

组蛋白 H3 的 22 个赖氨酸去甲基化酶对胎鼠棕色脂肪细胞分化的调控作用

武晓慧^{1,2}, 徐玉乔², 张 丰², 郜 松³, 魏佳昶³, 许久航³, 李 青², 苏兴利⁴

(1. 西安医学院肥胖与代谢病研究所, 陕西 西安 710021; 2. 空军军医大学第一附属医院病理科暨病理学教研室, 陕西 西安 710032; 3. 空军军医大学学员队, 陕西 西安 710032; 4. 西安医学院教务处, 陕西 西安 710021)

摘 要:【目的】探索胎鼠棕色脂肪细胞分化过程中组蛋白 H3 赖氨酸残基位点 H3k4, H3k9, H3k27, H3k36 的 22 种去甲基化酶的调控作用, 为棕色脂肪细胞分化研究提供理论基础。【方法】收集怀孕时间为 E13.5~E19.5 d 的小鼠胚胎, 每个时间点至少取 3 只胎鼠。取肩胛间区棕色脂肪, 进行 HE 染色, 镜下观察棕色脂肪细胞的分化情况。Realtime RT-qPCR 法检测随着小鼠胚胎的发育成熟, 棕色脂肪标志基因 *Ucp1*、*Cidea*、*Prdm16* 及脂肪细胞分化基因 *Pparγ* 的表达情况和棕色脂肪中组蛋白 H3 的 22 种赖氨酸去甲基化酶的基因表达情况。Western blot 法检测棕色脂肪组织中 *Ucp1* 的蛋白表达。【结果】最早在 E14.5 d 的胎鼠背部肩胛间区观察到棕色脂肪组织; E18.5 d 胎鼠棕色脂肪细胞中出现光镜下可见的脂滴。与 E15.5 d 相比, *Ucp1*、*Cidea*、*Prdm16* 及 *Pparγ* 的表达升高 ($P < 0.05$); *Ucp1* 的蛋白表达增加 ($P < 0.05$)。与 E15.5 d 相比, H3k4 的去甲基化酶中, *Jarid1a*、*Jarid1b*、*Jarid1d*、*Lsd1* 基因表达减少 ($P < 0.05$), *Jarid1c* 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在 H3k9 的去甲基化酶中, *Jmjd2a*、*Jmjd2b*、*Jmjd2c*、*Phf2*、*Jmjd1c*、*Jhdm2a* 基因表达减少 ($P < 0.05$); *Phf8*、*Jhdm2b*、*Jmjd2d* 基因表达增加 ($P < 0.05$), *MINA* 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在 H3k36 的去甲基化酶中, *Jmjd4*、*Jmjd5*、*Jhdm1b* 表达减少 ($P < 0.05$), *Jhdm1a* 表达增加 ($P < 0.05$)。在 H3k27 的去甲基化酶中, *Jmjd3*、*Utx*、*Jhdm1d* 表达增加 ($P < 0.05$)。【结论】在小鼠胚胎期棕色脂肪细胞的分化过程中, H3k4 和 H3k36 去甲基化酶主要表现为基因表达下调, H3k9 和 H3k27 去甲基化酶部分基因表达上调, 这些去甲基化酶构成以转录激活和转录延长为主要效应的复杂调控网络。

关键词: 棕色脂肪细胞; 分化; 组蛋白 H3; 去甲基化酶

中图分类号: R364.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2020)04-0534-08

Regulation of 22 Lysine Demethylases of Histone H3 on the Differentiation of Brown Adipocytes in Fetal Mice

WU Xiao-hui^{1,2}, XU Yu-qiao², ZHANG Feng², GAO Song³, WEI Jia-chang³, XU Jiu-hang³, LI Qing², SU Xing-li⁴

(1. Institute of Obesity and Metabolic Diseases of Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China; 2. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Cadet Team of Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China; 4. Academic Affairs Office of Xi'an Medical University, Xi'an, 710021, China)

Correspondence to: SU Xing-li; E-mail: sulingli@126.com

Abstract: 【Objective】 To explore the effects of 22 demethylases of histone H3k4, H3k9, H3k27 and H3k36 on the

收稿日期: 2020-01-12

基金项目: 国家自然科学基金 (81572631, 31000559); 西安医学院配套基金 (2018PT37); 西安医学院高层次人才科研基金 (2018RCYJ01)

作者简介: 武晓慧, 博士, 副教授, 研究方向: 表观遗传与代谢性疾病, E-mail: wuxh5221170@126.com; 苏兴利, 通信作者, 博士, 教授, E-mail: sulingli@126.com

