

网络出版时间:2024-02-01 15:17:42 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240201.1114.016

KAT7 促进软骨细胞衰老

王旭蕾,储柱平,王惠敏,魏伟,严尚学

摘要 **目的** 建立过度复制诱导原代小鼠软骨细胞衰老模型及小鼠自然衰老模型,研究 KAT7 在软骨细胞及组织衰老中的作用。**方法** 二型胶原酶消化法获取小鼠膝关节软骨细胞,使用甲苯胺蓝染色及 Col II 染色鉴定小鼠软骨细胞;Western blot 和细胞免疫荧光法检测不同代次小鼠软骨细胞衰老信号相关蛋白及 KAT7 表达水平,SA- β -Gal 染色确定细胞衰老情况。取 22 月龄老龄小鼠与 2 月龄年轻小鼠关节 HE 染色、番红 O-固绿染色比较小鼠关节病理情况;免疫组化观察小鼠关节组织中 KAT7 和 p53 的表达情况。**结果** 与对照组相比,衰老的小鼠软骨细胞 KAT7 蛋白及 p21、p53 表达水平显著升高,KAT7 抑制剂 WM-3835 可抑制衰老软骨细胞 KAT7 和 p21 的蛋白表达。SA- β -Gal 染色可见,第八代(P8)较第一代(P1)软骨细胞阳染明显增加。与年轻小鼠软骨组织相比,老龄小鼠软骨组织呈现近骨性分布,软骨表面完整性降低,肥大软骨细胞数量显著增多,KAT7 和 p53 细胞阳染增加。**结论** KAT7 在软骨细胞衰老模型及老龄小鼠软骨组织中表达升高,提示 KAT7 可能与软骨细胞衰老相关。**关键词** KAT7;衰老;软骨细胞
中图分类号 R 336
文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0293-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.018

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种与衰老相关的关节退行性疾病,是世界范围内常见的致残性疾病,临床缺少有效治疗药物。OA 的发展不仅与炎症或软骨基质的合成和降解失衡有关,关节组织中衰老细胞数量的增加也发挥着重要作用;年龄相关的线粒体功能障碍与氧化应激也可诱导关节组织细胞衰老^[1-2]。尽管 OA 的确切机制不明,但衰老的一些特征在 OA 疾病进程中发挥重要作用。细胞衰老是衰老的标志之一,衰老细胞表达衰老生物标志

物 p53 和 p21,并表现出衰老相关的 β -半乳糖苷酶活性增加^[3]。基于 CRISPR/Cas9 的全基因组筛选确定赖氨酸乙酰转移酶 7(lysine acetyltransferase 7, KAT7/HBO1)是细胞衰老的驱动因素^[4]。有研究^[5-6]证实,软骨细胞衰老与 OA 疾病发展进程密切相关,深入阐明 KAT7 是否参与软骨细胞衰老对于了解 OA 病理机制具有重要作用。该研究拟建立过度复制诱导原代小鼠软骨细胞衰老模型及小鼠自然衰老模型,研究 KAT7 在软骨细胞及软骨组织衰老中的作用,为治疗或预防 OA 提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雌性 SPF 级 C57BL/6 小鼠购于安徽省实验动物中心[许可证号:SCXK(皖)2020-001],饲养于 SPF 环境设施中[许可证号:SYXK(皖)2020-001],自由饮食;对照组(13~15 g)、实验组(22~24 g)各 7 只。

1.1.2 主要试剂 II 型胶原酶购自美国 Sigma 公司;小鼠超敏二步法免疫组化检测试剂购自中杉金桥; β -actin 抗体购自美国 Affinity 公司;KAT7 抗体、p21 抗体购自美国 Abcam 公司;p53 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;SA- β -Gal 染色试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。

1.1.3 主要仪器 激光共聚焦显微镜(型号:徕卡 TCS SP8)、组织原位细胞扫描分析仪(型号:Pan-noramic MIDI)购于济南丹吉尔电子有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 软骨细胞的分离与培养 从 10 日龄 C57BL/6 幼鼠的膝骨软骨中分离出原代软骨细胞。将小鼠 CO₂ 梯度处死后,无菌条件下获取双侧股骨及胫骨软骨,PBS 冲洗 3 次,剪碎为 1 mm³ 左右的软骨碎片后用巴氏吸管转移至 15 ml 离心管中,离心去除上层 PBS,用 1% 二型胶原酶重悬,37℃ 消化 6 h 后用 22 μ m 细胞滤器过滤消化液,离心弃上清液,加入 10% 血清的 DMEM/F12 培养基重悬细胞,后将细胞悬液转移至预先加有培养基的 25 cm² 的培养瓶中 37℃ 培养。小鼠软骨细胞培养在添加有 10%

