基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.002

肿瘤坏死因子-α 抑制 3T3-L1 脂肪细胞色素上皮衍生因子的表达和分泌

夏 伟,杨淑敏,罗 梅,梅 玫,宋 颖,程庆丰,李启富
(重庆医科大学附属第一医院内分泌科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨肿瘤坏死因子-α(Tumor necrosis factor-α,TNF-α)对 3T3-L1 脂肪细胞色素上皮衍生因子(Pigment epithelium-derived factor,PEDF)表达和分泌的影响。方法:体外培养和诱导分化 3T3-L1 前脂肪细胞。分别用不同浓度 TNF-α (0.1、1、10、100 ng/ml)处理 3T3-L1 脂肪细胞 24 h,并选取 10 ng/ml 的 TNF-α 干预细胞 3、6、12、24 h,采用实时荧光定量 PCR 和 ELISA 技术检测 3T3-L1 脂肪细胞 PEDF 的 mRNA 表达和蛋白分泌情况。结果:①和对照组相比,不同浓度 TNF-α 对 3T3-L1 脂肪细胞 PEDF的 mRNA 表达和分泌均有抑制作用,且浓度越大,其抑制效应越明显($P<0.05$)。②10 ng/ml 的 TNF-α 干预 3T3-L1 脂肪细胞后,随着时间的延长,PEDF 的 mRNA 表达逐渐降低,第 12 h 达到最低点($P<0.05$)。③10 ng/ml 的 TNF-α 对其 PEDF 分泌的抑制率在第 6 h 为 15%,在第 24 h 为 33%($P<0.05$)。结论:TNF-α 抑制 3T3-L1 脂肪细胞 PEDF 的表达和分泌,其抑制效应呈剂量和时间依赖性。

【关键词】肿瘤坏死因子-α;色素上皮衍生因子;脂肪细胞
【中国图书分类法分类号】R589.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-07-06

The tumor necrosis factor-α inhibits expression and secretion of pigment epithelium-derived factor in 3T3-L1 adipocytes

XIA Wei, YANG Shu-min, LUO Mei, MEI Mei, SONG Ying, CHENG Qing-feng, LI Qi-fu
(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of tumor necrosis factor-α (TNF-α) intervention on the expression and secretion of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in 3T3-L1 adipocytes. *Methods*: 3T3-L1 preadipocytes were cultured and differentiated into the mature adipocyte. 3T3-L1 adipocytes were incubated with TNF-α at different concentrations (0.1, 1, 10, 100 ng/ml) for different periods of time (3, 6, 12, 24 h). PEDF mRNA expression was detected by Real-time Quantitative PCR. Total protein of PEDF secreted by these adipocytes was evaluated by ELISA. *Results*: (1) Treatment of 3T3-L1 adipocytes with TNF-α at different concentrations decreased PEDF mRNA expression and secretion along with the elevated TNF-α concentration in the culture medium ($P<0.05$). (2) The inhibitive effect of TNF-α (10 ng/ml) on PEDF mRNA expression gradually strengthened with the increase of treatment time, and reached the maximum at 12 h ($P<0.05$). (3) Treated with TNF-α (10 ng/ml), the inhibition rate of their secretion of PEDF was 15% at 6 h, and 33% at 24 h ($P<0.05$). *Conclusion*: TNF-α significantly decreases the expression and secretion of PEDF in 3T3-L1 adipocytes in a dose-and time-dependent manner.

【Key words】tumor necrosis factor-α; pigment epithelium-derived factor; adipocytes

肥胖已成为危害全人类健康的公共卫生问题,由此引发的疾病如糖尿病、心血管疾病给社会带来沉重的负担[1]。胰岛素抵抗(Insulin resistance,IR)是肥胖的重要病理基础之一。目前肥胖时 IR 发生的机制尚不完全清楚。既往研究发现:肥胖时脂肪组织分泌许多炎症因子,包括肿瘤坏死因子-α(Tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白介素-1 等。这些炎症因子可通过多种机制调节脂肪因子(如瘦素、脂联素)的表达,使脂肪因子分泌紊乱,从而参与 IR 的发生发展[2-5]。

色素上皮衍生因子(Pigment epithelium-derived factor,PEDF)是 1989 年在人视网膜色素上皮细胞的培养液中发现和提取的一种糖蛋白[6]。近年来发现它也是一种新的脂肪因子,介导 IR 的发生,是联系肥胖和 IR 的"桥梁"[7]。既然炎症可调节多种脂肪因子的表达和分泌,PEDF 是否同样受到炎

