 缓慢冲洗 3

次,蒸馏水洗 3 次,32 ℃干燥,油红 O 工作液染色 40 min,吸弃油红 O 染液后用 PBS 缓慢冲洗 3 次,用纯异丙醇萃取 15 min,用酶标仪于 490 nm 波长处检测吸光度,记录 OD₄₉₀ 值。

1.2.4 数据统计学处理 试验数据均采用“平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)”表示,采用 SPSS 13.0 统计软件包对数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),方差分析采用 LSD 法,组间比较 $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 HA1077 对 C3H10T1/2 细胞增殖的影响

HA1077 对 C3H10T1/2 细胞增殖的影响如表 1 所示。

表 1 HA1077 对 C3H10T1/2 细胞增殖的影响

Table 1 Inhibition of HA1077 to proliferation of C3H10T1/2 cell lines

HA1077 浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) HA1077 concentration	OD ₄₉₀ 值 Value of OD ₄₉₀	增殖抑制率/% Inhibition rates
0(CK)	0.607±0.115	0
20	0.352±0.117 a	42.01±2.37 a
40	0.334±0.181 a	45.00±4.12 a
60	0.305±0.148 ab	49.75±3.77 ab
80	0.298±0.038 ab	50.91±1.13 ab
100	0.188±0.133 b	69.03±2.57 b

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著($P<0.05$)。
Note:Data in same column with different lowercase letters indicate significant difference($P<0.05$).

由表 1 可以看出,HA1077 对 C3H10T1/2 细胞株的增殖有抑制作用,且随着 HA1077 浓度的增大,抑制率逐渐增加,呈现出一定的浓度依赖性。

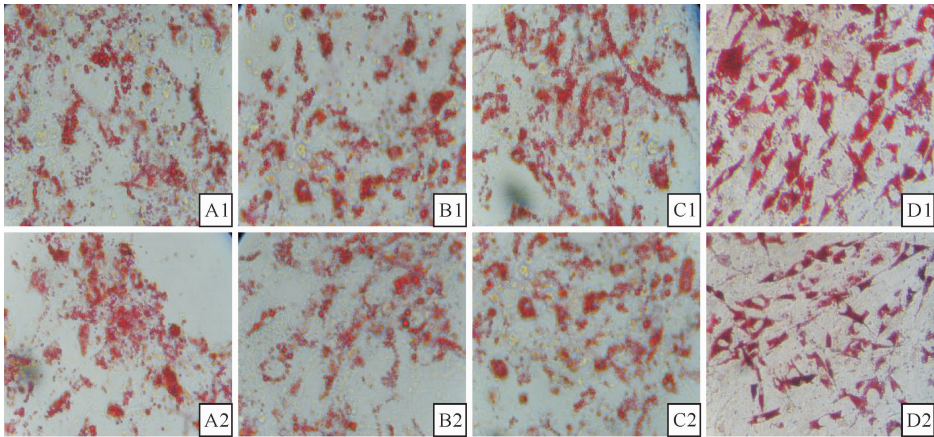


图 2 60 $\mu\text{mol/L}$ HA1077 对 C3H10T1/2 细胞成脂分化影响的显微观察(油红 O 染色, $\times 100$)
A1—D1 依次为 60 $\mu\text{mol/L}$ HA1077 诱导培养液诱导第 10,12,14 和 16 天的 C3H10T1/2 细胞;A2—D2 分别为 A1—D1 的对照
Fig.2 Shape of C3H10T1/2 cells in 60 $\mu\text{mol/L}$ HA1077 treatment groups (Oil red O staining, $\times 100$)
A1—D1 were C3H10T1/2 cells cultured under induction medium with 60 $\mu\text{mol/L}$ HA1077 at 10th, 12th,14th,16th day, respectively;A2—D2 were control groups of A1—D1, respectively

HA1077 浓度为 20~80 $\mu\text{mol/L}$ 时,增殖抑制率增加比较平缓;当 HA1077 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时增殖抑制率有明显上升趋势,达到 69.03%。

2.2 HA1077 对 C3H10T1/2 细胞成脂分化的影响

油红 O 染色提取法检测结果如图 1 所示。由图 1 可以看出,HA1077 对 C3H10T1/2 细胞株的分化有促进作用,HA1077 低浓度时促进作用不明显,HA1077 高浓度时促进作用显著,呈现出一定的浓度依赖性。60 $\mu\text{mol/L}$ HA1077 对 C3H10T1/2 细胞的成脂分化作用见图 2。从图 2 可以看出,HA1077 对 C3H10T1/2 细胞的分化有促进作用,与对照组相比,细胞内脂滴含量增多。

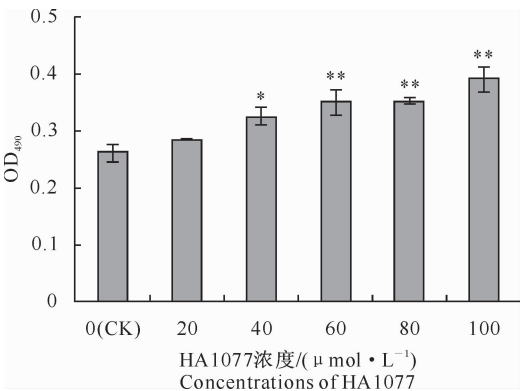


图 1 HA1077 对 C3H10T1/2 细胞成脂分化的影响
与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$
Fig.1 Effects of different concentrations of HA1077 on differentiation of C3H10T1/2 cell lines
Compared with control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3 讨 论