2024-01-18 接收

基金项目:安徽高校自然科学研究重大项目(编号:KJ2020ZD15)

作者单位:安徽医科大学临床药理研究所,抗炎免疫药物教育部重点实验室,抗炎免疫药物协同创新中心,合肥 230032

作者简介:王旭蕾,女,硕士研究生;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:wwei@ahmu.edu.cn;

严尚学,男,研究员,硕士生导师,责任作者,E-mail:yan-shx@163.com

胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中,培养条件为 37 ℃、5% CO₂。

1.2.2 软骨细胞的鉴定 以甲苯胺蓝染色与Ⅱ型胶原(Col II)免疫荧光染色进行软骨细胞鉴定。采用细胞爬片技术,细胞贴壁后取出盖玻片,4%多聚甲醛固定 20 min,3%过氧化氢室温下孵育 10 min,5% BSA 封闭 10 min,滴加 Col II 一抗,4 ℃过夜。复温后滴加荧光二抗,室温下孵育 2 h,DAPI 染色 8 min,滴加抗荧光淬灭剂,指甲油封片。对于甲苯胺蓝染色,固定后用甲苯胺蓝染色 5 min,梯度乙醇脱水后常温干燥,中性树胶封片。

1.2.3 Western blot 检测软骨细胞衰老信号蛋白 p53、p21 及 KAT7 的表达 收集第八代软骨细胞(P8)及加入 WM-3835 干预的 P8 软骨细胞,提取细胞总蛋白,电泳、转膜、封闭,分别加入 KAT7(1:1 000)、p53(1:1 000)、p21(1:1 000)等一抗孵育过夜;分别加二抗(KAT7 与 p21 为兔抗 1:10 000;p53 为鼠抗 1:1 000)37 ℃孵育 2 h,洗膜,显影。Image J 软件分析灰度值并进行统计分析。

1.2.4 免疫荧光检测软骨细胞 KAT7 的表达 收集 P8 软骨细胞及加入 WM-3835 干预的 P8 软骨细胞,多聚甲醛固定,免疫染色通透液(TritonX-100)通透,使用与二抗相同来源的宿主血清封闭后加 KAT7(1:500)一抗过夜;次日弃去一抗加入兔荧光二抗(1:200)孵育 2 h,DAPI 染色 8 min,滴入抗荧光淬灭剂,指甲油封片。

1.2.5 病理学检测 取经 10% 福尔马林室温固定的软骨组织,脱钙后,石蜡纵向包埋,切片后进行 HE,番红 O-固绿染色,镜下观察组织病理学改变。

1.2.6 免疫组织化学方法检测 p53、KAT7 在软骨组织样本中的表达水平 软骨组织样本经处理后,脱钙包埋切片,分别用乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA)抗原修复液和 3% 过氧化氢进行抗原修复并阻断内源性过氧化物的干扰,加入 KAT7(1:200)、p53(1:500)一抗 4 ℃孵育过夜,第 2 天室温复温后 PBS 洗涤,按照通用二步法免疫组化试剂盒(PV-9000)中说明书步骤;加入一抗增强液孵育 30 min,增强酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物室温孵育 20 min,加入适量新鲜配制的 DAB 显色液约 3 min,苏木精复染后封片并在波片扫描仪下观察。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad (9.0 版) 进行统计分析。数值结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用

独立样本 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 软骨细胞的形态学观察 经过两步酶消化法分离得到的原代软骨细胞为球形,呈悬浮状态,大小均一,具有较强的折光性。贴壁后的软骨细胞大部分呈圆形、椭圆形或短梭形,可见成簇现象。

2.2 软骨细胞的鉴定 3 代内的阳性软骨细胞甲苯胺蓝染色可见细胞内有蓝紫色异染颗粒;Ⅱ型胶原(Col II)免疫荧光染色阳性软骨细胞可见细胞均有红色阳染情况(图 1)。