作者介绍:夏 伟(1985-),男,硕士,研究方向:胰岛素抵抗。
通信作者:李启富,男,教授,Email:liqifu@yeah.net。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81070668,30570876);重庆市科委自然科学基金资助项目(编号:CSTC,2008BB5206)。

症的调节呢？目前报道甚少。本研究将探讨炎症因子 TNF-α 对 3T3-L1 脂肪细胞 PEDF 表达和分泌的影响，以进一步了解肥胖时 IR 发生的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

3T3-L1 前脂肪细胞株购于上海中科院细胞库，小鼠重组 TNF-α 购于美国 Peprotech 公司，DMEM 培养基和胎牛血清购于美国 Gibco 公司，胰岛素、地塞米松、3-异丁基 1-甲基黄嘌呤购自美国 Sigma 公司。逆转录试剂盒和 SYBR Green Real Time 试剂盒购自大连宝生物工程公司，引物由上海生工生物技术有限公司合成。小鼠 PEDF ELISA 试剂盒购于上海迪奥生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、诱导分化及鉴定 将 3T3-L1 前脂肪细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板，用含 10%胎牛血清的高糖DMEM 培养液在 37°C、5% CO_2 条件下培养，待细胞生长至完全融合 48 h，将培养液换为含 0.5 mmol/L 3-异丁基 1-甲基黄嘌呤、10 μg/ml 胰岛素、0.5 μmol/L 地塞米松和 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液。48 h 后，换为含 10 μg/ml 胰岛素和 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液。继续培养 48 h 后将培养液换为含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液继续培养，每 2 d 换液 1 次，直到第 8~12 d 90%以上的 3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞。光镜下可见分化的脂肪细胞内含较多光亮脂滴，围绕胞核形成典型的“戒环”样结构。油红 O 染色后，脂滴呈亮红色。

1.2.2 四甲基偶氮唑法测定细胞活性 将 3T3-L1 前脂肪细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板，按上述方法诱导分化成熟 8 d 后，将培养液换为含不同浓度 TNF-α（0.1、1、10、100 ng/ml）（实验组）和不含 TNF-α（对照组）的无血清培养液，每组设 5 个复孔。24 h 后，每孔加 20 μl 四甲基偶氮唑盐液，37°C 培养 4 h，弃去孔中液体，加入 150 μl 二甲亚砜，震荡 15 min 后在酶标仪上测定光密度（Optical density，OD）值，测定波长为 570 nm。

1.2.3 TNF-α 干预和标本采集 将成熟脂肪细胞用含 0.2% BSA 的无血清培养液培养，12 h 后换为含不同浓度 TNF-α（0.1、1、10、100 ng/ml）（实验组）和不含 TNF-α（对照组）的无血清培养液，培养 24 h 后，收集细胞上清及细胞。对照组和 10 ng/ml 组在换液后 3、6、12、24 h 收集细胞上清及细胞，保存于-80°C。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 用 Trizol 提取细胞中总 RNA，并逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增。小鼠 PEDF 的引物序列：上游 5'-CCCAATGATGTCA-GAGCCTTA-3'，下游 5'-GTGGACTCAAACTAGGACTTG-3'，长度 137 bp。β-actin 的引物序列：上游 5'-TGCAATCCTGT-GTCATCGATGAAAC-3'，下游 5'-TAGAACGTAGCTCAGT-CACAGTGCG-3'，长度 149 bp。反应条件：95 °C 30 s（1 个循环），95°C 3 s、60°C 34 s（40 个循环）。溶解曲线反应条件：95°C 60 s、55°C 30 s、95°C 30 s（1 个循环）。总反应体积为 10 μl。

1.2.5 PEDF 蛋白检测 采用 ELISA 法测定细胞上清 PEDF 浓度，每个处理组设 3 个复孔。实验步骤严格按照说明书进行。

1.3 统计学处理

统计学方法采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。实验重复 3 次，计量资料以均数±标准差表示。多组间均数比较经方差齐性检验均齐性后，采用单因素方差分析，比较有差异再采用 *SNK-q* 检验行两组间比较。以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结 果

2.1 不同浓度的 TNF-α 对 3T3-L1 脂肪细胞活性的影响

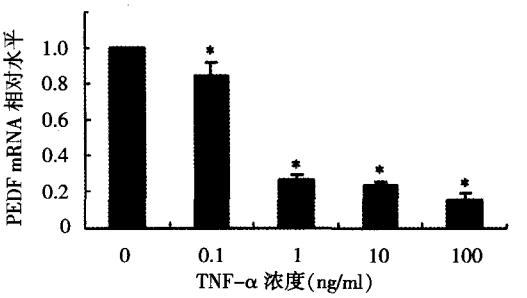
与对照组（0 ng/ml）比较，实验组不同浓度的 TNF-α 干预后的 OD 值均无明显统计学差异（$P>0.05$，见表 1）。说明这些干预浓度对 3T3-L1 脂肪细胞无毒性作用，不影响其生长活性。

