维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)05-0575-03

TNF-α 抑制成熟 3T3-L1 脂肪细胞分泌 RBP4

未友能,青 华,段 炼,梅 玫,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:观察肿瘤坏死因子-α(TNF-α)对体外培养的成熟 3T3-L1 脂肪细胞分泌视黄醛结合蛋白 4(Retinol Binding Protein 4,RBP4)的影响。方法:体外培养 3T3-L1 细胞,待细胞完全融合后两天进行诱导分化为成熟脂肪细胞,应用不同浓度的重组 TNF-α 干预,采用放射免疫分析法检测干预后不同时间成熟脂肪细胞 RBP4 的分泌量。结果:(1)不同浓度 TNF-α(0.2、1.0、5.0、10ng/ml)对脂肪细胞 RBP4 的分泌均有抑制作用,其抑制效应呈剂量依赖性:随着 TNF-α 浓度的增加,RBP4 水平降低越加明显。(2)各实验组随着干预时间延长,RBP4 虽有降低之趋势,但组内各时间点差异无统计学差异。(3)二元回归分析提示 TNF-α 对 RBP4 有影响。结论:TNF-α 能抑制成熟脂肪细胞 RBP4 的分泌,其抑制效应有剂量依赖性,而与干预时间无关。

【关键词】视黄醛结合蛋白 4;肿瘤坏死因子-α;脂肪细胞

【中国图书分类法分类号】R589.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-21

The tumor necrosis factor-α inhibits retinol binding protein 4 secretion in mature 3T3-L1 adipocytes

WEI You-neng, et al

(*Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effects of tumor necrosis factor-α (TNF-α) on retinol binding protein 4 (RBP4) secreted by mature 3T3-L1 adipocytes in-vitro. *Methods*: 3T3-L1 preadipocytes were cultured and differentiated into the mature adipocytes after 2 days of confluenence. Recombinant TNF-α at different concentrations was added to the culture medium of fully differentiated adipocytes. Total protein of RBP4 secreted by these adipocytes was evaluated by radioimmunoassay(RIA) at various times. *Results*: (1)Treatment of mature 3T3-L1 adipocytes with TNF-α at different concentrations (0.2, 1.0, 5.0, 10ng/ml) decreased RBP4 secretion. The inhibitive effect of TNF-α on RBP4 was in dose dependent manner. The level of RBP4 decreased along with the elevated TNF-α concentration in the culture medium. (2)Almost the RBP4 secretion in all experiment groups had a decreasing tread at different time points, but there was no statistical difference in each group. (3) Regression analysis indicated TNF-α had significant associations with RBP4. *Conclusion*: TNF-α inhibits mature adipocytes RBP4 secretion in-vitro in dose-response effects, but there is no time-response effects.

【Key words】 Retinol binding protein 4(RBP4); Tumor necrosis factor-α (TNF-α); Adipocyte.

RBP4 以往一直被认为只是结合、转运视黄醇(维生素 A)的载体蛋白[1]。2005 年,Young 等[2]发现它还是一种参与胰岛素抵抗 (Insulin Resistance, IR)的重要脂肪因子,与肥胖、糖尿病及多种心血管危险因子密切相关。在不同的胰岛素抵抗模型小鼠、2 型糖尿病以及胰岛素抵抗患者中,血清 RBP4 浓度均呈不同程度的升高[2,3]。现已证实肥胖可导致 RBP4 分泌增多,后者能引起和加重机体 IR[2,4]。而 TNF-α 在肥胖和糖尿病及胰岛素抵抗患者体内水平增高已是不争的事实。目前已有研究表明,TNF-α 能调节数种脂肪因子的表达,如使脂联素、瘦素分泌减少,白细胞介素-6、单核细胞趋化蛋白-1 分泌增加[5]。作为新发现的脂肪因子-RBP4 是否同样受到 TNF-α 的调节报道甚少,因此本课题将探讨 TNF-α 对脂肪细胞分泌 RBP4 的影响。

