

组蛋白去乙酰化酶 9 在骨髓间充质干细胞衰老过程中的表达

https://doi.org/10.12307/2022.754

詹渊博¹, 刘昕朋², 许文霞², 苗楠¹, 穆森¹, 张瑞敏¹, 李莹²

投稿日期: 2021-08-02

采用日期: 2021-10-11

修回日期: 2021-11-30

在线日期: 2021-12-15

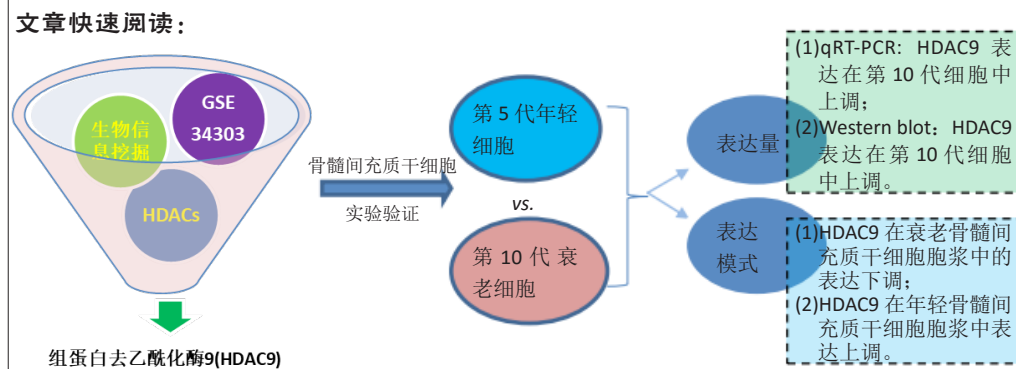
中图分类号:

R459.9; R394.2; R711.75

文章编号:

2095-4344(2022)30-04762-05

文献标识码: A



文题释义:

骨髓间充质干细胞: 是再生医学领域中重要的种子细胞, 骨髓间充质干细胞自然传代至第7-10代时, 即出现细胞衰老的表征, 极大地影响了其临床转化应用。

组蛋白去乙酰化酶: 是基因表达的抑制因子, 主要是因为组蛋白去乙酰化酶可以使组蛋白脱乙酰化而使染色质处于浓缩状态, 进一步关闭基因。组蛋白去乙酰化酶活性对衰老相关的基因、端粒酶均有调控作用, 明确组蛋白去乙酰化酶亚型对于研发抗骨髓间充质干细胞衰老的药物有着重要意义。

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞在体外培养传代过程中存在细胞老化现象, 但其机制尚不明确。组蛋白去乙酰化酶可以使组蛋白脱乙酰化而使染色质处于浓缩状态, 进一步关闭基因。

目的: 探讨骨髓间充质干细胞衰老过程中组蛋白去乙酰化酶9的表达模式。

方法: 通过生物信息学挖掘技术分析组蛋白去乙酰化酶在骨髓间充质干细胞中的表达; 通过体外传代培养骨髓间充质干细胞, β -半乳糖苷酶染色和qRT-PCR方法检测其衰老状态, qRT-PCR、Western blot及免疫荧光技术检测组蛋白去乙酰化酶9的表达模式。

结果与结论: ①数据挖掘、生物信息学分析显示在骨髓间充质干细胞衰老过程中, 所有组蛋白去乙酰化酶亚型中, 只有组蛋白去乙酰化酶9呈现高表达; ②骨髓间充质干细胞在传至10代时可表现明显的衰老状态, 如 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞最为明显, 衰老相关基因表达上调; ③组蛋白去乙酰化酶9的表达与数据挖掘结果一致, 呈现上调; 组蛋白去乙酰化酶9在年轻骨髓间充质干细胞的胞核与胞浆中均有表达, 但其在胞核中的表达较低, 衰老骨髓间充质干细胞胞浆中几乎不表达组蛋白去乙酰化酶9, 而其在胞核中的表达增加; ④结果表明, 组蛋白去乙酰化酶9在骨髓间充质干细胞衰老过程中具有重要的作用, 但其衰老表型与组蛋白去乙酰化酶9发挥作用的分子机制尚待进一步研究。

关键词: 干细胞; 骨髓间充质干细胞; 细胞衰老; 自然衰老; 组蛋白去乙酰化酶9

缩略语: 组蛋白去乙酰化酶: histone deacetylase, HDACs

Expression of histone deacetylase 9 in bone marrow mesenchymal stem cells during senescence

Zhan Yuanbo¹, Liu Xinpeng², Xu Wenxia², Miao Nan¹, Mu Sen¹, Zhang Ruimin¹, Li Ying²

¹Department of Periodontal Mucosa, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China; ²Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Hard Tissue Development and Regeneration, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Zhan Yuanbo, MD, Attending physician, Department of Periodontal Mucosa, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Corresponding author: Li Ying, MD, Chief physician, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Hard Tissue Development and Regeneration, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Abstract

BACKGROUND: Bone marrow mesenchymal stem cells have aging phenomenon during *in vitro* culture, but the mechanism is still unclear. Histone deacetylases can deacetylate histones and make the chromatin condense, further shutting down genes.