表 1 不同浓度的 TNF-α 对 3T3-L1 脂肪细胞活性的影响

TNF-α 浓度（ng/ml）	OD_{570}
0	1.163 ± 0.102
0.1	1.188 ± 0.114
1	1.150 ± 0.068
10	1.154 ± 0.116
100	1.142 ± 0.091

2.2 实时荧光定量 PCR 检测结果

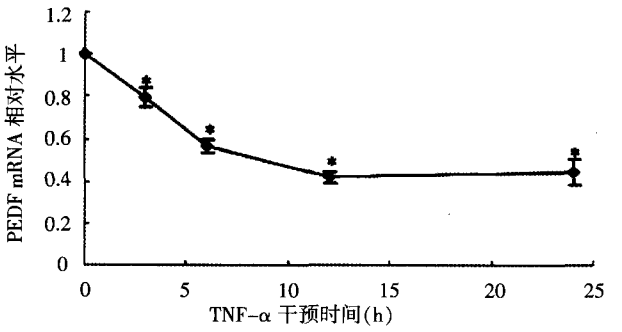
2.2.1 TNF-α 浓度对 PEDF mRNA 表达的影响 不同浓度（0.1、1、10、100 ng/ml）的 TNF-α 均抑制 3T3-L1 脂肪细胞 PEDF mRNA 的表达。随着浓度的增加，PEDF mRNA 表达水平降低更加明显。当 TNF-α 浓度为 10 ng/ml 时，抑制率约为 80%（$P<0.05$），见图 1。



*，$P<0.05$ 与对照 0 ng/ml 比较

图 1 不同浓度 TNF-α 对 PEDF mRNA 表达的影响

2.2.2 干预时间对 PEDF mRNA 表达的影响 浓度为 10 ng/ml 的 TNF-α 干预 3 h 后，3T3-L1 脂肪细胞 PEDF mRNA 表达水平开始明显降低（$P<0.05$）；12 h 时达到最低，24 h 时稍有上升，见图 2。



*，$P<0.05$ 与对照 0 h 比较

图2 TNF-α（10 ng/ml）干预不同时间对PEDF mRNA表达的影响

2.3 ELISA 检测结果

2.3.1 TNF-α 浓度对 PEDF 分泌量的影响 与对照组(0 ng/ml)相比，不同浓度(0.1、1、10、100 ng/ml)的 TNF-α 干预均抑制 3T3-L1 脂肪细胞 PEDF 的分泌。随着 TNF-α 浓度的增加，PEDF 分泌量呈逐渐降低趋势，浓度为 100 ng/ml 时达最低水平($P<0.05$)，见表 2。

表 2 不同浓度对 3T3-L1 脂肪细胞 PEDF 分泌的影响

TNF-α 浓度（ng/ml）	PEDF浓度（ng/ml）
0	7.14 ± 0.75
0.1	6.73 ± 0.71
1	5.55 ± 0.41*
10	4.72 ± 0.59*
100	4.15 ± 0.30*

注：*，$P<0.05$ 与对照（0 ng/ml）PEDF 分泌量进行比较

2.3.2 干预时间对 PEDF 分泌量的影响 与对照组(0 ng/ml)相比，10 ng/ml的TNF-α干预6 h时3T3-L1脂肪细胞PEDF的分泌量明显降低[（4.16 ± 0.45）ng/ml vs（4.87 ± 0.55）ng/ml，$P<0.05$]，抑制率为 15%；24 h 时降低更明显 [（5.53 ± 0.40）ng/ml vs（8.24 ± 0.57）ng/ml，$P<0.05$]，抑制率为 33%。

3 讨 论

肥胖时脂肪组织内的脂肪细胞和巨噬细胞分泌许多炎症因子，包括 TNF-α、白介素-1、白介素-6 等，这些炎症因子可通过多种机制调节脂肪因子（如瘦素、脂联素）的表达，使脂肪因子分泌紊乱，从而介导 IR 的发生发展[2-5]。我们的前期临床研究发现，多囊卵巢综合征患者血清 PEDF 水平与胰岛素抵抗[8]和炎症因子超敏 C 反应蛋白关系密切，因此拟进一步研究炎症对脂肪细胞 PEDF 表达和分泌的影响。

