

## 游离脂肪酸对小鼠骨骼肌干细胞分化及功能的影响

汤婷婷,吕珊,盛云露,吕伊凡,丁国宪\*

(南京医科大学第一附属医院老年医学科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:观察棕榈酸(palmitic acid,PA)对小鼠骨骼肌干细胞分化及功能的影响,为治疗衰老相关的肌少症寻找新思路。方法:对小鼠骨骼肌干细胞诱导分化后,同时予 PA(100  $\mu\text{mol/L}$ )干预,用荧光染色法、荧光定量 PCR 测定成肌基因肌球蛋白重链(myosin heavy chains,MyHC)表达;用 seahorse 能量代谢仪检测细胞的氧耗增加率,荧光定量 PCR 检测线粒体融合基因线粒体融合素基因 1(mitofusin1,Mfn1)、视神经萎缩症蛋白基因(opticatrophy 1,Opa1)和裂解基因发动相关因子基因(dynamin 1-like,Drp1)、线粒体分裂素基因 1(fission 1,Fis1)的相对表达量。结果:PA 刺激后,MyHC 荧光表达量下降,肌小管融合率减低,同时 seahorse 能量代谢仪检测细胞的氧耗增加率(oxygen consumption rate,OCR)降低( $P<0.05$ );线粒体融合基因无明显异常,但裂解基因表达增加,融合/裂解比值下降( $P<0.05$ )。结论:游离脂肪酸抑制骨骼肌干细胞分化、影响线粒体氧耗功能,这可能是通过影响线粒体 Drp1 基因,增加线粒体裂解实现的。

**[关键词]** 棕榈酸;骨骼肌干细胞;氧耗;线粒体

**[中图分类号]** R329.26

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)05-544-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170505

## Effects of free fatty acid on the differentiation and function of skeletal muscle stem cells in mice

Tang Tingting, Lü Shan, Sheng Yunlu, Lü Yifan, Ding Guoxian\*

(Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** The effects of palmitic acid (PA) on the differentiation and function of mouse skeletal muscle stem cells was detected for the new medicine-sarcopenia. **Methods:** One hundred  $\mu\text{mol/L}$  PA was added to skeletal muscle stem cells. The morphological changes of the cultured cells were observed, the myosin heavy chains (MyHC) of the culture cells was determined using immunocytochemistry and the expression of the gene was determined by real time PCR. Oxygen consumption rates (OCR) was measured by XFe24 extra cellular flux analyzer. Levels of mitochondrial fusion and fission marks such as Mfn1, Opa1, Drp1, Fis1 were measured. **Results:** When the cells treated with PA, fluorescent expression of MyHC was decreased and the fusion rate of myotube also reduced. The oxygen consumption rate (OCR) in the presence of PA was decreased ( $P<0.05$ ). The fusion mark was not significantly changed, but mitochondrial fusion index (Mfn1-to-Drp1ratio) was significantly increased. **Conclusion:** The results showed that PA inhibited the differentiation of skeletal muscle stem cells and OCR of mitochondria. The effects of PA on myogenesis were carried out through decreasing the fusion of mitochondria.

**[key words]** palmtic acid; skeletal muscle stem cell; oxygen consumption; mitochondria

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(05):544-548]

随着全球老龄化和衰老研究的深入,肌少症(sarcopenia)已成为现代老年医学研究的热点。肌少症是进行性、全面性的骨骼肌量和强度的丢失,是人体老化的显著表现之一<sup>[1-2]</sup>。流行病学调查指出,50

岁以后人体肌肉质量每年下降 1%~2%,肌肉力量下降更为明显,50 岁以后每年约下降 1.5%,60 岁后每年下降 3%,大于 80 岁的人,肌少症的发病率高达 11%~50%。骨骼肌既是运动器官,又是蛋白质储存库和主要的糖代谢组织,因此,肌少症对老年人健康的影响是多方面的。肌少症与老年人跌倒、生活能力下降、伤口延迟愈合有关,增加老年人的不良预后,

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81370950)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail: Dinggx@njmu.edu.cn