OBJECTIVE: To investigate the expression pattern of histone deacetylase 9 in bone marrow mesenchymal stem cells during senescence.

¹哈尔滨医科大学附属第二医院牙周黏膜科, 黑龙江省哈尔滨市 150086; ²黑龙江省硬组织发育与再生重点实验室, 黑龙江省哈尔滨市 150086

第一作者: 詹渊博, 男, 1986年生, 陕西省渭南市人, 汉族, 2018年哈尔滨医科大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事干细胞衰老方面的研究。

通讯作者: 李莹, 博士, 主任医师, 黑龙江省硬组织发育与再生重点实验室, 黑龙江省哈尔滨市 150086

https://orcid.org/0000-0003-0416-8911 (詹渊博); https://orcid.org/0000-0001-5924-8316 (李莹)

基金资助: 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费基础研究项目 (2019-KYYWF-0347), 项目负责人: 詹渊博; 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82001488), 项目负责人: 詹渊博; 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81801040), 项目负责人: 李莹

引用本文: 詹渊博, 刘昕朋, 许文霞, 苗楠, 穆森, 张瑞敏, 李莹. 组蛋白去乙酰化酶9在骨髓间充质干细胞衰老过程中的表达

[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(30):4762-4766.



METHODS: The expression of histone deacetylases in bone marrow mesenchymal stem cells was analyzed by bioinformatics. Bone marrow mesenchymal stem cells were cultured by *in vitro* subculture. The senescence status of bone marrow mesenchymal stem cells was detected by β -galactosidase staining and qRT-PCR. The expression pattern of histone deacetylase 9 was detected by qRT-PCR, western blot assay, and immunofluorescence.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Data mining and bioinformatics analysis showed that only histone deacetylase 9 expression was up-regulated among all histone deacetylase subtypes during bone marrow mesenchymal stem cell senescence. (2) Bone marrow mesenchymal stem cells presented obvious senescence at passage 10; for example, β -galactosidase-positive cells were the most obvious, and the expression of senescence-related genes was up-regulated. (3) The expression of histone deacetylase 9 was up-regulated and consistent with the data mining results. Histone deacetylase 9 was expressed in both the nucleus and cytoplasm of young bone marrow mesenchymal stem cells, but the expression in the nucleus was lower than that in the nucleus of senescence bone marrow mesenchymal stem cells. The expression of histone deacetylase 9 was almost not expressed in the cytoplasm of senescence bone marrow mesenchymal stem cells, but increased in the nucleus. (4) The results have shown that histone deacetylase 9 plays an important role in the senescence process of bone marrow mesenchymal stem cells, but the aging phenotype and molecular mechanism of histone deacetylase 9 need to be further studied.

Key words: stem cells; bone marrow mesenchymal stem cells; cellular senescence; natural aging; histone deacetylase 9

Funding: Basic Research Project of Basic Scientific Research Business Expenses of Heilongjiang Provincial Colleges and Universities, No. 2019-KYYWF-0347 (to ZYB); Youth Science Fund Project of National Natural Science Foundation of China, No. 82001488 (to ZYB); Youth Science Fund Project of National Natural Science Foundation of China, No. 81801040 (to LY)

How to cite this article: ZHAN YB, LIU XP, XU WX, MIAO N, MU S, ZHANG RM, LI Y. Expression of histone deacetylase 9 in bone marrow mesenchymal stem cells during senescence. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(30):4762-4766.