differentiation of fetal mice brown adipocytes, so as to provide a theoretical basis for the study of differentiation of brown adipocytes.【Methods】 We collected the embryos from pregnant mice at stages E13.5 to E19.5, with no less than 3 fetal mice obtained at each time point. Then we isolated interscapular brown adipose tissues (BAT) for HE staining and observed the differentiation of brown adipocytes under a microscope. Realtime RT-qPCR was used to test the expression of BAT markers such as *Ucp1*, *Cidea* and *Prdm16*, adipocyte differentiation related gene *Ppar γ* and 22 lysine demethylases of histone H3 in BAT. *Ucp1* protein expression in BAT was detected by Western blot.【Results】 BAT were first observed in the interscapular area of fetal mice at E14.5. Lipid droplets were observed under light microscope in the brown adipocytes of fetal mice at E18.5. Compared with those in E15.5 embryos, in E16.5 to E19.5 embryos, the expression of *Ucp1*, *Cidea*, *Prdm16* and *Ppar γ* increased ($P<0.05$) and *Ucp1* protein expression increased ($P<0.05$). Of H3k4 demethylases, *Jarid1a*, *Jarid1b*, *Jarid1d* and *Lsd1* showed decrease in expression ($P<0.05$); *Jarid1c* expression had no statistical significance ($P>0.05$). Of H3k9 demethylases, *Jmjd2a*, *Jmjd2b*, *Jmjd2c*, *Phf2*, *Jmjd1c* and *Jhdm2a* showed decrease in expression ($P<0.05$); *Phf8*, *Jhdm2b* and *Jmjd2d* showed increase in expression ($P<0.05$); *MINA* expression had no statistical difference ($P>0.05$). Of H3k36 demethylases, *Jmjd4*, *Jmjd5* and *Jhdm1b* showed decrease in expression ($P<0.05$); *Jhdm1a* showed increase in expression ($P<0.05$). Of H3k27 demethylases, *Jmjd3*, *Utx* and *Jhdm1d* showed increase in expression ($P<0.05$).【Conclusion】 In the process of brown adipocytes differentiation, expressions of H3k4 and H3k36 demethylases were mainly downregulated and those of some H3k9 and H3k27 demethylases were upregulated. These demethylases formed a complex regulatory network with transcriptional activation and transcriptional elongation as the main effects.

Key words: brown adipocytes; differentiation; histone H3; demethylase

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2020, 41(4): 534-541]

随着社会经济的发展和人类生活方式的转变,肥胖成为全球范围内重大的公共卫生问题^[1]。肥胖是由于长期的能量摄入和消耗的不平衡导致的。在减少能量摄入的同时,增加机体的能量消耗,是治疗肥胖的有效途径^[2]。研究^[3]表明棕色脂肪可以通过产热消耗大量的能量。在啮齿目动物体内,例如小鼠,其棕色脂肪可以终身存在,近年来采用PET-CT技术发现成年人体内也存在棕色脂肪,可以利用棕色脂肪缓解人类肥胖和胰岛素抵抗^[4-5]。深入了解棕色脂肪细胞的分化调控,可以为利用棕色脂肪产热耗能治疗肥胖提供更多的理论基础^[6]。作为常用的棕色脂肪研究模式动物的小鼠,其棕色脂肪在胚胎期的分化过程尚不清楚,本文拟观察棕色脂肪分化的具体时间、形态学发展变化及重要调控基因的表达情况,为后续研究提供理论基础。表观遗传学调控机制中组蛋白H3去甲基化酶 *Jmjd3* 和 *Utx* 被认为与小鼠棕色脂肪细胞分化密切相关^[7-8],但其他的去甲基化酶研究较少,已经发表的研究均针对单个基因在出生后小鼠棕色脂肪中的功能展开,缺乏多基因表达的系统性研究,在胚胎期棕色脂肪分化中的研究更是空白。据报道,胎鼠白色脂肪出现时间是E16 d^[9],课题组将实验时间点前移,收集了E13.5~E19.5 d不同孕龄的小鼠胚胎及其肩胛间区棕色脂肪组织(brown adipose tissue,

BAT),探索随着小鼠胚胎的发育和棕色脂肪细胞的分化,组蛋白H3四个常见的赖氨酸修饰位点:H3k4、H3k9、H3k27和H3k36目前已知的22种去甲基化酶的基因表达情况,为棕色脂肪分化调控提供更加系统化的研究基础,并发现一些可能发挥作用的基因,为进一步深入了解棕色脂肪细胞分化的调控及利用棕色脂肪进行肥胖治疗的相关研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 收集E13.5-E19.5胎鼠

8周龄C57BL/6J雌性小鼠24只,雄性小鼠8只,购于空军军医大学实验动物中心[实验动物为SPF级,生产许可证编号:SCXK(陕)2019-001;使用许可证编号:SYXK(陕)2019-001];实验动物饲养于空军军医大学基础医学部动物房,室温保持在(25±2)℃,湿度保持在(55±5)%。动物自由进食、饮水,采用辐照后小鼠生长繁殖鼠粮(江苏协同),每天保持12h的昼夜循环光照。待动物适应1周后,以雌雄比3:1的比例于前一天黄昏时合笼交配。次日晨取出雄鼠,并观察雌鼠阴栓,见栓者记E0.5 d,未见栓或者阴栓不明确者继续观察,2周后,确定未怀孕的雌鼠重新合笼交配。以上方法可

以避免假性见栓,确保怀孕时间的准确性。取孕E13.5~E19.5 d的胎鼠进行实验。实验中所有操作符合空军军医大学和西安医学院实验动物伦理委员会标准。

1.2 组织学分析

剖腹取不同胎龄胎鼠,CO₂处死后,剪开背部皮肤,整个胎鼠或取出的背部棕色脂肪组织用40 g/L多聚甲醛固定24 h。将胎鼠标本沿着体中轴矢状位剖开,常规脱水,剖面向下石蜡包埋,每个标本间断切片10张,切片厚度3 μm,苏木素-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)染色。光学显微镜筛选观察并取典型部位拍照。