延长住院时间, 增加残障率和死亡率<sup>[3]</sup>。

肌少症与营养、运动、疾病(如炎症反应、恶性肿瘤及内分泌疾病)等因素有关, 而老龄化是肌少症发病的独立危险因素<sup>[4]</sup>。老龄人的雄激素水平降低、营养物质缺乏、下运动神经元减少等因素使平衡倾向肌肉降解一方, 更为重要的是, 骨骼肌的再生、修复能力明显减退<sup>[5]</sup>。众所周知, 负责骨骼肌再生的是骨骼肌干细胞(skeletal muscle stem cell, MuSC), 骨骼肌干细胞是位于肌肉基膜和基底膜之间的一群细胞, 正常情况下, 肌肉受损时, 处于静息状态的骨骼肌干细胞被激活进入增殖阶段, 但随着老化, 干细胞不仅自我更新能力下降, 而且在损伤修复完成后恢复静息状态的干细胞数量也明显减少<sup>[6-7]</sup>。因而, 有效改善干细胞功能, 就能够增强骨骼肌的再生及损伤后修复, 明显改善肌少症。

以往研究发现热卡限制(calorie restriction, CR), 减少正常饮食热卡的 30%~50%, 不仅可延长寿命, 还可减少或延缓老年性疾病如肌少症的发生, 是有效的抗衰老手段<sup>[8-9]</sup>。最新研究发现 CR 后不仅骨骼肌内干细胞特异基因 Pax7 表达增加, 而且干细胞内线粒体数量、氧化呼吸链酶及有氧利用率增高<sup>[9]</sup>。但目前 CR 影响干细胞的机制仍然不清楚。相反, 西方生活方式(高脂饮食)则被认为是老化加速器, Hu 等<sup>[7]</sup>高脂喂养模型中发现高脂组小鼠不仅干细胞肌肉再生能力下降, 而且肌细胞分化为肌管过程也受损。因此推测, 有效降低体循环中的游离脂肪酸可能会促进骨骼肌干细胞的再生、分化能力。

本研究采用荧光染色法、荧光定量 PCR、细胞氧耗测定等技术, 观察游离脂肪酸(棕榈酸, PA)对小鼠骨骼肌干细胞分化和功能影响, 为临床上衰老相关的肌少症防治提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

野生型小鼠 C57BL/6J 购于南京大学模式动物研究所; Corbett Rotor-Gene 3000 荧光定量 PCR 仪(Corbettresearch 公司, 澳大利亚); 海马 XF24 能量代谢仪(Seahorse Bioscience 公司, 美国)。

磷酸缓冲盐溶液(PBS, Hyclone 公司, 美国); F10 培养液、RPMI1640 培养基、胎牛血清、马血清、0.25%胰蛋白酶、青链霉素(Gibco 公司, 美国); 羊抗鼠 MyHC(Upstate 公司, 美国); 胶原蛋白水解酶(Collagenase D)、II 型胶原酶(Dispase II)(Roche 公司, 美国); 红细胞裂解液(碧云天公司, 上海); Human re-

combinant bFGF、TRIzol(Invitrogen 公司, 美国); 逆转录所用试剂 M-MLV(Promega 公司, 美国); 荧光定量 PCR 所用试剂 QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix(ToYoBo 公司, 日本); 寡霉素(OL)、碳酰氰-4-三氟甲氧基苯腙 (FCCP)、鱼藤酮 (Rot)、刀豆蛋白 A (ConA)、棕榈酸(palmitic acid, Sigma 公司, 美国); 牛血清白蛋白(BSA, Wako 公司, 日本)

### 1.2 方法

#### 1.2.1 骨骼肌干细胞原代培养及分化

获取骨骼肌干细胞: 将 3~4 周 C57BL/6J 小鼠拉颈处死后, 取四肢肌肉, 并充分剪碎, 加入混合酶(Collagenase D+Dispase II)消化, 待肌肉组织充分消化后, 使用带血清的培养基终止消化。消化液经 70  $\mu$ m 滤网过滤, 去除未消化的组织块及其他杂质, 加入红细胞裂解液去除血细胞。多次离心, 弃上清液, 所得沉淀使用 F10 培养液重悬。

制备 T 细胞条件培养基: 取 C57BL/6J 小鼠新鲜脾脏, 将脾脏充分研碎, 用 PBS 冲洗过 40  $\mu$ m 滤网消除筋膜组织, 滤过液中加入红细胞裂解液去除血细胞。多次离心(1 700 r/min, 7 min), 弃上清液, 所得细胞用 20 mL RPMI1640 培养基重悬细胞, 加入 2.5  $\mu$ g/mL ConA 诱导 T 细胞分化。48 h 后补加等体积培养基继续培养 24 h, 收集细胞培养液为 T 细胞条件培养基。