3T3-L1 前脂肪细胞是从 Swiss 小鼠胚胎中分离克隆获得的具有分化潜力的细胞株，它在体外受到诱导刺激后可以分化为成熟的脂肪细胞，能较好地模拟脂肪细胞的分化及活体脂肪组织的生物学特性，因而是体外研究脂肪细胞功能常用的一种工具[9]。本实验我们以 3T3-L1 脂肪细胞为研究对象，查阅相关文献[2-4]后确定 4 个 TNF-α 浓度(0.1、1、10、100 ng/ml)，并通过四甲基偶氮唑法证实这些浓度对 3T3-L1 脂肪细胞生长活性均无明显影响。研究发现不同浓度的 TNF-α 对 3T3-L1 脂肪细胞 PEDF 的表达和分泌均起到抑制作用，且随着浓度的增加，其抑制作用逐渐增强。进一步选取接近肥胖炎症状态的的 TNF-α 浓度(10 ng/ml)[3]干预 3、6、12、24 h，结果发现随着干预时间的延长，TNF-α 对 3T3-L1 脂肪细胞 PEDF mRNA 表达的抑制作用逐渐增强，在第 12 h 时为最强；而干预 24 h 对 PEDF 分泌的抑制率也明显高于 6 h。以上结果提示 TNF-α 对 3T3-L1 脂肪细胞 PEDF 的表达和分泌起抑制作用，且呈剂量和时间依赖性。

本结果与 Famulla 等[10]近期发表的研究结果一致，该研究用 TNF-α 干预原代培养的人脂肪细胞 24 h 后，发现PEDF 蛋白表达下调。此外，Yamagishi 等[11]也发现 TNF-α 可下调脐静脉内皮细胞 PEDF mRNA 的表达水平。

目前 TNF-α 抑制 3T3-L1 脂肪细胞 PEDF 表达和分泌的机制尚不清楚，但是其他研究可以提供一些启示。Crowe 等[7]报道大鼠体内注射重组 PEDF 后可激活肝脏和骨骼肌促炎的 C-Jun 氨基端激酶和细胞外信号调节激酶，阻碍胰岛素信号传导，因而 PEDF 被认为是联系肥胖和 IR 的桥梁。Famulla 等[10]在体外研究中也发现 PEDF 可诱导人脂肪细胞、骨骼肌细胞和平滑肌细胞促炎信号如核因子-κB 的激活，并导致 IR。此外，PEDF 干预大鼠小胶质细胞和星形胶质细胞，发现它可诱导促炎基因如 TNF-α、白介素-1 的表达[12,13]。以上研究均表明 PEDF 具有促炎作用。因此我们推测本研究中 TNF-α 对 3T3-L1 脂肪细胞 PEDF 表达和分泌的抑制，可能是一种负反馈作用。具体机制尚需进一步研究。

由于本研究为体外实验，3T3-L1 脂肪细胞仅受 TNF-α 单因素的影响，而在体内脂肪细胞同时受到胰岛素、游离脂肪酸等多重因素的影响，因此可能出现体内外研究结果的差异。

总之，我们的研究结果表明 TNF-α 抑制 3T3-L1 脂肪细胞 PEDF 的表达和分泌，其抑制效应呈剂量和时间依赖性。进一步的体内干预研究将有助于阐明炎症因子对 PEDF 的调节机制及两者在肥胖患者 IR 发生中的意义。

参 考 文 献

[1] Alegría Ezquerra E, Castellano Vázquez J M, Alegría Barrero A. Obesity, metabolic syndrome and diabetes: cardiovascular implications and therapy[J]. Rev Esp Cardiol, 2008, 61(7): 752-764.

[2] Kirchgessner T G, Uysal K T, Wiesbrock S M, et al. Tumor necrosis factor-alpha contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes[J]. J Clin Invest, 1997, 100(11): 2777-2782.

[3] Kim K Y, Kim J K, Jeon J H, et al. C-Jun N-terminal kinase is involved in the suppression of adiponectin expression by TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 327(2): 460-467.