作者介绍:未友能(1981-),女,硕士,
研究方向:2 型糖尿病与胰岛素抵抗。

通讯作者:李启富,男,教授,E-mail:liqifu@yeah.net。

基金项目:重庆市卫生局资助项目(07-1-014)。

1 材料和方法

1.1 材料

3T3-L1 前体脂肪细胞株(小鼠)购于上海中科院细胞

维普资讯 http://www.cqvip.com

所,重组 TNF-α 购于美国 Peprotech 公司,DMEM 培养基购于美国 Gibco 公司,胎牛血清购于杭州四季青生物材料有限公司,胰岛素、地塞米松、3-异丁基 1-甲基黄嘌呤(IBMX)购自美国 Sigma 公司,RBP4 放免试剂盒购于北京康肽生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 3T3-L1 前体脂肪细胞的培养,诱导分化和鉴定 根据 3T3-L1 细胞培养方案,3T3-L1 前体脂肪细胞用完全培养液(DMEM+10%胎牛血清+青霉素 100U/ml+链霉素 100U/ml)在 37℃孵箱(5%CO_2、95%空气)中培养,每 2d 换 1 次液,直至传代。待细胞生长至数量足够时,计数后将其以 10^5 个种于 24 孔板,种板后第 1d 换液 1 次,以后每 2d 换液 1 次,直到细胞生长至完全融合后 2d 时开始诱导分化,将培养液换为含 0.5mmol/L IBMX、10μg/ml 胰岛素、1μmol/ml 地塞米松的完全培养液培养。48h 后,撤去地塞米松和 IBMX,将培养液换为只含 10μg/ml 胰岛素的完全培养液培养。再培养 48h 后将培养液换为完全培养液继续培养,每 2d 换液 1 次,直到第 8~12d 90%以上的 3T3-L1 细胞分化为成熟脂肪细胞。光镜下见细胞由原来的长梭形变为圆形或者是椭圆形,内含脂滴。油红 O 染色后,3T3-L1 成熟脂肪细胞内脂滴成亮红色。

1.2.2 TNF-α 干预和标本采集 当细胞分化为成熟脂肪细胞后,将培养液换为含不同浓度 TNF-α(0.2ng/ml、1.0ng/ml、5.0ng/ml、10ng/ml)(实验组)和不含 TNF-α(对照组)的完全培养液,继续培养,分别在换液后的 1、4、8、12、24h 收集培养液,离心后取上清保存于 -80℃。

1.2.3 标本的测定 将标本从 -80℃取出,室温下溶解,混匀后采用放射免疫方法测定 RBP4 浓度。

1.3 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间均数及组内均数的比较均采用方差分析,对各指标做二元相关分析和多元回归分析。所有数据分析在 SPSS12.0 软件中完成,$P<0.05$ 判定为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TNF-α 浓度对 RBP4 分泌量的影响

不同浓度的 TNF-α 干预均能抑制成熟脂肪细胞分泌 RBP4,其总体抑制效应呈剂量依赖性:随着 TNF-α 浓度的增加,RBP4 水平降低越加明显。除 1h 和 8h 外,各时间点的 RBP4 浓度均随 TNF-α 干预浓度的增加而降低(见表 1)。

2.2 时间对 RBP4 分泌量的影响

TNF-α 高浓度组(1.0ng/ml、5.0ng/ml、10ng/ml)的 RBP4 随着时间延长有分泌减少的趋势,如:TNF-α 1.0ng/ml 组从 8h 开始 RBP4 有分泌逐渐下降的趋势;TNF-α 5.0ng/ml 组和 TNF-α 10ng/ml 组从 12h 开始,RBP4 也有分泌减少的迹象;但经检测并无统计学意义,亦无时间效应关系。除 TNF-α 10ng/ml 组 24h 与 1hRBP4 分泌量的差别有统计学意义外,各实验组内各时间点比较均无统计学意义(见表 1)。