HA1077 是一种钙离子拮抗剂,也是广谱蛋白激酶抑制剂,通过抑制多种蛋白激酶,如 Rho 激酶、肌球蛋白轻链激酶 (MLCK)、蛋白激酶 A、G、C 而发挥作用,对上述酶的抑制常数 (K_i) 值分别为 0.33, 0.36, 1.6, 1.6, 3.3 $\mu\text{mol/L}$ ^[10]。本试验结果表明,HA1077 对 C3H10T1/2 细胞的增殖有抑制作用,这与陈雪彦等^[11]在大鼠肺动脉平滑肌细胞上所得到的结果一致。

Rho/ROCK 信号通路是细胞内重要的信号通路之一,它通过调节细胞内肌动蛋白骨架的聚合状态而扮演“分子开关”的角色,参与调节细胞骨架蛋白的合成、降解、移动和收缩等,最终影响细胞的收缩、粘附、增殖、凋亡、迁移等生物学行为和功能。HA1077 为 ROCK 抑制剂,与 ATP 竞争 ROCK 催化区的 ATP 结合位点,从而通过竞争性拮抗作用阻断 ROCK 的活性,阻断 Rho/ROCK 信号通路。本试验再次证明了 Rho/ROCK 激酶信号通路在细胞增殖中的作用。沈雷等^[12]报道,HA1077 能促进骨髓间充质干细胞向表皮细胞分化;彭涛等^[13]证明,HA1077 能促进脂肪干细胞诱导为表皮样细胞。细胞分化是指在个体发育过程中,由一个或一种细胞增殖产生的后代在形态、结构和功能上发生稳定性差异的过程,细胞形态和结构上的差异必然与细胞骨架组装和解聚有关^[14]。McBeath 等^[15]研究证明,细胞形态、细胞骨架张力和相关基因表达影响干细胞的成脂及成骨分化命运。本试验发现,HA1077 有促进 C3H10T1/2 向脂肪细胞分化的作用,且呈现出一定的浓度依赖性,推测这可能与促分裂素原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinases, MAPK) 信号通路有关。

Toshio 等^[16]研究表明, p38 MAPK 能通过激活转录因子-2 (Activating transcription factor-2, ATF-2) 促进脂肪细胞中 PPAR γ 的表达,促进成脂分化。谢在春等^[2]研究也发现, BMP2 具有促进 C3H10T1/2 细胞成脂分化的作用,并发现 BMP2 诱导后, BMP2 信号通路上的关键分子 Smad1/5/8 及 p38 磷酸化水平有所提高,说明 BMP2 的诱导激活了 BMP2 所依赖的 Smad 通路及 MAPK 通路,并通过这 2 条通路的信号传导,激活下游的转录因子,从而促进成脂。HA1077 在成脂诱导分化过程中是否也存在类似的机制,还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Reznikoff C A, Brankow D W, Heidelberder C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division [J]. *Cancer Res*, 1973, 33(12): 3231-3238.
- [2] 谢在春, 陈琼玉, 杨松海, 等. BMP2 具有诱导 C3H10T1/2 细胞成脂肪分化的能力 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2008, 24(2): 142-147.
Xie Z C, Chen Q Y, Yang S H, et al. BMP2 induces adipogenic differentiation of C3H10T12 cells [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 24(2): 142-147. (in Chinese)
- [3] Pospisilik J A, Schramek D, Schnidar H, et al. Drosophila genome-wide obesity screen reveals hedgehog as a determinant of brown versus white adipose cell fate [J]. *Cell*, 2010, 140: 148-160.
- [4] He J, Le D S, Xu X, et al. Circulating white blood cell count and measures of adipose tissue inflammation predict higher 24-h energy expenditure [J]. *Eur J Endocrinol*, 2010, 162: 275-280.
- [5] Emons M, Settlemen J. Rho family GTPases: More than simple switches [J]. *Trends Cell Biol*, 2000, 10: 415-419.
- [6] Etienne-Manneville S, Hall A. RhoGTPase in cell biology [J]. *Nature*, 2002, 420(6916): 629-635.
- [7] 刘贤华. HA1077 促进骨髓间充质干细胞修复皮肤创面的研究 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2009.
Liu X H. Study on the HA1077's enhancement effect of the wound repair by mesenchymal stem cells [D]. Chongqing: Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2009. (in Chinese)
- [8] 沙德潜. 盐酸法舒地尔促进脂肪干细胞体外诱导为表皮细胞的实验研究 [D]. 河北石家庄: 河北医科大学, 2010.
Sha D Q. Hydroxyl fasudil induce human adipose derived stem cells into epidermic cells *in vitro* [D]. Shijiazhuang, Hebei: Hebei Medical University, 2010. (in Chinese)
- [9] Li H X, Luo X, Liu R X, et al. Roles of Wnt/ β -catenin signaling in adipogenic differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008, 291(1/2): 116-124.
- [10] Uehata M, Ishizaki T, Satoh H. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension [J]. *Nature*, 1997, 389(6654): 990-994.
- [11] 陈雪彦, 刘焕龙, 潘振华, 等. Rho/Rho 激酶通路在 5-羟色胺诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用 [J]. *细胞生物学杂志*, 2009, 31(6): 853-858.
Chen X Y, Liu H L, Pan Z H, et al. Rho/ROCK signal pathway in 5-HT-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2009, 31(6): 853-858. (in Chinese)

(下转第 44 页)