1.3 Realtime RT-qPCR 法检测基因表达

PCR主要试剂:总RNA提取试剂盒为RNAiso Plus(9108;Takara;日本),反转录试剂盒为Prime-Script RT Master Mix(RR036A;Takara)。进行Real-

time-qPCR的催化酶使用SYBR Green master mix(RR820A;Takara)。

因E15.5以前的胚胎过小,不易取出较纯的棕色脂肪组织,实验中 Realtime RT-qPCR 和 Western blot 实验均取E15.5~E19.5 d胚胎的BAT。BAT加入RNAiso Plus后匀浆,按照说明书提取各样本中的总RNA, Nanodrop ND-2000超微量核酸蛋白测定仪测定所提RNA的质量和浓度,反转录成cDNA, Realtime qPCR反应采用20 μL体系在CFX96(C1000 Touch Thermal Cycler; Bio-Rad; 美国)实时荧光定量PCR仪上进行。以小鼠β-actin为内参基因,以2^{-ΔΔCT}法计算各组的mRNA相对表达量。PCR反应程序:95℃预变性5 s,95℃变性5 s,56℃退火延伸30 s,40个循环。引物由大连宝生物公司设计并合成,基因名称、全称及引物序列见表1。

表1 被测基因及所用引物
Table 1 Genes tested and primers

Number	Name	Official Symbol	Full name	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
1	<i>Jarid1a</i>	<i>Kdm5a</i>	lysine (K)-specific demethylase 5A	CCTCCATTTGCCTGTGAAGT	CCTTTGCTGGCAACAATCTT
2	<i>Jarid1b</i>	<i>Kdm5b</i>	lysine (K)-specific demethylase 5B	CTGGGAAGAGTTCGGGAC	CGCGGGTGAAATGAAGTTTAT
3	<i>Jarid1c</i>	<i>Kdm5c</i>	lysine (K)-specific demethylase 5C	TGAACGCATTGTTTATCCCTATGA	TCAAATGGGCGTGTGTTACAC
4	<i>Jarid1d</i>	<i>Kdm5d</i>	lysine (K)-specific demethylase 5D	TCCATTCCGCCCTTAAATATCGA	CGTCAGATCCTGGCTTCATGT
5	<i>Lsd1</i>	<i>Kdm1a</i>	lysine (K)-specific demethylase 1A	AGGAATCGCACATTGCAGTTA	ACAGTATCGCTGTGTAAGGC
6	<i>Jmjd2a</i>	<i>Kdm4a</i>	lysine (K)-specific demethylase 4A	TTCGTGAGTTCGGCAAGATCG	ATCAACGTGCTGTTCATAGAGAG
7	<i>Jmjd2b</i>	<i>Kdm4b</i>	lysine (K)-specific demethylase 4B	CCACGGCAGACGTATGATGAC	ACTTTTACTATTGGCTAGGCG
8	<i>Jmjd2c</i>	<i>Kdm4c</i>	lysine (K)-specific demethylase 4C	GCGCCATCCACTTGGT	CGCTACCTGCTGTTCCAAA
9	<i>Jmjd2d</i>	<i>Kdm4d</i>	lysine (K)-specific demethylase 4D	TTTCCATATGGCTACCACGC	GATCCTCACAAGGGCTCCA
10	<i>Phf2</i>	<i>GRC5</i>	PHD finger protein 2	CCCCAACATTCTACGTGAGTG	CTGTTTGTAACGTCTGTCCACA
11	<i>Phf8</i>	<i>Kdm7b</i>	PHD finger protein 8	CATGGAGTCTAAAGCCCGTG	GGTGTCAACTCTTACCTGCTG
12	<i>MINA</i>	<i>Riox2</i>	ribosomal oxygenase 2	GCAAAGGAAGATGTGGCATT	CCTCGAAGAAAGGAGGGAGT
13	<i>Jmjd1c</i>	<i>Kdm3c</i>	jumonji domain containing 1C	AGAAGAGGAAAGGGCAGGTC	TTGGGACCTATCTCACAGCA
14	<i>Jhdm2a</i>	<i>Kdm3a</i>	lysine (K)-specific demethylase 3A	GCCTTCCAGGTTTGTATGATCTG	TGCCATCTCGCCTGCTGTA
15	<i>Jhdm2b</i>	<i>Kdm3b</i>	lysine (K)-specific demethylase 3B	CCAAGCTCGCAAGCTCCTAA	CAGTGGACTTGCTTGTGTC
16	<i>Jmjd4</i>	<i>6430559I23</i>	jumonji domain containing 4	CTCAAGGACTGGCATCTGTG	CTGAAGGAGCGGAAGATGTC
17	<i>Jmjd5</i>	<i>Kdm8</i>	lysine (K)-specific demethylase 8	TGTCATGTTAGAGCGGATGG	TGTACCTTGAGCCCACTTCC
18	<i>Jhdm1a</i>	<i>Kdm2a</i>	lysine (K)-specific demethylase 2A	AACACACAGAAGGGATTGAAAT	GCACCATAITCTCAAGCCTGG
19	<i>Jhdm1b</i>	<i>Kdm2b</i>	lysine (K)-specific demethylase 2B	AGGCAAGTTTAACTCATGCTC	ACACCCTCCGATTCTTAATCTT
20	<i>Jmjd3</i>	<i>Kdm6b</i>	lysine (K)-specific demethylase 6B	CCCCCATTTTCAGCTGACTAA	CTGGACCAAGGGGTGTGTT
21	<i>Utx</i>	<i>Kdm6a</i>	lysine (K)-specific demethylase 6A	TCCATTACCATCCGCCTCATC	TCAGCCAGCAGCCTTACGAG
22	<i>Jhdm1d</i>	<i>Kdm7a</i>	lysine (K)-specific demethylase 7A	TTTTTCAATGCCCTTCACC	TTGTTGGCTGTGCCATTC
23	<i>Ucp1</i>	-	uncoupling protein 1	CACTCAGGATTGGCCTCTACGAC	GCTCTGGCTTGCATTCTGAC
24	<i>Cidea</i>	-	cell death inducing DFFA like effector a	CTGGTTACGCTGTGCTGGA	TGCTTGACAGACTGGACATACTTAC
25	<i>Prdm16</i>	-	PR/SET domain 16	CCTCGCCATGTCTCAGATCAA	CTTTCACATGCACCAACAGTCC
26	<i>Pparγ</i>	-	peroxisome proliferator activated receptor γ	TGCAGCAGTGTCTTGGATG	GGAGCCTAAGTTTGAGTTGTCTG
27	<i>β-actin</i>	-	-	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCACA

1.4 Western blot

提取BAT总蛋白后测定蛋白含量,采用8%的SDS-Page凝胶进行电泳分离蛋白,每孔蛋白上样量为20 μg 。100V湿法转膜1h至PVDF膜后5%脱脂奶粉室温封闭1h,1 \times PBST洗膜5 min \times 3次,一抗(Ucp1,兔抗,abcam,美国; β -Tubulin,鼠抗,天津三箭;浓度均为1:1 000)中4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。二抗(中杉金桥羊抗兔IgG/羊抗鼠IgG,浓度为1:5 000)室温孵育1h,配制ECL发光液加至膜上目标蛋白所在处,凝胶成像仪采集图像。

1.5 统计学分析

数据用IBM SPSS Statistics 20.0统计软件进行分析。符合正态分布的定量数据采用均数 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。组间比较方差齐时采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),方差分析有统计学意义时,多重比较采用Bonferroni法,所有统计学分析均为双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胎鼠棕色脂肪的形态学表现

实验收集了E13.5~E19.5的胎鼠背部棕色脂肪组织并HE染色后镜下观察,在E13.5 d小鼠背部肩胛间区未能观察到棕色脂肪组织;自E14.5 d开始在胎鼠背部肩胛间区观察到了棕色脂肪组织,如黄色框选区所示。BAT体积随着胎龄增加而逐渐增大(图1),在E18.5 d时光镜下可观察到棕色脂肪细胞内形成了脂滴(图1)。