0 引言 Introduction

骨髓间充质干细胞是一种具有高度增殖、自我复制和多向分化潜能的干细胞^[1]。在口腔颌面部发育畸形矫正、慢性牙周炎治疗、创伤及肿瘤等原因造成的各种口腔颌面部大面积软硬组织缺损修复上，骨髓间充质干细胞具有重要的作用和广阔的临床应用前景^[2-3]。然而骨髓间充质干细胞并非是“长生不老”的细胞，不管是随着年龄的增长还是在体外培养体系中，骨髓间充质干细胞都会逐渐衰老。衰老的骨髓间充质干细胞会出现细胞形态改变(如体积变大、扁平化等)、亚细胞结构变异(如端粒变短等)、多向分化能力丧失(如自我更新和多向分化能力明显下降、增殖分化失控等)^[4]，这极大影响了其在实际临床治疗中的作用^[5]。骨髓间充质干细胞在衰老过程中，可引起干细胞潜能性降低^[6]，其维持细胞干性的基因如 Oct4、Sox2、Nanog 等表达下调，而衰老相关的基因如 p16、p21、p53 等表达上调^[7]。表观遗传作用机制在基因表达调控方面具有重要的作用，其主要是通过调控染色质的状态改变 DNA 与组蛋白的结构^[8]，组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDACs)被认为是基因表达的抑制因子，其可以使组蛋白脱乙酰化而使染色质处于浓缩状态，进一步关闭基因^[9]。HDACs 活性对于上述干性基因以及衰老相关基因、端粒酶均有调控作用^[10-11]。一些抗衰老的药物研发也是通过探究 HDACs 抑制剂来实现的^[12]；目前已发现 HDACs 亚型有 11 个(HDAC1-11)，HDACs 在进化上比较保守，根据其 DNA 序列的相似性，经典的 HDACs(1-11)可以将其分为 3 类，class I (HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC8)，Class II (HDAC5、HDAC9、HDAC6、HDAC10)；Class IV (HDAC11)，而较特殊的 Class III 类主要是由 sirtuins 家族组成^[13]，探究出哪一种 HDACs 在骨髓间充质干细胞衰老过程中发挥关键作用，对于研发预防骨髓间充质干细胞衰老的相关药物，将有着重要的实际意义。该研究主要是通过生物信息学及相关分子生物学技术分析骨髓间充质干细胞衰老过程中 HDAC9 的表达。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞体外实验，组间均数比较采用 *t* 检验分析。

1.2 时间及地点 实验于 2019 年 10 月至 2021 年 9 月在黑龙

江省硬组织发育与再生重点实验室完成。

1.3 材料 大鼠骨髓间充质干细胞株购买自赛业生物科技有限公司，货号：RASM-X-01001，已有质检报告。DMEM 培养基(货号：RAXMX-90011，赛业生物科技有限公司)；TRIZOL (Invitrogen 公司，美国，货号：15596026)；PrimeScript RT master mix (TaKaRa 公司，日本，货号：DRR047A)；SYBR Premix EX Taq™ II (TaKaRa 公司，日本，货号：DRR420A)。

1.4 实验方法

1.4.1 基因表达谱数据分析 GSE34303 取自于基因表达谱数据库(GEO)^[14-15]。该数据比较了不同传代次数后衰老骨髓间充质干细胞的转录组。为了明确衰老组与年轻组之间的差异，该研究选其 passage2/3 与 passage10/11 进行分析。差异表达基因分析：利用 BRB-ArrayTools v4.2.0 中的 RMA(robust multi-array analysis)方法对于原始数据进行标准化和归一化处理^[16]，用其中附带的 SAM(significant analysis of microarrays)方法分析差异表达基因，并确认其中 HDACs 的表达，设置假发现率(FDR) < 0.05。

1.4.2 挖掘与 HDAC9 共表达(co-expression)的基因 通过 BRB-ArrayTools v4.2.0 中“create genelist”->“Correlated with a target gene”功能，筛选与 HDAC9 共表达的基因，为了结果的可靠性，选取其相关系数 ≥ 0.5 (正相关)或 < -0.5 (负相关)。进一步通过人类衰老基因组数据库(human ageing genomic resources, HAGR)来确认共表达基因中是否含有衰老相关的基因^[17]。

1.4.3 β -半乳糖苷酶染色 将年轻的大鼠骨髓间充质干细胞(第 5 代, p5)及衰老的大鼠骨髓间充质干细胞(第 10 代, p10)按照 5×10^4 个/孔均匀接种到 6 孔板中，置于 37 °C，体积分数为 5% CO₂ 培养箱培养 48 h 后，吸除细胞培养液，PBS 洗涤 1 次，加入 1 mL β -半乳糖苷酶染色固定液，室温固定 1 h，吸除固定液，PBS 洗涤细胞 3 次，每次 3 min，吸尽 PBS 后每孔加入 1 mL 染色工作液，避光于 37 °C 摇床上缓慢摇晃孵育过夜，次日在光学显微镜下观察其变成蓝色的细胞数目。

1.4.4 Real-time PCR 检测衰老相关基因表达 取年轻的大鼠骨髓间充质干细胞(第 5 代)及衰老的大鼠骨髓间充质干细胞

(第10代), 置于 37 °C, 体积分数为 5% CO₂ 培养箱培养。当细胞融合度达到 80% 时进行消化, 然后将消化下来的细胞以 5×10⁴ 个 / 孔的细胞密度接种在 6 孔板中, 每孔加入 2 mL 完全培养基, 置于 37 °C 体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 采取 Trizol 法提取细胞总 RNA, 严格按照 SYBR®Premix Ex Taq™(DRR047A) 说明书进行。预变性: 95 °C 30 s, 1 Cycle; PCR 反应: 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 40 Cycles; 熔解曲线: 95 °C 30 s, 65–90 °C 1 s。以 GAPDH 为管家基因, 采用 2^{-ΔΔCt} 法分析各组衰老基因 (p16、p21 及 p53) 表达的相对差异。基因引物序列, 见表 1。