将肌肉干细胞培养在 Collagen I 包被的 F10 培养基 (F10 medium containing 20% FBS、T 细胞条件培养基 (F10 培养基:T 细胞条件培养基=1:1 和 25 ng/mL FGF)培养的肌肉干细胞。每隔 48 h 传代 1 次, 经胰酶消化后接种于 6 孔板中, 待细胞长至 70%~80%, 加入分化培养液, 同时加入 100  $\mu$ mol/L PA, 对照组为溶剂 10% BSA, 以后加药随换液。

#### 1.2.2 细胞总 RNA 抽提、cDNA 逆转录及目标基因定量 PCR 测定

孔板中细胞吸弃培养液后, 每孔加入 1 mL TRIzol 充分裂解后收集细胞, 按试剂盒方法进行。提取所得 RNA 进行逆转录、以上述细胞的 cDNA 为模板用相关引物进行荧光定量 PCR 扩增, 引物序列见表 1。PCR 总反应体系为 10  $\mu$ L, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 80 $^{\circ}$ C 读板 5 s, 40 个循环, 72~94  $^{\circ}$ C, 每升高 0.5 $^{\circ}$ C 读 1 次作出熔解曲线, 以 GAPDH 基因作为内参照。

#### 1.2.3 免疫荧光 MyHC 表达

细胞经 4%多聚甲醛室温固定 15 min 后, 0.5%

表 1 荧光定量 PCR 引物序列  
Table 1 Primer sequences for real-time qPCR

目的基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
GAPDH	TCACCACCATGGAGAAGGC	GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA
MyHC- II d/x	GACTACAACATCGCTGGCTG	CTTGGCCCCCTTCTTTCCAC
Mfn1	TGGGGAGGTGCTGTCTCGGA	ACCAATCCCCTGGGGAGGA
Opa1	ATCATCTGCCACGGGTGTT	GAGAGCGGTCATCATCTCA
Drp1	ACTGGCCCCCTCCAGCTTA	TGATCCACATCTGCTGGAAGGT
Fis1	GCACGCAGTTTGAATACGCC	CTGCTCCTCTTTGCTACCTTTGG

GAPDH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;MyHC- II:肌球蛋白重链;Mfn1:线粒体融合素基因 1;Opa1:视神经萎缩症蛋白基因;Drp1:发动相关因子基因;Fis1:线粒体分裂素基因 1。

TritonX-100 透膜处理 15 min,0.5%BSA 室温包被 1 h 后 MyHC 一抗(1:500)4℃孵育过夜,再经荧光标记的二抗孵育 1 h,封片后显微镜观察。每一步处理后均需 PBS 洗 3 次。

1.2.4 能量代谢测定

海马 XF24 能量检测仪测定细胞氧耗代谢率。将细胞接种于特制的氧耗微孔板内,待细胞长至 70%~80%,加入分化培养液,同时加入 PA 及对照组溶剂。检测前 1 d 予更换培养液,同时加入 CAMP (10 μL/mL),37℃孵育。检测当天取出检测板并顺序加入 OL、FCCP、Rot 使其终浓度为 1 μmol/L,分别代表基础呼吸率、最大呼吸率和基线呼吸率。

1.3 统计学方法

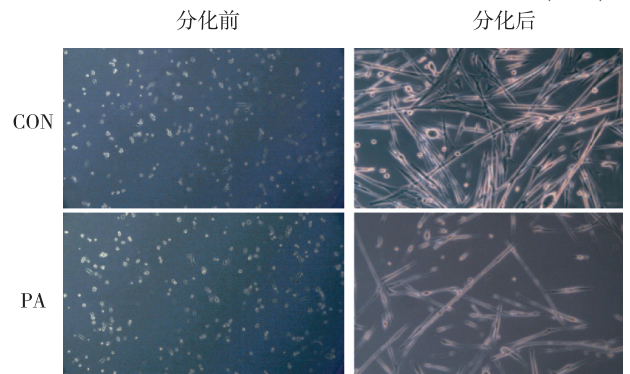
所有数据以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,运用 SPSS19.0 软件进行统计分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脂肪酸影响骨骼肌干细胞分化