基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.003

丹参对小肠缺血再灌注后肾脏 p38MAPK 信号通路的影响

田 野[1],董 哲[2]

(1. 辽宁医学院研究生院,锦州 121001;2. 辽宁医学院附属第一医院普外科,锦州 121001)

【摘 要】目的:观察丹参(Salvia miltiorrhiza)对大鼠小肠缺血再灌注损伤(Ischemia reperfusion injury,IRI)中肾脏 p38 丝裂素活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinases,p38MAPK)信号转导通路的影响。方法:雄性 SD 大鼠 36 只,随机分为空白组、缺血再灌注组、丹参处理组。采用钳闭大鼠肠系膜上动脉缺血再灌注模型。酶联免疫吸附实验(Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)测定肾组织中肿瘤坏死因子-α(Tumor necrosis factor-α,TNF-α)和白介素-1β(Interleukin-1β,IL-1β)的含量,蛋白印记(Western blot)法检测肾组织中磷酸化 p38 丝裂素活化蛋白激酶(Phospho-p38 mitogen-activated protein kinase,P-p38MAPKs)的表达;紫外分光光度法检测血浆二胺氧化酶(Diamine oxidase,DAO)的活性;HE 染色形态学方法评价肠及肾组织损伤;血清生化分析仪检测尿素氮(Blood urea nitrogen,BUN)和肌酐(Crea,Cr)。结果:缺血再灌注组与空白组比较,小肠及肾组织结构损伤严重,肾脏中 p38MAPK、TNF-α 和 IL-1β 表达明显增高,血浆 DAO、BUN、Cr 含量升高($P<0.01$);丹参处理组与缺血再灌注组比较,肾组织中 p38MAPK 表达显著降低,肾组织中 TNF-α 和 IL-1β 含量减少,血浆 DAO 含量下降,小肠和肾组织结构损伤显著减轻。BUN、Cr 明显降低($P<0.05$)。结论:丹参可减轻小肠缺血再灌注肾损伤;其机制与其抑制肾组织中p38MAPK 信号转导通路的活化进而减少 TNF-α、IL-1β 的释放有关。

【关键词】p38MAPK 信号通路;丹参;小肠缺血再灌注损伤;肿瘤坏死因子-α;白介素-1β

【中国图书分类法分类号】R605 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-08-20

Effects of salvia miltiorrhiza on the kidney p38MAPK signal channel induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats

TIAN Ye[1], DONG Zhe[2]

(1. College of Graduate, Liaoning Medicine University; 2. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Liaoning Medical University)

【Abstract】*Objective*: To observe the effects of salvia miltiorrhiza Bunge on the kidney p38MAPK signal channel induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Methods*: Thirty-six male Wistar rats were randomly divided into 3 equal groups: control group, ischemia reperfusion injury group and salvia miltiorrhiza group.

作者介绍:田 野(1983-),男,硕士,
研究方向:肠缺血再灌注对远端脏器的损伤机制。
通信作者:董 哲,男,副主任医师,Email:dongzhejinyi@sina.com。

[4] Fasshauer M,Klein J,Neumann S,et al.Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes[J].Biochem Biophys Res Commun,2001,288(4):1027-1031.

[5] Kralisch S,Weise S,Sommer G,et al.Interleukin-1beta induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro[J].Regul Pept,2009,154(1-3):102-106.

[6] Crowe S,Wu L E,Economou C,et al.Pigment epithelium-derived factor contributes to insulin resistance in obesity[J].Cell Metab,2009,10(1):40-47.

[7] Tombran-Tink J,Johnson L V.Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells[J].Invest Ophthalmol Vis Sci,1989,30(8):1700-1707.

[8] Yang S,Li Q,Zhong L,et al.Serum pigment epithelium-derived factor is elevated in women with polycystic ovary syndrome and correlates with insulin resistance[J].J Clin Endocrinol Metab,2011,96(3):831-836.

[9] Joost H G,Schurmann A.Subcellular fractionation of adipocytes and 3T3-L1 cells[J].Methods in Molecular Biology,2001,155(1):77-82.

[10] Famulla S,Lamers D,Hartwig S,et al.Pigment epithelium-derived factor is one of the most abundant proteins secreted by human adipocytes and induces insulin resistance and inflammatory signaling in muscle and fat cells[J].Int J Obes(Lond),2010,35(6):762-772.

[11] Yamagishi S,Inagaki Y,Nakamura K,et al.Pigment epithelium-derived factor inhibits TNF-alpha-induced interleukin-6 expression in endothelial cells by suppressing NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species generation[J].J Mol Cell Cardiol,2004,37(2):497-506.

[12] Sanagi T,Yabe T,Yamada H.The regulation of pro-inflammatory gene expression induced by pigment epithelium-derived factor in rat cultured microglial cells[J].Neurosci Lett,2005,380(1-2):105-110.

[13] Yabe T,Sanagi T,Schwartz J P,et al.Pigment epithelium-derived factor induces pro-inflammatory genes in neonatal astrocytes through activation of NF-kappa B and CREB[J].Glia,2005,50(3):223-234.

(责任编辑:关蕴良)