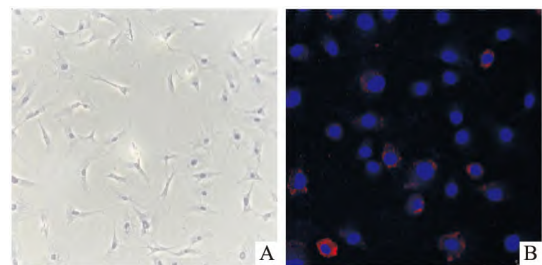


图 1 小鼠软骨细胞鉴定 ×100

A: 甲苯胺蓝染色; B: Col II 染色

2.3 过度复制对小鼠软骨细胞 p53、p21 及 KAT7 蛋白表达的影响及染色结果 Western blot 结果显示(图 2),与第一代(P1)软骨细胞相比,P8 软骨细胞 p53、p21 及 KAT7 的蛋白表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。SA-β-Gal 染色可见,P8 软骨细胞中 SA-β-gal 阳性的软骨细胞数高于对照组(图 3)。

2.4 WM-3835 对 P8 软骨细胞 KAT7 和 p21 表达的影响 结果显示,P8 软骨细胞 KAT7 蛋白表达量明显升高,100 μmol/L WM-3835 作用 48 h 可降低 KAT7 和 p21 的蛋白表达,差异有统计学意义(图 4)。细胞免疫荧光结果也表明,与 P1 软骨细胞相比,P8 软骨细胞 KAT7 荧光强度(红色)增强,WM-3835 体外可降低 KAT7 荧光强度(图 5)。

2.5 不同年龄软骨组织的病理变化 显微镜下检查可见,年轻小鼠软骨组织无异常分化细胞,软骨细胞分布较均匀,大小和形态一致;老龄小鼠软骨组织呈现近骨性分布,软骨细胞数量减少,空泡化明显,软骨表面完整性降低,关节表面不平整(图 6)。

2.6 不同年龄小鼠软骨组织中 KAT7 和 p53 的表达 免疫组化法检测年轻小鼠(2 月龄)与老龄小鼠

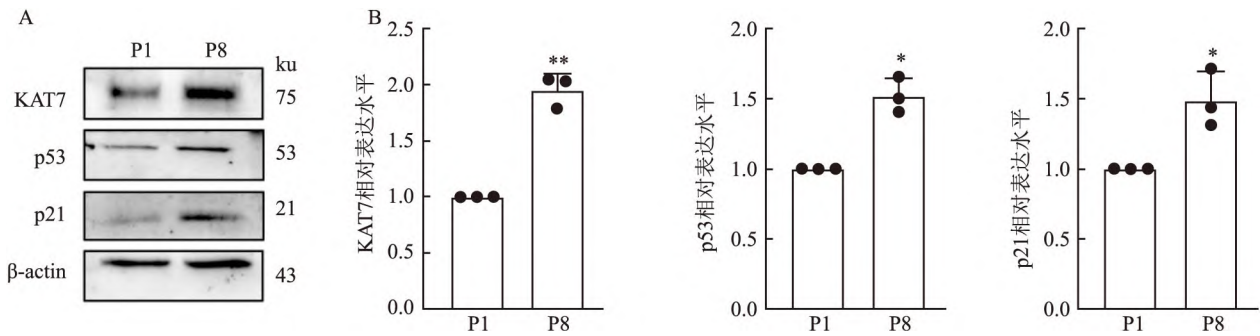


图2 过度复制软骨细胞衰老蛋白及 KAT7 的影响

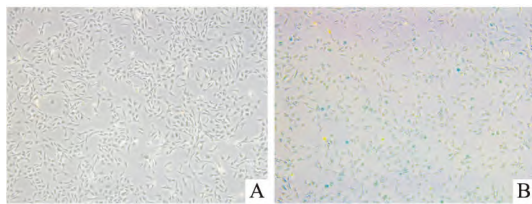
与 P1 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 