细胞形态观察:原代骨骼肌卫星细胞为分布均匀且折光率高的小圆形细胞,加入分化诱导液后,镜

下可见细胞变长,呈纺锤形,并同向排列,细胞间相互融合和肌管形成,部分肌管可出现轻微的收缩现象。脂肪酸刺激细胞,细胞融合低、肌管纤细(图 1)。



分化前干细胞圆形、折光率高;加分化培养基 3 d 后,细胞融合、肌管形成,可见肌管轻微的收缩现象。

图 1 PA 刺激前后骨骼肌干细胞的形态变化(×200)  
Figure 1 The morphological changes of skeletal stem cells with or without PA treated(×200)

MyHC 是成肌特异基因,通过荧光染色法特异性标记 MyHC,同时用荧光定量 PCR 检测其基因水平。结果显示:脂肪酸刺激组细胞有趋向性,但细胞融合低、MyHC 基因表达下降( $P < 0.05$ ,图 2)。

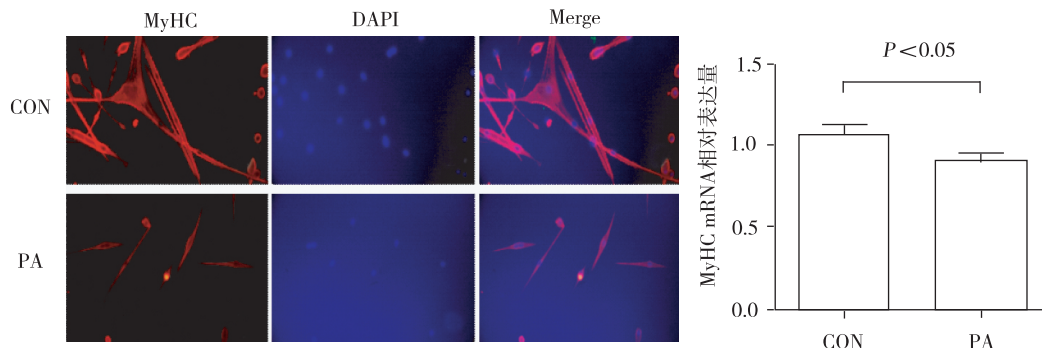
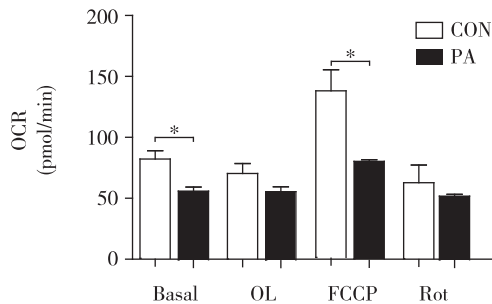


图 2 脂肪酸刺激组与溶剂组干细胞分化特异性基因 MyHC 表达(×400)  
Figure 2 The expression of MyHC gene between PA treated group and control(×400)

## 2.2 脂肪酸抑制线粒体功能

线粒体是骨骼肌重要产能单位,是氧化磷酸化及合成三磷酸腺苷(ATP)重要场所。使用细胞能量代谢仪测定对照组及 PA 刺激组的线粒体 OCR 值,比较两组间基础代谢率、最大呼吸率、基线呼吸率,发现 PA 刺激组的基础呼吸率、最大呼吸率明显低于对照组( $P<0.05$ ,图 3)。



两组比较,\* $P<0.05$ ( $n=5$ )。

图 3 脂肪酸刺激组与溶剂组细胞耗氧量增加率(OCR)  
Figure 3 Comparison levels of oxygen consumption rate (OCR) between PA treated group and control

线粒体为动态细胞器,通过频繁而持续的融合与分裂,可以精确调节细胞的生命活动,调节融合基因包括 Mfn1、Opa1,裂解基因包括 Fis1、Drp1,通常情况下融合与分裂速度相当,保持线粒体的数目与形态稳定。当给予脂肪酸刺激后,测定线粒体融合及裂解基因发现其 Mfn1、Opa1、Fis1 无明显差异,但 Drp1 升高 1.6 倍( $P<0.05$ ),且 Mfn1/Drp1 降低 1.3 倍( $P<0.05$ ,图 4)。