表 1 | 基因引物序列信息

Table 1 | Information of gene primer sequences

基因	引物序列
HDAC9	F-Primer: 5'-AAG CCT CGT TTT CCG TAA CAT-3' R-Primer: 5'-GGC AGA ATC CTC GGT CAG TAG-3'
p16	F-Primer: 5'-GAT GGG CAA CGT CAA AGT GG-3' R-Primer: 5'-TAC CGC AAA TAC CGC ACG AC-3'
p21	F-Primer: 5'-GGG AGG GCT TTC TTT GTG TA-3' R-Primer: 5'-GCA TCG TCA ACA CCC TGT CT-3'
p53	F-Primer: 5'-TGA CTT TAG GGC TTG TTA TGA GAG-3' R-Primer: 5'-CAG CAG AGA CCC AGC AAC TAC-3'
GAPDH	F-Primer: 5'-GAC AAC TCC CTC AAG ATT GTC AG-3' R-Primer: 5'-ATG GCA TGG ACT GTG GTC ATG AG-3'

1.4.5 Western blot 及免疫荧光染色检测 HDAC9 的表达 将年轻 (第 5 代) 及衰老 (第 10 代) 的大鼠骨髓间充质干细胞按照 5×10⁴ 个 / 孔的细胞密度接种在 6 孔板中, 每孔加入 2 mL 完全培养基, 置于 37 °C, 体积分数为 5% CO₂ 培养箱中进行培养。培养 24 h 后提取总蛋白, 每孔加入 60 μL RIPA-PMSF 裂解液进行细胞裂解, 用细胞刮板将含有裂解液的细胞整体小心刮下, 用移液器将全部“细胞-蛋白混合液”移至 EP 管中, 置冰上裂解 20 min, 期间每隔 5 min 进行充分涡旋 1 次, 共 4 次; 裂解充分后, 于 4 °C、13 000 r/min 离心 20 min; 吸取上清液 (即为所提取蛋白样品) 至新的 EP 管, 采用 BCA 法进行蛋白浓度测定; 配 SDS-PAGE 胶, 电泳、转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入稀释好的一抗 HDAC9 (Abcam 公司, 货号 ab109446, 1 : 1 000), 4 °C 孵育过夜; 脱色摇床 TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min, 加入稀释好的二抗, 混匀, 孵育 1 h, 脱色摇床 TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 最后用 ECL 显色液显影, 应用化学发光成像系统成像拍照。

将年轻的大鼠骨髓间充质干细胞 (第 5 代) 及衰老的大鼠骨髓间充质干细胞 (第 10 代) 按照 2×10⁴ 个 / 孔的细胞密度接种于含有细胞玻片的 24 孔板中培养 24 h, 40 g/L 多聚甲醛 (pH=7.4) 固定, 去除固定液, PBS 洗涤, 每孔加入 2 mL 0.5% Triton X-100, 冰上孵育 15 min, 去除 0.5% Triton X-100, PBS 洗涤 3 次, 每次 2 min, 用封闭液封闭 60 min, 去除封闭液, 加入稀释好的 HDAC9 (Abcam 公司, 货号 ab109446) 一抗 (1 : 400), 4 °C 孵育过夜, 去除一抗, PBS 洗涤, 加入稀释好的荧光标记的二抗, 避光孵育 60 min, 滴加防淬灭剂, 封固, 荧光显微镜下观察。

1.5 主要观察指标 ①高通量数据 GSE34303 中 HDAC9 的表

达; ②骨髓间充质干细胞衰老后 β- 半乳糖苷酶染色以及衰老基因 p16、p21、p53 的表达; ③ HDAC9 基因及蛋白在年轻 (第 5 代) 及衰老 (第 10 代) 骨髓间充质干细胞的表达。

1.6 统计学分析 采用 Prism 6 统计软件进行数据分析, 组间均数比较采用 t 检验分析, P < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 数据挖掘分析 HDAC9 在衰老骨髓间充质干细胞中的表达 通过数据挖掘、生物信息学对 GEO 数据中骨髓间充质干细胞衰老相关数据集 GSE34303 进行分析, 结果显示细胞在衰老过程中, 只有 HDAC9 呈现高表达状态, 见图 1。

2.2 共表达分析 通过 BRB-ArrayTools v4.2.0 中 “create genelist” -> “Correlated with a target gene” 功能, 发现与 HDAC9 共表达的基因有 40 个, 均为正相关。进一步通过 HAGR 数据库, 发现 40 个共表达的基因中有 3 个基因 (ANGPTL4、PLAT、SCN9A) 为衰老相关基因, 见图 1。