图3 过度复制软骨细胞 SA-β-Gal 染色 ×40

A: P1 软骨细胞; B: P8 软骨细胞; 蓝色: 衰老阳性细胞, 箭头: 代表性细胞

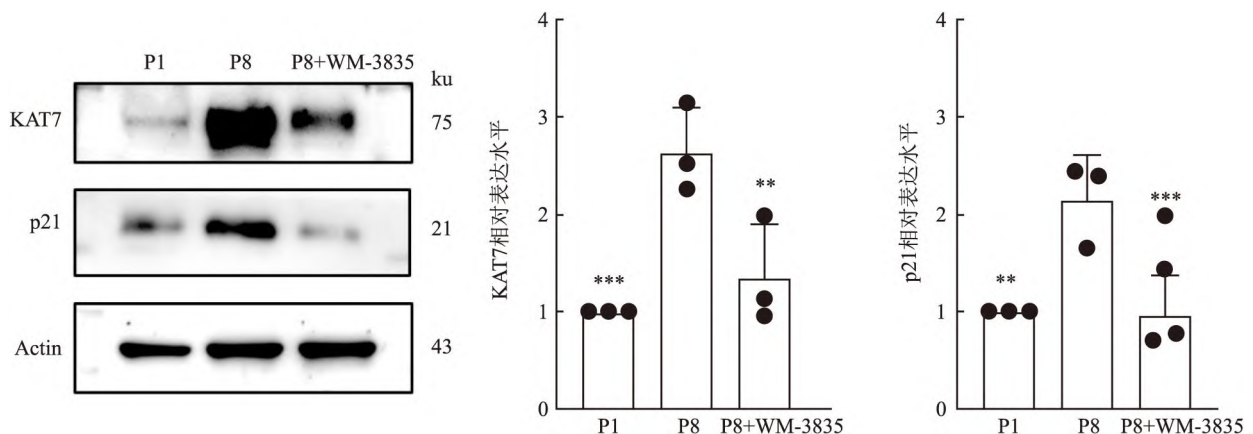
(22 月龄) 软骨组织 KAT7 和 p53 表达水平, 结果显示 22 月龄小鼠软骨组织中 KAT7 和 p53 表达水平相比于 2 月龄明显升高。

3 讨论

细胞衰老是衰老的标志之一, 软骨细胞在衰老的过程中具有许多衰老细胞的特征。衰老细胞的慢性积累与年龄相关的疾病有关, 其中骨性关节炎是一种常见的关节疾病, 晚期骨性关节炎患者的软骨中大量存在衰老细胞。尽管当软骨细胞衰老而停止

分裂时, 它们仍然保持代谢活性, 分泌多种炎症细胞因子、趋化因子、生长因子和许多更可溶和不可溶的蛋白酶, 这些蛋白酶被称为衰老相关分泌表型 (SASP); SASP 改变组织微环境, 影响周围细胞和组织炎症因子浸润, 进而促进关节炎的发生^[7]。

KAT7 (HBO1 或 MYST2) 是一种乙酰化 H3 和 H4 组蛋白的组蛋白乙酰转移酶; 它由一个 N-末端结构域和一个 C-末端 MYST 结构域组成, 这是乙酰辅酶 a 结合和乙酰化所必需的^[8]。HBO1 在调节许多关键的细胞行为和生理功能方面至关重要, 包括基因转录、蛋白质泛素化、免疫调节、干细胞多能性、自我更新维持和胚胎发育等。已有研究^[4]证实, KAT7 是人间充质前体细胞衰老的有力驱动因素, 对于肝细胞和人间充质前体细胞衰老具有明显的促进作用, 使用 KAT7 抑制剂 WM-3835 可延缓肝细胞和人间充质前体细胞的衰老; KAT7 还是 MSCs 衰老的驱动因素, 有文献^[9]通过体外研究发现衰老 MSCs 中 KAT7 表达量上升, 且 β-胡萝卜素可通过调节 KAT7 - P15 信号轴抑制衰老。OA 是一种与年龄

图4 WM-3835 抑制对衰老软骨细胞 KAT7 及 p21 表达的影响 ($n=3$)与 P8 比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