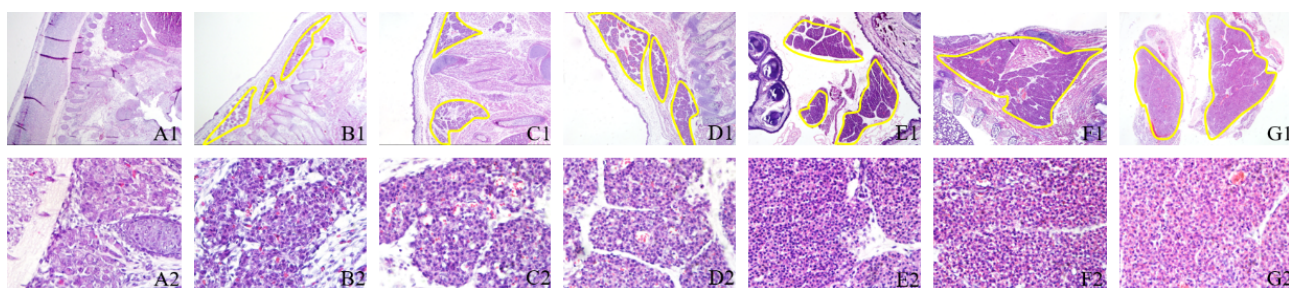
2.2 胎鼠背部BAT中的棕色脂肪特异性标志基因表达增高

胎鼠BAT的Realtime RT-qPCR结果显示,相

比于E15.5 d, E17.5~E19.5 d的棕色脂肪标志物Ucp1($F=93.318, P=0.000$)表达升高,差异有统计学意义, E17.5~E19.5 d分别为(4.91 \pm 1.05)、(9.39 \pm 0.29)和(23.13 \pm 2.38)倍。Cidea($F=18.205, P=0.000$)表达升高,差异有统计学意义, E16.5~E19.5分别为(3.06 \pm 0.82)、(5.03 \pm 0.82)、(4.98 \pm 0.34)和(5.87 \pm 0.81)倍。Prdm16($F=105.429, P=0.000$)的表达升高幅度较大,差异有统计学意义, E16.5~E19.5 d分别为(7.87 \pm 1.47)、(7.59 \pm 0.57)、(18.02 \pm 1.63)和(27.94 \pm 2.33)倍。脂肪细胞分化通用标志物Pparg($F=43.061, P=0.000$;图2A)表达也升高,差异有统计学意义, E16.5~E19.5分别为(4.34 \pm 1.06)、(5.72 \pm 0.48)、(8.07 \pm 0.55)和(8.29 \pm 0.67)倍。Western blot结果显示, Ucp1蛋白表达随着棕色脂肪分化成熟表达升高($F=35.283, P=0.000$;图2B),相比于E15.5 d, E17.5 d($P=0.001$), E18.5 d($P=0.000$)和E19.5 d($P=0.000$)表达升高,差异有统计学意义。这些标志基因和蛋白的表达升高,与形态学分化逐渐成熟的表型相一致。

2.3 组蛋白H3赖氨酸位点的22个去甲基化酶基因呈差异化表达

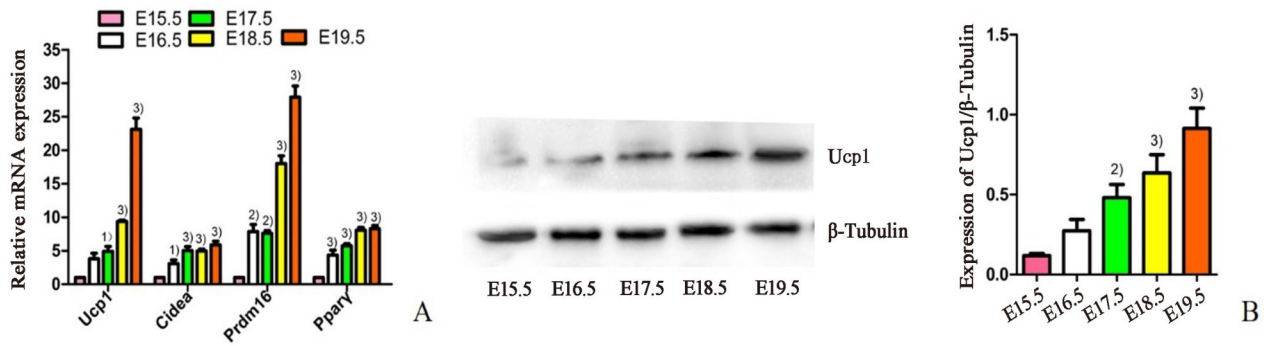
取小鼠背部棕色脂肪提取RNA,对组蛋白H3的已知22个去甲基化酶进行检测,以E15.5 d的表达量为基准,计算E16.5~E19.5 d的基因相对表达量。结果显示,在H3k4的去甲基化酶中, *Jarid1a*表达降低, E16.5、E19.5 d差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。 *Jarid1b*表达降低, E19.5 d差异有统计学意义($P < 0.01$)。 *Jarid1c*表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。 *Jarid1d*表达降低,在E16.5和E19.5差异有统计学意义(均 $P < 0.001$),而*Lsd1*则在E16.5~E19.5均表达下降,差异有统计学意义(均 $P < 0.001$;图3A,表2)。



From A to G infer to brown adipose tissues from E13.5~E19.5 days old fetal mice, the yellow frame areas were BAT. A1-G1: 40 \times ; A2-G2: 400 \times

图1 小鼠背部棕色脂肪组织

Fig.1 Brown adipose tissues in the back of mice



One-Way ANOVA was used for the relative expression of brown adipocytes differentiation markers in BAT of fetal mice (A). Protein expression of Ucp1 in BAT (B). 1) $P < 0.05$ vs. E15.5 group; 2) $P < 0.01$ vs. E15.5 group; 3) $P < 0.001$ vs. E15.5 group. Data are shown as mean \pm SD, $n=3$.

图2 胎鼠BAT中棕色脂肪细胞分化标志物的表达情况

Fig. 2 Expression of genes related to brown adipocytes differentiation in BAT of fetal mice

在H3k9的去甲基化酶中,*Jmjd2a*表达降低,E16.5和E19.5差异有统计学意义(均 $P < 0.001$)。*Jmjd2b*表达降低,在E18.5、E19.5差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。*Jmjd2c*表达降低,E16.5–E19.5差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。*Phf2*表达降低,E16.5和E19.5差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。*Phf8*表达有升高趋势,E16.5、E18.5、E19.5天差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。*MINA*表达差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。*Jmjd1c*表达降低,E16.5、E18.5、E19.5 d差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。*Jhdm2a*表达减少,E16.5和E19.5差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。*Jhdm2b*表达升高,E16.5、E19.5差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。*Jmjd2d*基因表达显著增高,E17.5、E18.5和E19.5差异有统计学意义(均 $P < 0.01$;图3B,C,表2)。