2.3 RBP4 与 TNF-α、时间的相关分析

二元相关分析提示 RBP4 与 TNF-α 显著相关($r=-0.339\ 7$,$P=0.000\ 5$),而与时间无显著相关性。以 RBP4 为应变量,TNF-α 和时间为自变量,进行多元回归分析,发现 TNF-α 是 RBP4 的独立影响因素,回归方程为 $y=14.01-0.23x$(y:RBP4 浓度,μg/ml;x:TNF-α 浓度,ng/ml)。

3 讨 论

RBP4 是机体内的一种转运蛋白,相对分子质量为 21ku,在生理条件下,肝脏是机体内 RBP4 的首要来源,脂肪组织是第二主要来源(约为肝脏的 20%~40%),机体约 20%的视黄醇存储在脂肪组织[2,6]。但在多种 IR 动物模型中,肝脏 RBP4 表达无变化,而是脂肪组织分泌 RBP4 的增加导致了机体产生胰

表 1 不同浓度 TNF-α 培养基中成熟脂肪细胞 RBP4 的分泌量(μg/ml)

时间	TNF-α				
	0ng/ml	0.2ng/ml	1.0ng/ml	5.0ng/ml	10ng/ml
1h	13.18±1.43	11.90±0.40	12.30±1.26	12.54±2.04	14.03±2.57
4h	14.85±1.50	14.34±4.25	13.52±0.67	12.34±0.31	12.18±0.65
8h	16.49±3.78	12.23±1.73	11.99±0.96	12.66±0.45	12.48±3.05
12h	16.45±3.92	13.59±1.51	11.85±2.81	11.29±0.94	10.93±1.06
24h	16.70±2.42	13.16±2.79	11.78±1.89	9.88±2.07	9.60±0.72
平均	15.53±2.87	13.04±2.40*	12.29±1.65*	11.74±1.64*	11.84±2.28*

与对照组(TNF-α 0ng/ml)RBP4 分泌的均值比较,*$P<0.05$。

维普资讯 http://www.cqvip.com

岛素抵抗[2]。尽管多项研究都显示在肥胖、糖尿病和胰岛素抵抗患者体内,脂肪组织表达 RBP4 增加,导致其循环水平也相应升高[2-4],但 RBP4 增加的原因目前尚不清楚。

TNF-α 是由多种细胞分泌的一种细胞因子,相对分子质量为 17ku。血清中的 TNF-α 80%来源于巨噬细胞,而仅 20%以下由脂肪细胞产生。在肥胖状态下,脂肪细胞和巨噬细胞之间的反馈调节是引起机体内高水平 TNF-α 的重要机制[7-9]。因此多数肥胖、糖尿病和胰岛素抵抗患者,其体内 TNF-α 是升高的。TNF-α 又可通过多种机制调节其他脂肪因子的表达,使脂源性因子分泌紊乱,介导胰岛素抵抗的发生发展,加快糖尿病的进程[6]。目前,关于 RBP4 的分泌及表达是否受到其他细胞因子调节的报道甚少。因此本实验选用影响多种脂肪因子表达的 TNF-α,探讨它对体外成熟脂肪细胞 RBP4 分泌的影响。

实验发现:虽各实验组随着干预时间延长,在一定时间后,RBP4 的分泌有降低之趋势,但组内各时间点经检测并无统计学意义,亦无时间效应关系。而总体上,实验中不同浓度的 TNF-α 均能抑制脂肪细胞分泌 RBP4,且呈剂量依赖性。这样的结果完全出乎我们的意料,因为 TNF-α 处理脂肪细胞能引起胰岛素抵抗[10],并使多种炎症相关脂肪因子如:抵抗素、白细胞介素 -6、单核细胞趋化蛋白等表达增加[6],而实验却发现 TNF-α 能使与胰岛素抵抗、糖尿病正相关的脂肪因子 -RBP4 分泌降低。此结果与另一项发表于我们实验后期的研究一致,该研究对体外培养的人乳房脂肪细胞进行 TNF-α 干预后引起了 RBP4 表达的下调[11]。而在肥胖、糖尿病、胰岛素抵抗患者体内,脂肪组织分泌 RBP4 是增加的,血清 RBP4 水平也升高,这提示 RBP4 分泌增加可能并非 TNF-α 所致,而是其他炎症因子或是信号分子共同作用的结果。这种体内整体水平和体外单因素影响的不同导致结果迥异,既说明了生命的复杂性,又为我们提供了研究思路,也正是我们不断探究的方向。