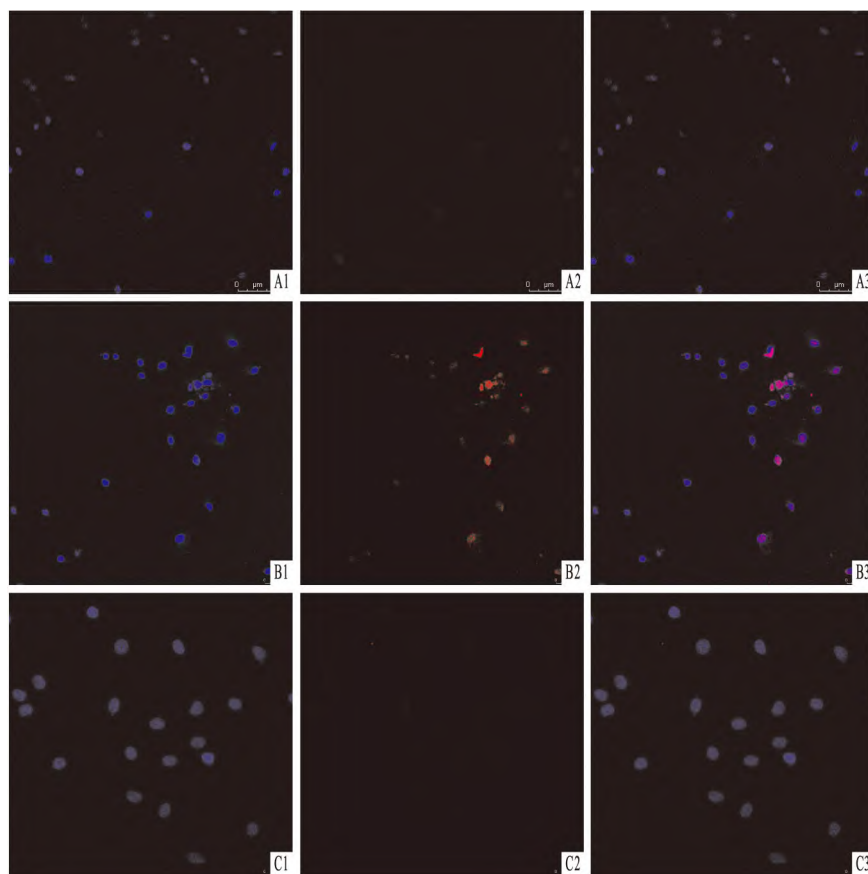


图5 WM-3835 体外对 P8 软骨细胞 KAT7 荧光强度的影响 ×400

A: P1 软骨细胞; B: P8 软骨细胞; C: P8 软骨细胞 + 100 $\mu\text{mol/L}$ WM-3835; 1: DAPI; 2: KAT7; 3: Merge; 蓝色: DAPI 染色; 红色: KAT7 阳性染色

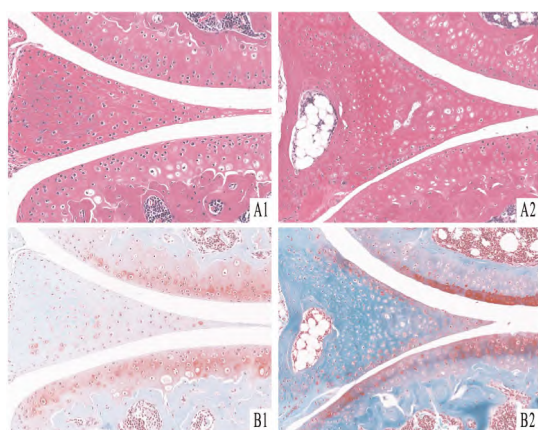


图6 不同年龄软骨组织的病理变化 ×100

A: HE 染色; B: 番红 O-固绿染色; 1: 2 月龄; 2: 22 月龄

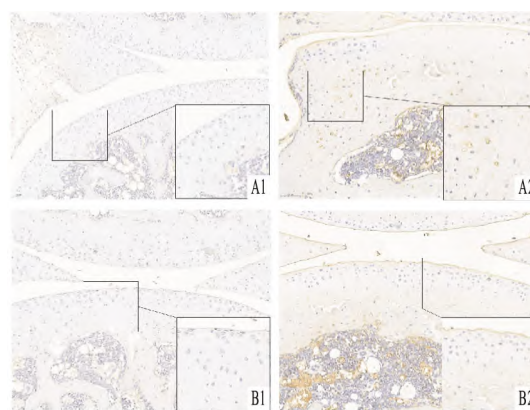


图7 不同年龄小鼠软骨中的 KAT7 和 p53 的表达 ×100

A: KAT7 染色; B: p53 染色; 1: 2 月龄; 2: 22 月龄

相关性极高的关节疾病, 软骨组织和软骨细胞是否发生衰老过程, KAT7 是否参与了软骨组织衰老, 尚未见文献报道。

本研究中, 与 P1 小鼠原代软骨细胞相比, P8 软骨细胞的 p53、p21 和 KAT7 蛋白表达水平升高, SA- β -Gal 也显示阳染增多; WM-3835 作为一种 KAT7

抑制剂, 可结合在 KAT7 乙酰辅酶 A 的结合位点上使 KAT7 失活^[10], 体外使用 WM-3835 (100 $\mu\text{mol/L}$) 可以降低 P8 软骨细胞中 KAT7 和衰老标志物 p21 的表达。这些结果提示, P8 软骨细胞产生了“复制性衰老”, KAT7 在小鼠软骨细胞衰老模型中发挥促进作用。比较不同年龄小鼠的关节组织显示, 与年