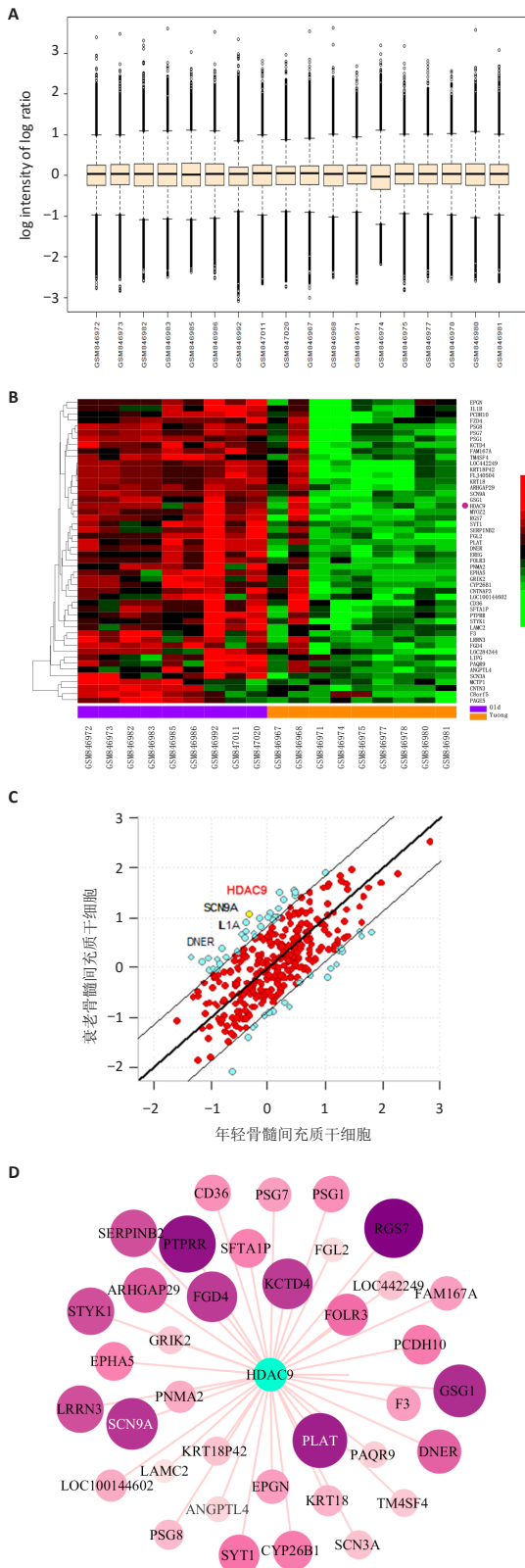
2.3 β- 半乳糖苷酶染色结果 第 10 代骨髓间充质干细胞已经表现出了明显的衰老现象, β- 半乳糖苷酶染色阳性细胞最为明显。为了进一步明确第 10 代骨髓间充质干细胞的衰老状态, 对相关衰老基因的表达进行了检测, 结果显示: 与第 5 代比较, p16、p21 及 p53 在第 10 代骨髓间充质干细胞中表现出高表达状态, 差异有显著性意义, 见图 2。

2.4 qRT-PCR 技术分析骨髓间充质干细胞衰老过程中 HDAC9 的表达 与 GEO 数据库中的结果一致: 在衰老时 HDAC9 呈现高表达状态, 差异有显著性意义; Western blot 检测结果与 qRT-PCR 结果一致, HDAC9 蛋白在衰老的骨髓间充质干细胞中表达增加, 见图 2。

2.5 免疫荧光检测 HDAC9 在衰老及年轻骨髓间充质干细胞中的表达 HDAC9 在年轻骨髓间充质干细胞的胞核与胞浆中均有表达, 但 HDAC9 在胞核中的表达低于衰老细胞。衰老骨髓间充质干细胞的胞浆中几乎不表达 HDAC9, 而细胞核中的表达增加, 见图 3。

3 讨论 Discussion

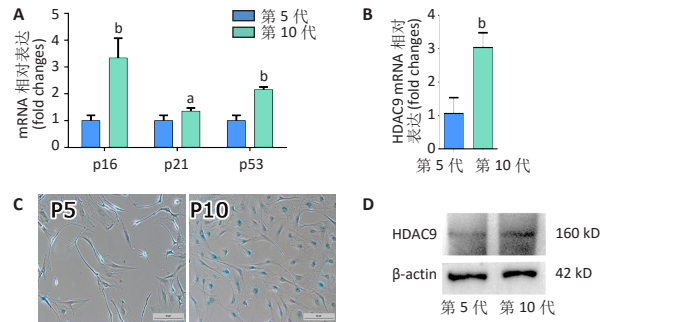
骨髓间充质干细胞由于其在体外易于获得和分离、具有自我更新、多向分化能力和低免疫原性, 目前已经成为细胞治疗领域极具吸引力的种子细胞之一, 有望成为细胞治疗和再生医学的重要资源^[1, 18]。然而骨髓间充质干细胞在体外培养过程中由于其传代所造成的衰老问题, 为其临床应用增加了难度和不确定因素, 这些均是影响其临床应用的关键问题之一。有研究结果显示: 骨髓间充质干细胞自然传代至第 7–10 代时, 即出现细胞衰老的表征, 细胞体积逐代增大, 胞质铺开, 形态变得扁平, 生长速度减慢; β- 半乳糖苷酶染色阳性率开始增多^[19–20], 提示骨髓间充质干细胞在体外增殖过程中发生衰老, 细胞传代越多, 衰老越明显。该研究将骨髓间充质干细胞传至 10 代时表现出较明显的衰老现象, 与以往研究较为一致。