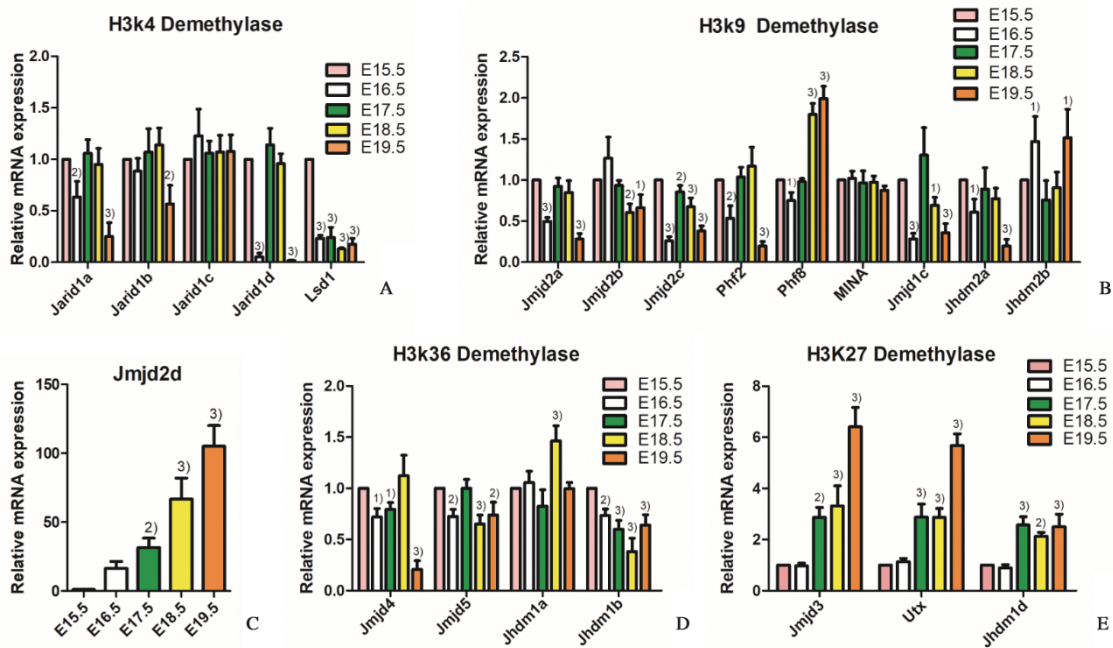
在H3k36的去甲基化酶中,*Jmjd4*表达在E16.5、E17.5、E19.5 d均降低,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。*Jmjd5*表达减少,E16.5、E18.5和E19.5差异有统计学意义(均 $P < 0.01$)。*Jhdm1a*表达在E18.5表达增加,差异有统计学意义($P < 0.001$)。*Jhdm1b*在E16.5–E19.5表达均降低,差异有统计学意义(均 $P < 0.01$;图3D,表2)。

在H3k27的去甲基化酶中,*Jmjd3*表达升高,在E17.5~E19.5有明显的增加(均 $P < 0.01$),差异有统计学意义。*Utx*表达也有增高,E17.5~E19.5差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。*Jhdm1d*表达升高,E17.5~E19.5差异有统计学意义(均 $P < 0.01$;图3E,表2)。

3 讨论

近年来有多项研究表明表观遗传调控机制的组蛋白修饰在个体发育和细胞分化中发挥重要作用^[10-11]。2015年,有两项研究分别对H3k27me3的去甲基化酶*Jmjd3*和*Utx*在棕色脂肪分化过程中的作用进行了研究^[7-8],结果发现,*Jmjd3*和*Utx*在棕色脂肪分化的过程中,通过其酶活性,改变H3k27me3的甲基化状态,影响一系列基因的激活或沉默,对棕色脂肪细胞的分化发挥促进作用。此外也有研究报道,*Lsd1*在棕色脂肪细胞的分化过程中发挥重要的作用^[12]。因此我们推测,组蛋白H3不同位点的去甲基化酶,可能在棕色脂肪细胞分化过程中发挥重要的调控作用。我们较为系统地筛查了组蛋白H3常见赖氨酸位点的22个去甲基化酶,在小鼠背部棕色脂肪分化过程中的表达情况。此外,小鼠胚胎期棕色脂肪分化的具体过程,目前并无相关报道,本研究对此过程进行了观察。

在实验中,我们发现,小鼠胚胎期棕色脂肪最早出现在E14.5 d的胎鼠。先前有作者用荧光素酶标记的小鼠进行观察,发现白色脂肪最早出现于E16 d的胎鼠^[9],本研究发现,棕色脂肪最早出现于E14.5 d胚胎,棕色脂肪细胞的分化早于白色脂肪,这间接支持了棕色和白色脂肪起源于不同祖细胞系的观点^[13-14]。随后实验检测了小鼠背部棕色脂肪中棕色脂肪标志物的表达情况,发现*Ucp1*,*Cidea*,*Prdm16*这3个棕色脂肪特异性标志物的表达^[15]随着棕色脂肪细胞分化成熟,出现较为迅猛的增高。而*Ucp1*的蛋白表达也表现为逐渐增高趋



One-Way ANOVA was used for mRNA expression of 22 kinds of Demethylases of H3(A-E). 1) $P < 0.05$ vs. E15.5 group. 2) $P < 0.01$ vs. E15.5 group. 3) $P < 0.001$ vs. E15.5 group. Data are shown as mean \pm SD, $n=3$.