轻小鼠相比,老龄小鼠软骨组织呈现近骨性分布,空泡化严重,软骨表面完整性降低,p53 和 KAT7 表达明显上调,提示 KAT7 与老龄小鼠的软骨组织衰老密切相关。Western blot 和细胞免疫荧光确定在衰老软骨细胞中 KAT7 表达升高;在衰老小鼠软骨组织切片中使用免疫组化和免疫荧光的方法同样证明与年轻小鼠相比,衰老小鼠软骨组织中 KAT7 表达上调,说明 KAT7 与衰老息息相关。

综上所述,本研究在成功建立小鼠原代软骨细胞产生复制性衰老模型及小鼠自然衰老模型的基础上,明确了 KAT7 在软骨细胞衰老过程中的作用,KAT7 或可成为软骨衰老新的标志物。

参考文献

- [1] Coryell P R, Diekman B O, Loeser R F. Mechanisms and therapeutic implications of cellular senescence in osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2021, 17(1): 47–57.
- [2] 张 峰, 程 刚, 吴玉娇, 等. iPSC-MSCs 体外抑制 ADAMTS 保护骨关节炎患者软骨基质[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(9): 1522–8.
- [3] Bernard M, Yang B, Migneault F, et al. Autophagy drives fibroblast senescence through MTORC2 regulation[J]. Autophagy, 2020, 16(11): 2004–16.
- [4] Wang W, Zheng Y, Sun S, et al. A genome-wide CRISPR-based screen identifies KAT7 as a driver of cellular senescence[J]. Sci Transl Med, 2021, 13(575): eabd2655.
- [5] Rim Y A, Nam Y, Ju J H. The role of chondrocyte hypertrophy and senescence in osteoarthritis initiation and progression[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(7): 2358.
- [6] Jiang Y. Osteoarthritis year in review 2021: biology[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2022, 30(2): 207–15.
- [7] Xie J, Wang Y, Lu L, et al. Cellular senescence in knee osteoarthritis: molecular mechanisms and therapeutic implications[J]. Ageing Res Rev, 2021, 70: 101413.
- [8] Lan R, Wang Q. Deciphering structure, function and mechanism of lysine acetyltransferase HBO1 in protein acetylation, transcription regulation, DNA replication and its oncogenic properties in cancer[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(4): 637–49.
- [9] Zheng W V, Xu W, Li Y, et al. Anti-aging effect of β -carotene through regulating the KAT7-P15 signaling axis, inflammation and oxidative stress process[J]. Cell Mol Biol Lett, 2022, 27(1): 86.
- [10] Grant Z L, Hickey P F, Abeysekera W, et al. The histone acetyltransferase HBO1 promotes efficient tip cell sprouting during angiogenesis[J]. Development, 2021, 148(20): dev199581.

KAT7 promotes the aging of cartilage cellular senescence

Wang Xulei, Chu Zhuping, Wang Huimin, Wei Wei, Yan Shangxue

(Institute of Clinical Pharmacology, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and immune drugs, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the role of KAT7 in cartilage cell and tissue ageing by establishing an over-replicating-induced primary mouse cartilage cell ageing model and a mouse natural ageing model. **Methods** Chondrocytes of the mouse knee joint were obtained by type II collagenase digestion and identified by toluidine blue staining and Col II staining. The age-related proteins and KAT7 expression levels in cartilage cells from different generations of mice were discovered using Western blot and cellular immunofluorescence techniques, and the aging of the cells was assessed by SA- β -Gal coloring. The pathological alterations were examined in the joints of 22-month-old mice compared to 2-month-old mice using HE staining and safranin O-solid green staining. Additionally, immunohistochemical analysis was done to observe the expression of KAT7 and p53 in mouse joint tissue. **Results** Compared with the control group, the expression levels of KAT7 protein and p21 and p53 in aged mouse chondrocytes significantly increased. WM-3835, a commonly inhibitor of KAT7 that possess the capacity on halting the protein expression procedure of gene KAT7 as well as p21 in ageing chondrocytes. SA- β -Gal staining showed a significant increase in positive staining of chondrocytes in the eighth generation (P8) compared to the first generation (P1). Compared with the cartilage tissue of young mice, the cartilage tissue of elderly mice presents a near-bone distribution, with a decrease in cartilage surface integrity, a significant increase in the number of hypertrophic chondrocytes, and more KAT7 and p53 cells that were positive. **Conclusion** The expression of KAT7 increases in the ageing chondrocytes and the cartilage tissue of ageing mice, reveals the potential significance of KAT7 correlated to cellular aging process in cartilage.

Key words KAT7; senescence; chondrocyte