图注：图 A 为标准化后各样本基因表达箱式图，横坐标代表样本编号，纵坐标为表达值取对数的值；B 为差异表达基因热图，差异表达 top50 个基因，横坐标为样本名称，纵坐标表示基因名称；C 为衰老与年轻骨髓间充质干细胞的差异表达基因的散点图，横坐标及纵坐标代表倍数变化；D 为与 HDAC9 共表达的基因，节点越大、颜色越深代表相关系数越大

图 1 | 数据挖掘高通量数据集 GSE34303 中组蛋白去乙酰化酶 9(HDAC9) 的表达

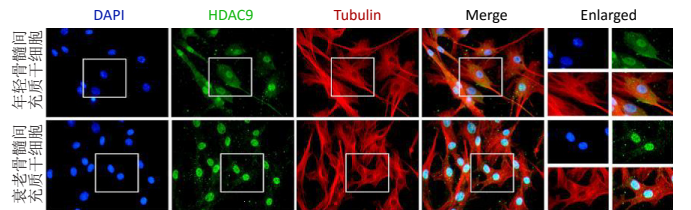
Figure 1 | Expression of histone deacetylase 9 (HDAC9) in data mining of high-throughput data set GSE34303



图注：图 A 为 RT-PCR 检测衰老基因 p16、p21 及 p53 表达，与第 5 代比较，^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ ($n=3$)；B 为 RT-PCR 检测细胞衰老时 HDAC9 的表达，与第 5 代比较，^b $P < 0.01$ ($n=3$)；C 为骨髓间充质干细胞 β -半乳糖苷酶染色 (标尺为 50 μm)；D 为 Western blot 检测 HDAC9 蛋白表达

图 2 | 骨髓间充质干细胞衰老基因表达、组蛋白去乙酰化酶 9(HDAC9) 基因和蛋白表达以及 β -半乳糖苷酶染色

Figure 2 | Bone marrow mesenchymal stem cell aging gene expression, and histone deacetylase 9 (HDAC9) gene and protein expression and β -galactosidase staining



图注：HDAC9，绿色荧光；Tubulin，红色荧光 (细胞骨架)；DAPI，蓝色荧光 (细胞核)

图 3 | 组蛋白去乙酰化酶 9(HDAC9) 在骨髓间充质干细胞中的表达定位 ($\times 200$)

Figure 3 | Localization of histone deacetylase 9 (HDAC9) expression in bone marrow mesenchymal stem cells ($\times 200$)

以往研究认为表观遗传调控机制在干细胞衰老方面有着重要的作用^[21]。HDACs 主要通过影响染色质的结构及转录因子的活性来调控基因的转录过程，起到基因表达沉默的作用^[22]。多种 HDACs 在衰老过程中有着不同的表达模式^[23]，其中最具代表性的为 HDACs 第二亚类 (II a)HDAC9，其在衰老的肌肉细胞^[24]、成纤维细胞中都有异常表达^[25]，在干细胞分化过程中其还可以负向调控成脂分化，影响端粒的长短^[26]。另有研究显示下调 HDAC9 的表达将会导致骨髓间充质干细胞的成骨偶联成血管分化能力降低，成脂分化能力增强^[27]。课题组前期也发现在骨髓间充质干细胞成脂过程中阿司匹林可以影响 HDAC9 的表达^[28]。

为了进一步明确 HDAC9 在骨髓间充质干细胞衰老过程中的表达，通过生物信息学及实验验证发现，细胞衰老后 HDAC9 呈现高表达状态，且其在衰老的骨髓间充质干细胞中呈现出不同的表达模式，HDAC9 在年轻骨髓间充质干细胞的细胞核与细胞浆中均有表达，而当细胞衰老时，HDAC9 在细胞浆中的表达降低，而细胞核中的表达增强。虽然通过生物信息技术对高通量数据 GSE34303 挖掘后，发现衰老的骨髓间充质干细胞中，仅有 HDAC9 呈现出差异表达，但是通过 qRT-PCR 进行验证后其他 HDACs 亚型也有不同程度的差异表达，前期发现阿司匹林可以逆转骨髓间充质干细胞的衰老，且在成脂分化过程中可以影响 HDAC9 的表达^[28]，因此该研