目前,TNF-α 引起脂肪细胞 RBP4 分泌减少的研究甚少,其具体机制还不清楚。最近的一研究证实,RBP4 浓度在分离的人脂肪前体细胞里面是很低的,在细胞分化为成熟脂肪细胞中表达增加[12]。而另一细胞因子 - 心房利钠肽(ANP)能促进人体脂肪细胞的脂解[13],实验发现它也能减少体外培养的脂肪细胞 RBP4 的分泌[14]。因此我们推测可能是随着脂肪细胞的分化成熟,RBP4 逐渐分泌增多,加入 TNF-α 干预后,由于 TNF-α 抑制脂肪细胞分化,促进脂肪细胞凋亡,抑制脂质合成,促进脂解等作用特点与 ANP 一致,最终使得脂肪细胞内脂滴减小,所以两者均导致了脂肪细胞分泌 RBP4 减少。另一可能是 TNF-α 影响了细胞代谢的其他途径,干扰了 RBP4 的产生,最终致使其分泌减少。本研究结果显示 TNF-α 能使体外培养成熟的 3T3-L1 脂肪细胞分泌 RBP4 减少,但这一现象的其内在机制还有待于进一步的探讨。

参 考 文 献

[1] Blaner WS. Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A[J]. Endocrine Rev,1989;10(3):308-316.

[2] Yang Q,Timothy E,Mody N,et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes[J]. Nature,2005;436(7049):356-362.

[3] Graham TE,Yang Q,Bluher M,et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean,obese,and diabetic subjects[J]. N Engl J Mad,2006;354(24):2552-2563.

[4] Tamori Y,Sakaue H,Kasuga M. RBP4,an unexpected adipokine [J]. Nat Med,2006;12(1):30-31.

[5] Wang B,Trayhurn P. Acute and prolonged effects of TNF-α on the expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture[J]. Endocrinology,2006;452(4):418-427.

[6] Tsutsumi C. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes[J]. J Biol Chem,1992;267(3):1805-1810.

[7] Suganami T,Nishida J,Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes:role of free fatty acids and tumor necrosis factor α[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2005;25(10):2062-2068.

[8] Weisberg SP,McCann D,Desai M,et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue[J]. J Clin Invest,2003;112(12):1796-1808.

[9] Bruun JM,Lihn AS,Pedersen SB,et al. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue(AT):implication of macrophages resident in the AT[J]. J Clin Endocrinol Metab,2005;90(4):2282-2289.

[10] Liu LS,Spelleken M,Rohrig K,et al. Tumor necrosis factor-alpha acutely inhibits insulin signaling in human adipocytes: implication of the p80 tumor necrosis factor receptor[J]. Diabetes,1998;47(4):515-522.