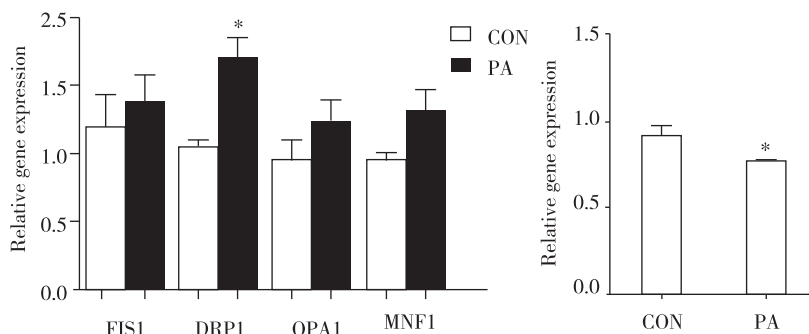
## 3 讨论

骨骼肌干细胞介导肌肉再生及修复损伤,当骨骼肌受到损伤时,静息状态的干细胞激活、分裂、增

殖,一部分重新回到静息状态,另一部分则进一步分化融合形成肌小管、肌纤维,参与骨骼肌的修复<sup>[10]</sup>。随着老化,干细胞不仅自我更新能力下降,而且在损伤修复完成后恢复静息状态的干细胞数量也明显减少,表现为干细胞增殖抑制及分化障碍<sup>[5]</sup>。早有研究发现,在小鼠内植入干细胞,可以促进新的骨骼肌纤维和干细胞集落形成<sup>[11]</sup>,提示干细胞在骨骼肌生长、修复和维持的过程中扮演了关键角色,改善干细胞功能可有效延缓肌少症发生。

近年来,肌少症的发病率越来越高,很多因素(如营养、运动、疾病、激素)均可导致或加重其发生、发展,它们之间相互作用、联系紧密,其中年龄是最为重要的影响因素。衰老过程中,干细胞自身不仅出现 DNA 损伤、关键蛋白异常表达,导致干细胞激活、分化异常<sup>[10]</sup>。而且 Conbov 等<sup>[11]</sup>在进行活体骨骼肌移植实验发现,干细胞微环境中的调节因素是影响干细胞激活、增殖分化潜能发挥的关键因素。CR 是经典的抗衰老手段,已有一些研究发现 CR 能够增加小鼠内干细胞数量,增加干细胞再生功能;相反高脂喂养模型鼠体内肌肉干细胞数量明显减少,且骨骼肌细胞分化成肌小管过程受损<sup>[7,12]</sup>。虽然,CR 改善干细胞功能的具体机制还不清楚,本研究推测体循环中的游离脂肪酸可能是影响骨骼肌干细胞的再生、分化能力重要因素。本研究通过体外培养原代骨骼肌干细胞,予游离脂肪酸进行干预,发现脂肪酸刺激细胞后,成肌特异基因 MyHC 表达量明显下降,细胞融合低、肌管纤细,进一步证实干细胞增殖、分化能力与干细胞暴露的高脂环境有关。

线粒体是细胞内氧化磷酸化和 ATP 合成的主要场所。不仅为细胞生命活动提供能量,而且在维持干细胞多能性、诱导分化等方面发挥重要作用。研究



A:线粒体融合及裂解蛋白表达,DRP1 在脂肪酸刺激时增加( $P<0.05$ , $n=6$ );B:线粒体融合基因/裂解基因( $P<0.05$ , $n=6$ )。

图 4 脂肪酸刺激组与溶剂组线粒体融合、裂解相关基因的定量 PCR 检测

Figure 4 The detection of marker genes of mitochondrial fusion and fission in PA treated group and control

发现,线粒体可通过调节细胞周期,参与调控骨骼肌干细胞分化的启动和进程,且随着分化,线粒体有氧代谢逐渐占据优势<sup>[13]</sup>。近年来提出,线粒体功能障碍可作为骨骼肌干细胞衰老的生物标志<sup>[14]</sup>。线粒体功能与结构密不可分,线粒体动态形态可以精确调节细胞的生命活动<sup>[16]</sup>。线粒体结构受融合 Mfn1/2、Opa1 及裂解 Drp1、Fis1 影响,通过频繁而持续的融合与分裂,使其形态、分布、数量等发生改变<sup>[15-16]</sup>。线粒体融合-分裂的动态平衡对线粒体功能的维持起着至关重要的作用。Liu 等<sup>[17]</sup>高脂诱导肥胖动物模型发现肥胖鼠线粒体融合降低、裂解增加,呼吸链活动异常,合成 ATP 功能受损;饱和脂肪酸刺激成肌细胞 C2C12,可诱导线粒体裂解增加<sup>[18]</sup>。本研究猜想游离脂肪酸是否通过影响线粒体结构、功能异常,从而抑制骨骼肌干细胞分化。实验发现,给予干细胞脂肪酸刺激后,其氧耗率下降,同时检测线粒体融合基因及裂解基因,提示融合基因/分裂基因下降,进一步证实游离脂肪酸抑制线粒体功能,这可能与线粒体发生融合、分裂异常,导致线粒体结构异常相关。