图3 胎鼠背部BAT中组蛋白H3k4、H3k9、H3k36和H3k27的22种去甲基化酶相对于E15.5天组的基因表达

Fig. 3 Gene expression of 22 demethylases of histones H3k4、H3k9、H3k36 and H3k27 relative to E15.5 group in BAT of fetal mice

势。棕色脂肪最重要的功能是产热,以便帮助个体在出生后适应寒冷环境。其中线粒体内的解偶联蛋白1(Ucp1)是最重要的行使产热功能的分子,也是棕色脂肪细胞最有特异性的标志物。而脂滴则负责提供产热的能源。在E18.5 d的棕色脂肪细胞中,首次观察到脂滴。Ucp1的表达增加和脂滴的形成,表明胚胎在出生前的1~2 d已经为出生后产热维持体温基本做好准备^[16]。

我们选取了已知的组蛋白H3的22种去甲基化酶,对胎鼠背部肩胛间区的棕色脂肪组织进行了基因表达分析,以E15.5 d为基准,计算E16.5~E19.5的mRNA相对表达量。各组蛋白H3赖氨酸位点的甲基化修饰由甲基化酶和去甲基化酶共同承担,表现出此消彼长的动态平衡。H3k9和H3k27甲基化后主要表现为转录沉默,去甲基化后表现为转录激活^[17-18]。实验结果中,H3k9被检测的10个去甲基化酶中,*Jmjd2d*、*Phf8*和*Jhdm2b*^[19]表达升高,其余7个去甲基化酶表达下调或无明显变化。这10个去甲基化酶具有类似功能,均可催化H3k9位点甲基擦除,部分去甲基化酶表达升高,部分表达降低,分析其原因,可能在分化过程中不

需要全部去甲基化酶均参与其中,因而一部分去甲基化酶的表达发生了关闭,而另外几个去甲基化酶*Jmjd2d*、*Phf8*和*Jhdm2b*高表达,即可发挥作用。

H3k27的去甲基化酶*Jmjd3*、*Utx*和*Jhdm1d*的表达增高,表明这些酶在棕色脂肪分化过程中可能催化了H3K27位点的甲基擦除,使得分化基因开始转录。其中*Jmjd3*和*Utx*已经有报道,可以促进棕色脂肪分化,但研究是在成年小鼠中进行的^[7-8],本研究的结果表明,在胚胎期,这两个基因同样发挥促进棕色脂肪细胞分化的作用。

H3k4甲基化后主要诱导转录激活,去甲基化后引起转录沉默^[20]。筛查的5个H3k4位点的去甲基化酶均为低表达或表达无改变,这表明在胚胎期棕色脂肪细胞分化过程中,H3k4的去甲基化酶是表达关闭的,使得抑制基因表达的H3k4去甲基化修饰占据劣势,激活基因表达的甲基化修饰相对占据优势,配合H3K27的去甲基化,将激活分化基因转录,分化得以进行。

H3k36甲基化后表现为转录延长,去甲基化后延长受阻^[21]。其去甲基化酶*Jhdm1a*仅在E18.5一

表2 22种去甲基化作用底物及基因表达单因素方差分析结果
Table 2 Substrates of 22 demethylation and gene expression analyzed by One-Way ANOVA

Number	Name	Demethylation substrate	F	P
1	<i>Jarid1a</i>	H3K4me2/me3	20.593	0.000
2	<i>Jarid1b</i>	H3K4me2/me3	6.051	0.010
3	<i>Jarid1c</i>	H3K4me2/me3	0.790	0.558
4	<i>Jarid1d</i>	H3K4me2/me3	126.192	0.009
5	<i>Lsd1</i>	H3K4me1/me2, H3K9me1/me2	142.334	0.000
6	<i>Jmjd2a</i>	H3K9me2/me3, H3K36me2/me3, H1.4K26me2/me3	37.609	0.000
7	<i>Jmjd2b</i>	H3K9me2/me3, H3K36me2/me3, H1.4K26me2/me3	10.114	0.002
8	<i>Jmjd2c</i>	H3K9me2/me3, H3K36me2/me3, H1.4K26me2/me3	59.502	0.000
9	<i>Jmjd2d</i>	H3K9me2/me3, H1.4K26me2/me3	67.579	0.000
10	<i>Phf2</i>	H3K9me2	26.306	0.000
11	<i>Phf8</i>	H3K9me1/me2, H4K20me1	89.487	0.000
12	<i>MINA</i>	H3K9me3	1.257	0.343
13	<i>Jmjd1c</i>	H3K9me1/me2	20.882	0.000
14	<i>Jhdm2a</i>	H3K9me1/me2	12.808	0.001
15	<i>Jhdm2b</i>	H3K9me1/me2	5.815	0.011
16	<i>Jmjd4</i>	H3K36me3	31.288	0.000
17	<i>Jmjd5</i>	H3K36me2	11.435	0.001
18	<i>Jhdm1a</i>	H3K36me1/me2	13.446	0.000
19	<i>Jhdm1b</i>	H3K36me1/me2, H3K4me3	19.878	0.000
20	<i>Jmjd3</i>	H3K27me2/me3	55.013	0.000
21	<i>Utx</i>	H3K27me2/me3	86.711	0.000
22	<i>Jhdm1d</i>	H3K27me1/me2, H3K9me1/me2	25.169	0.000