[11] Sell H,Eckel J. Regulation of retinol binding protein 4 production in primary human adipocytes by adiponectin, troglitazone

(下转第 591 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

一系列细胞因子如：血管内皮生长因子、色素细胞衍生因子等大量分泌，促使新生血管大量生成，导致 ROP[1]。对 0～7d 的小鼠玻璃体动脉消退和视网膜血管形成的研究表明，7d 的小鼠视网膜血管发育最接近早产儿视网膜血管的特点[2]将这种小鼠置于高氧环境中会出现视网膜血管增生等类似与 ROP 的表现，我们选择 7d 龄 wistar 新生鼠研究 ROP，是因为这种鼠具备的特性适合制备氧诱导的血管增生性视网膜病模型[3]。建立早产儿视网膜病变动物模型的关键是箱内的氧浓度是否稳定。预实验中我们发现氧浓度过低对新生血管的形成不利，而氧浓度过高 >80%则会使小鼠及哺乳母鼠的死亡率明显上升。同时箱内温度、湿度的控制也是影响小鼠存活的重要因素。本实验采用由市售整理箱改制成高氧箱，箱底铺钠石灰颗粒可保持干燥，使用透明胶密闭便于观察和换母鼠和饲料等物，且密闭性高。通过控制室内的温度和湿度间接控制箱内温度.

3.2 视网膜新生血管指标的量化

由于正常的视网膜血管不会突破内界膜，故突破内界膜进入玻璃体腔的血管应视为新生血管[4]，计数突破内界膜的内皮细胞核来反映视网膜血管的增殖具有科学性[2]。HE 染色可很好的显示视网膜结构和突破内界膜的血管内皮细胞核，使计数工作简便易行。为和玻璃体动脉内皮细胞核区别，我们仅计数与内界膜有联系的血管内皮细胞细胞核。视网膜铺片能直接反映视网膜血管的形态和分布，更加直观。视网膜 VEGF 免疫组化的检测能半定量反映在高浓度氧环境中引起视网膜相对缺氧从而引起一系列细胞因子如：血管内皮生长因子大量分泌，促使新生血管大量生成。最后导致 ROP。

此模型的建立简便经济，易于实施，结果稳定，可重复性强。是研究早产儿视网膜病新生血管发生机制及相关治疗的合适模型。

参 考 文 献

[1] Smith LE. Pathogenesis of retinopathy of prematurity[J]. Semin Neonatol,2003;8(6):469-473.

[2] Smith LEH,Wesolowski E,McLellan A,et al.Oxygen-induced retinopathy in the mouse[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,1994;35(1):101-106.

[3] Ventresca MR,Gonder JR,Tanswell AK. Oxygen-induced proliferative retinopathy in the newborn rat[J]. Can J Oph thalmol,1990;25(2):186-189.

[4] 张惠蓉，主编.视网膜临床和基础研究[M]. 太原：山西科学技术出版社，1995.323-325.

（责任编辑：谭乐勤）

（上接第 577 页）

and TNF-α[J]. Diabetologia,2007;50(10):2221-2223.

[12] Vitkova M,Klimcakova E,Kovacikova M,et al. Plasma levels and adipose tissue messenger ribonucleic acid expression of retinol-binding protein 4 are reduced during calorie restriction in obese subjects but are not related to diet-induced changes in insulin sensitivity[J]. J Clin Endocrinol Metab,2007;92(6):2330-2335.

[13] Lafontan M,Moro C,Sengenes C,et al. An unsuspected metabolic role for atrial natriuretic peptides:the control of lipolysis, lipid mobilization, and systemic nonesterified fatty acids levels in humans[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2005;25(10):2032-2042.

[14] Moro C,Klimcakova E,Lolmede K,et al. Atrial natriuretic peptide inhibits the production of adipokines and cytokines linked to inflammation and insulin resistance in human subcutaneous adipose tissue[J]. Diabetologia,2007;50(5):1038-1047.

（责任编辑：关蕴良）

（上接第 580 页）

[6] 龚振明，傅继梁.p16INK4a 基因及调控[J].生物化学与生物物理进展，2002;29:193-196.

[7] Palmisano WA,Divine KK,Saccomanno G,et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum[J]. Cancer Res,2000;60(21):5954-5958.

[8] Belinsky SA,Nikula KJ,Palmisano WA,et al. Aberrant met hylation of p16(IN K4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998;95(20):11891-11896.

（责任编辑：谭乐勤）