究重点关注了 HDAC9，后期对于其他 HDACs 亚型的表达模式还需进一步研究。

有研究显示在炎症微环境状态下，牙周膜干细胞中 HDAC9 的表达也呈现高表达状态^[29]。另外，抑制 HDAC9 的表达后可以促进成骨分化而抑制成脂分化，重要的是，抑制 HDAC9 后可以改变衰老蛋白 P53 的表达及磷酸化水平^[29]，结合该研究 HDAC9 在衰老干细胞中的表达模式，进一步提示 HDAC9 在干细胞功能中具有重要作用，但其衰老表型与 HDAC9 发挥作用的分子机制尚待进一步研究。研究结果显示 HDAC9 可以通过调节 PPAR γ /RANKL 信号抑制破骨细胞形成^[30]。ZHANG 等^[29]研究发现 HDAC9 在小鼠增龄相关的骨流失过程中，其骨髓及骨髓间充质干细胞中的 HDAC9 呈高表达状态，与此研究结果相一致。CHEN 等^[31]研究结果显示 EZH2(enhancer of zeste homolog 2) 可以通过下调 HDAC9 的表达进而调控衰老干细胞的成骨及成脂分化。另外 HDAC9 在成骨及炎症状态的牙周膜干细胞中也具有重要的作用，如 LI 等^[32]研究表明，HDAC9 与 miR-17 相互作用可以调控炎症状态下人牙周膜干细胞的成骨分化。HDAC9 除了在干细胞方面的研究外，其还可以调控巨噬细胞 M2 的极化状态^[33]，衰老可以导致巨噬细胞从抗炎的 M2 型转换为促炎的 M1 型^[34]，那么在上述衰老及炎症状态下的干细胞中，HDAC9 是否参与了调控巨噬细胞的 M1/M2 极化，有待进一步研究。

研究发现，与 HDAC9 共表达的 40 个基因中，有 3 个基因 ANGPTL4、PLAT、SCN9A 为衰老基因，ANGPTL4(血管生成素样蛋白 4) 在间充质干细胞复制性衰老过程中表达下调^[35]，PLAT 基因的多态性与衰老相关^[36]，SCN9A 在癌基因诱导的细胞衰老中呈高表达状态，而 SCN9A 缺失的情况下，细胞则不出现衰老状态^[37]，这些也从侧面提示 HDAC9 与衰老的发生、发展有着重要的作用。

综上所述，该研究初步验证了 HDAC9 在骨髓间充质干细胞自然衰老中呈现高表达状态，该结果为下一步研究其在骨髓间充质干细胞衰老过程中的作用机制奠定基础，也为进一步筛选新的延缓骨髓间充质干细胞衰老药物靶点提供参考，对于推动干细胞临床应用具有重要意义。

作者贡献：实验设计为詹洲博、李莹，实验实施为刘昕朋、许文霞、苗楠、穆森，实验评估为张瑞敏，资料收集为刘昕朋、许文霞。

经费支持：该文章接受了“黑龙江省省属高等学校基本科研业务费基础研究项目(2019-KYYWF-0347)”和“国家自然科学基金青年科学基金项目(82001488, 81801040)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题：实验用细胞购自赛业生物科技有限公司，该研究为体外细胞基础实验，未涉及伦理学问题。