综上所述,本研究结果提示,游离脂肪酸可通过影响线粒体的融合裂解平衡进而抑制骨骼肌干细胞分化,降低细胞氧化代谢率。因而,低脂饮食方式可有效降低体循环中的游离脂肪酸,从而可能促进骨骼肌干细胞分化,这为延缓衰老相关肌少症的发生提供线索。

#### [参考文献]

- [1] Beaudart C, Rizzoli R, Bruyere O, et al. Sarcopenia: burden and challenges for public health [J]. Arch Public Health, 2014, 72(1):45-52
- [2] Hirani V, Blyth F, Naganathan V, et al. Sarcopenia is associated with incident disability, institutionalization, and mortality in community-dwelling older men: The concord health and aging in men project [J]. J Am Med Dir Assoc, 2015, 16(7):607-613
- [3] Pérez-López FR, Ara I. Fragility fracture risk and skeletal muscle function [J]. Climacteric, 2016, 19(1):37-41
- [4] Kalyani RR, Corriere M, Ferrucci L. Age-related and disease-related muscle loss; the effect of diabetes, obesity, and other diseases [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2014, 2: 819-829
- [5] Bigot A, Duddy WJ, Ouandaogo ZG, et al. Age-associated methylation suppresses SPY1, leading to a failure of Re- quiescence and loss of the reserve stem cell pool in elderly muscle [J]. Cell Rep, 2015, 13(6):1172-1182
- [6] Blau HM, Cosgrove BD, Ho AT. The central role of muscle stem cells in regenerative failure with aging [J]. Nat Med, 2015, 21:854-862
- [7] Hu Z, Wang H, Lee IH, et al. PTEN inhibition improves muscle regeneration in mice fed a high-fat diet [J]. Diabetes, 2010, 59:1312-1320
- [8] Yang L, Licastro D, Cava E, et al. Long-term calorie restriction enhances cellular quality-control processes in human skeletal muscle [J]. Cell Rep, 2016, 14:422-428
- [9] Cerletti M, Jang YC, Finley LW, et al. Short-term calorie restriction enhances skeletal muscle stem cell function [J]. Cell Stem Cell, 2012, 10:515-519
- [10] Sousa-Victor P, Muñoz-Canoves P. Regenerative decline of stem cells in sarcopenia [J]. Mol Aspects Med, 2016, 50: 109-117
- [11] Cosgrove BD, Gilbert PM, Porpiglia E, et al. Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles [J]. Nat Med, 2014, 20(13):255-264
- [12] Prado CM, Wells JC, Smith SR, et al. Sarcopenic obesity: a critical appraisal of the current evidence [J]. Clin Nutr, 2012, 31 (5):583-601
- [13] Seyer P, Grandemange S, Busson M, et al. Mitochondrial activity regulates myoblast differentiation by control of c-Myc expression [J]. J Cell Physiol, 2006, 207(1):75-86
- [14] Zhang H, Ryu D, Wu Y, et al. NAD repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice [J]. Science, 2016, 352(6292):1436-1443
- [15] Leduc-Gaudet JP, Picard M, St-Jean Pelletier F, et al. Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice [J]. Oncotarget, 2015, 6:17923-17937
- [16] Moore AS, Wong YC, Simpson CL, et al. Dynamic actin cycling through mitochondrial subpopulations locally regulates the fission-fusion balance within mitochondrial networks [J]. Nat Commun, 2016, 7:12886-12898
- [17] Liu R, Jin P, Yu L, et al. Impaired mitochondrial dynamics and bioenergetics in diabetic skeletal muscle [J]. PLoS One, 2014, 9(3):e92810-92817
- [18] Hepple T, Baker J, McConkey M, et al. Caloric restriction protects mitochondrial function with aging in skeletal and cardiac muscles [J]. Rejuvenation Res, 2006, 9(2):219-222

[收稿日期] 2016-12-27