过性表达升高,其余时间点和去甲基化酶均为低表达或表达无明显变化,表现出以促进转录延长的效应为主。根据前述对其他H3位点去甲基化酶的表达分析,这些酶表现为转录激活效应为主的表达模式,与H3k36位点的转录延长效应相协调,也就是在胚胎棕色脂肪细胞的分化过程中,这些表观遗传学调控机制形成复杂的调控网络,相互协调,以激活基因表达和促进转录延长的效应为主,最终使得细胞分化成熟。

综上所述,在小鼠胚胎期棕色脂肪细胞的分化过程中,H3k4和H3k36去甲基化酶基因主要为表达下调,H3k27和H3k9位点的几种去甲基化酶基因部分表达关闭,部分上调,最终呈现出转录激活和转录延长的表达模式。研究结果揭示了棕色脂肪细胞分化调控的复杂性,要想清楚地掌握棕色脂肪细胞分化调控机制,并利用棕色脂肪细胞耗能来治疗肥胖,还需要付出很大的努力,做大量的研究工作,才有可能实现在人体的应用。

参考文献

[1] Lee SY, Chang HJ, Sung J, et al. The impact of obesity on subclinical coronary atherosclerosis according to the risk of cardiovascular disease [J]. *Obesity*,

2014, 22(7): 1762-1768.

[2] Sidossis L, Kajimura S. Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(2): 478-486.

- [3] Rodrigo FV, Kara LM, Eric RR, et al. Contribution of brown adipose tissue to human energy metabolism [J]. *Mol Aspects Med*, 2019, 68: 82–89.
- [4] 涂清强. 温度对乳腺癌小鼠棕色脂肪¹⁸F-FDG Micro-PET/CT成像的影响[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2020, 41(4): 558–562.
TU Qing-qiang. Effects of temperature on ¹⁸F-FDG Micro-PET/CT imaging of brown adipose tissue in tumor mice [J]. *J SUN Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2020, 41(4): 558–562.
- [5] Lee P, Bova R, Schofield L, et al. Brown adipose tissue exhibits a glucose-responsive thermogenic bio-rhythm in humans [J]. *Cell Metab*, 2016, 23(4): 602–609.
- [6] Lee P, Ho KK, Fulham MJ. The importance of brown adipose tissue [J]. *N Engl J Med*, 2009, 361(4): 418–420.
- [7] Pan D, Huang L, Zhu LJ, et al. Jmjd3-mediated H3K27me3 dynamics orchestrate brown fat development and regulate white fat plasticity [J]. *Dev Cell*, 2015, 35(5): 568–583.
- [8] Zha L, Li F, Wu R, et al. The histone demethylase utx promotes brown adipocyte thermogenic program via coordinated regulation of H3K27 demethylation and acetylation [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(41): 25251–25163.
- [9] Birsoy K, Berry R, Wang T, et al. Analysis of gene networks in white adipose tissue development reveals a role for ETS2 in adipogenesis [J]. *Development*, 2011, 138(21): 4709–4719.
- [10] Matsumura Y, Nakaki R, Inagaki T, et al. H3K4/H3K9me3 bivalent chromatin domains targeted by lineage-specific DNA methylation pauses adipocyte differentiation [J]. *Mol Cell*, 2015, 60(4): 584–596.
- [11] Lee KH, Ju UI, Song JY, et al. The histone demethylase PHF2 promotes fat cell differentiation as an epigenetic activator of both C/EBP α and C/EBP δ [J]. *Mol Cells*, 2014, 37(10): 734–741.
- [12] Duteil D, Tosic M, Lausecker F, et al. Lsd1 Ablation triggers metabolic reprogramming of brown adipose tissue [J]. *Cell Rep*, 2016, 17(4): 1008–1021.
- [13] Seale P, Bjork B, Yang W, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch [J]. *Nature*, 2008, 454(7207): 961–967.
- [14] Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat [J]. *Cell*, 2014, 156(1–2): 20–44.
- [15] Satoshi I, Wei Ch, Tomoyoshi N, et al. PRDM16 enhances nuclear receptor-dependent transcription of the brown fat-specific Ucp1 gene through interactions with mediator subunit MED1 [J]. *Genes Dev*, 2015, 29(3): 308–321.
- [16] Gonzalez HE, Lee J, Choi J, et al. Fatty acid oxidation is required for active and quiescent brown adipose tissue maintenance and thermogenic programming [J]. *Mol Metab*, 2018, 7: 45–56.
- [17] Swigut T, Wysocka J. H3K27 demethylases, at long last [J]. *Cell*, 2007, 131(1): 29–32.
- [18] Tachibana M, Nozaki M, Takeda N, et al. Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression [J]. *EMBO J*, 2007, 26(14): 3346–3359.
- [19] Labbé RM, Holowatyj A, Yang ZQ. Histone lysine demethylase (KDM) subfamily 4: structures, functions and therapeutic potential [J]. *Am J Transl Res*, 2014, 6(1): 1–15.
- [20] Dou Y, Milne TA, Ruthenburg AJ, et al. Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(8): 713–719.
- [21] Hsia DA, Tepper CG, Pochampalli MR, et al. KDM8, a H3K36me2 histone demethylase that acts in the cyclin A1 coding region to regulate cancer cell proliferation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(21): 9671–9676.

(编辑 余菁)