写作指南：该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

生物统计学声明：文章统计学方法已经通过李莹教授审核。

文章版权：文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》(署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0) 条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- SAEED H, IQTEDAR M. Bone Marrow Stromal Cell (BMSC) and skeletal aging: role of telomerase enzyme. *Pak J Pharm Sci.* 2014;27(2):321-333.
- SUNIL P, MANIKANDHAN R, MUTHU M, et al. Stem cell therapy in oral and maxillofacial region: An overview. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16(1):58-63.
- POURLAK T, POURLAK T, GHODRATI M, et al. Usage of stem cells in oral and maxillofacial region. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2021;122(4):441-452.
- RHINN M, RITSCHKA B, KEYES WM. Cellular senescence in development, regeneration and disease. *Development.* 2019;146(20):dev151837.
- LEPPERDINGER G. Inflammation and mesenchymal stem cell aging. *Curr Opin Immunol.* 2011;23(4):518-524.
- ASUMDA FZ, CHASE PB. Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity. *BMC Cell Biol.* 2011;12:44.
- BAKER N, BOYETTE LB, TUAN RS. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone.* 2015;70:37-47.
- ARENTS G, BURLINGAME RW, WANG BC, et al. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(22):10148-10152.
- CRESS WD, SETO E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol.* 2000;184(1):1-16.
- PELEG S, FELLER C, LADURNER AG, et al. The Metabolic Impact on Histone Acetylation and Transcription in Ageing. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(8):700-711.
- WANG Y, CHEN T, YAN H, et al. Role of histone deacetylase inhibitors in the aging of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2013;114(10):2231-2239.
- PASYUKOVA EG, VAISERMAN AM. HDAC inhibitors: A new promising drug class in anti-aging research. *Mech Ageing Dev.* 2017;166:6-15.
- GREGORETTI IV, LEE YM, GOODSON HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol.* 2004;338(1):17-31.
- REN J, STRONCEK DF, ZHAO Y, et al. Intra-subject variability in human bone marrow stromal cell (BMSC) replicative senescence: molecular changes associated with BMSC senescence. *Stem Cell Res.* 2013;11(3):1060-1073.
- EDGAR R, DOMRACHEV M, LASH AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(1):207-210.
- SIMON R, LAM A, LI MC, et al. Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. *Cancer Inform.* 2007;3:11-17.
- TACUTU R, THORNTON D, JOHNSON E, et al. Human Ageing Genomic Resources: new and updated databases. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1083-D1090.
- STRONCEK DF, SABATINO M, REN J, et al. Establishing a bone marrow stromal cell transplant program at the National Institutes of Health Clinical Center. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20(3):200-205.
- RATUSHNYI AY, RUDIMOVA YV, BURAVKOVA LB. Replicative Senescence and Expression of Autophagy Genes in Mesenchymal Stromal Cells. *Biochemistry (Mosc).* 2020;85(10):1169-1177.
- BERTOLO A, GUERRERO J, STOYANOV J. Autofluorescence-based sorting removes senescent cells from mesenchymal stromal cell cultures. *Sci Rep.* 2020;10(1):19084.
- CAKOUROS D, GRONTHOS S. Epigenetic Regulation of Bone Marrow Stem Cell Aging: Revealing Epigenetic Signatures associated with Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cell Aging. *Aging Dis.* 2019;10(1):174-189.
- DE RUIJTER AJ, VAN GENNIP AH, CARON HN, et al. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J.* 2003;370(Pt 3):737-749.
- 张文娟, 纪卫东, 杨淋清, 等. 细胞复制性衰老及早衰过程中组蛋白整体乙酰化改变 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2008,5(5):387-392.
- LIN IH, CHANG JL, HUA K, et al. Skeletal muscle in aged mice reveals extensive transformation of muscle gene expression. *BMC Genet.* 2018;19(1):55.
- MASON DX, JACKSON TJ, LIN AW. Molecular signature of oncogenic ras-induced senescence. *Oncogene.* 2004;23(57):9238-9246.
- JAMIRUDDIN MR, KAITSUKA T, HAKIM F, et al. HDAC9 regulates the alternative lengthening of telomere (ALT) pathway via the formation of ALT-associated PML bodies. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;481(1-2):25-30.
- 王博. 下调的 HDAC9 通过抑制骨髓间充质干细胞成骨偶联成血管分化促进激素性股骨头坏死的发生 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2019.
- ZHAN Y, HE Z, LIU X, et al. Aspirin-induced attenuation of adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells is accompanied by the disturbed epigenetic modification. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;98:29-42.
- ZHANG L, QI M, CHEN J, et al. Impaired autophagy triggered by HDAC9 in mesenchymal stem cells accelerates bone mass loss. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):269.
- JIN Z, WEI W, HUYNH H, et al. HDAC9 Inhibits Osteoclastogenesis via Mutual Suppression of PPAR γ /RANKL Signaling. *Mol Endocrinol.* 2015;29(5):730-738.
- CHEN YH, CHUNG CC, LIU YC, et al. Enhancer of Zeste Homolog 2 and Histone Deacetylase 9c Regulate Age-Dependent Mesenchymal Stem Cell Differentiation into Osteoblasts and Adipocytes. *Stem Cells.* 2016;34(8):2183-2193.
- LI L, LIU W, WANG H, et al. Mutual inhibition between HDAC9 and miR-17 regulates osteogenesis of human periodontal ligament stem cells in inflammatory conditions. *Cell Death Dis.* 2018;9(5):480.
- LIU Y, DU M, LIN HY. Histone deacetylase 9 deficiency exaggerates uterine M2 macrophage polarization. *J Cell Mol Med.* 2021;25(16):7690-7708.
- BECKER L, NGUYEN L, GILL J, et al. Age-dependent shift in macrophage polarisation causes inflammation-mediated degeneration of enteric nervous system. *Gut.* 2018; 67(5):827-836.
- RATUSHNYI AY, RUDIMOVA YV, BURAVKOVA LB. Alteration of Hypoxia-Associated Gene Expression in Replicatively Senescent Mesenchymal Stromal Cells under Physiological Oxygen Level. *Biochemistry (Mosc).* 2019;84(3):263-271.
- ERDMAN VV, KARIMOV DD, NASIBULLIN TR, et al. Role of PLAT, PKHD1L1, STK38L and TEAD1 genes Alu-polymorphism for longevity. *Adv Gerontol.* 2016;29(5):709-716.
- WARNIER M, FLAMAN JM, CHOUABE C, et al. The SCN9A channel and plasma membrane depolarization promote cellular senescence through Rb pathway. *Aging Cell.* 2018;17(3):e12736.

(责任编辑: MZH, ZN, ZH)