基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001040

TNF-α 对 SD 大鼠骨髓间充质干细胞成脂分化的影响及其相关分子机制的探讨

李 琳[1],谢友红[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属大学城医院消化中心,重庆 401331)

【摘 要】**目的**:探讨炎症因子转化生长因子(transforming growth factor-α,TNF-α)对 SD 大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)成脂分化的影响及相关的分子机制。**方法**:将生长良好的第 3 代(P3)SD 大鼠 BMSCs 分为对照组(Con 组)、成脂诱导组(Ad 组)和 10 ng/mL TNF-α 干预成脂诱导组(Ad+TNF-α 组),每组各接种 5 块 6 孔板,培养 14 d 后,收集各组细胞的 RNA 和蛋白质。于第 14 天时间点处进行油红 O 染色和异丙醇萃取,酶标仪 490 nm 处检测吸光度(absorbance,A)值,观察各组成脂分化的程度。qRT-PCR 检测各组基因 Wnt10b、前体脂肪细胞因子-1(preadipocyte factor-1,Pref-1)、CCAAT 区增强子结合蛋白-α(CCAAT/enhancer-binding protein-α,C/EBP-α)、过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(peroxisome proliferator-activated receptor-γ,PPAR-γ)、脂肪酸结合蛋白-4(fatty acid binding protein-4,FABP-4)的 mRNA 表达水平。Western blot 检测第 14 天 3 组基因 β 联蛋白(β-catenin)、PPAR-γ、C/EBP-α、FABP-4 的蛋白表达水平。**结果**:TNF-α 可以明显抑制 SD 大鼠 BMSCs 的成脂分化。在 Ad+TNF-α 组,油红 O 染色明显低于 Ad 组,异丙醇萃取后 A 值检测也明显低于 Ad 组(0.360 ± 0.035 vs. 0.770 ± 0.025,P=0.000)。qRT-PCR 结果显示,在 Ad+TNF-α 组,Wnt10b、Pref-1 的 mRNA 水平(17.050 ± 2.706,4.135 ± 0.280)明显高于 Con 组(P=0.019,P=0.003)和 Ad 组(0.575 ± 0.065,0.514 ± 0.060)(P=0.020,P=0.006),而 C/EBP-α、PPAR-γ、FABP-4 的 mRNA 水平(0.200 ± 0.012,0.768 ± 0.030,0.883 ± 0.048)明显低于 Ad 组(2.965 ± 0.455,2.330 ± 0.211,3.847 ± 0.171)(P=0.019,P=0.000,P=0.001)。Western blot 结果显示,诱导 14 d 后,Ad+TNF-α 组的 C/EBP-α、PPAR-γ、FABP-4 蛋白表达水平(0.586 ± 0.013,0.356 ± 0.008,0.118 ± 0.002)明显低于 Ad 组(1.082 ± 0.018,0.840 ± 0.112,1.094 ± 0.038)(均 P=0.000)。在 Ad+TNF-α 组,磷酸化 β-catenin(P-β-catenin)的蛋白水平(0.648 ± 0.005)明显低于 Ad 组(3.376 ± 0.211)(P=0.000)。**结论**:TNF-α 抑制 SD 大鼠 BMSCs 成脂过程分化相的作用可能与 Wnt/β-catenin 信号通路活性的增加和 Pref-1 的高表达有关,由此 BMSCs 的成脂分化停留在了前体脂肪细胞阶段。

【关键词】骨髓间充质干细胞;成脂分化;Wnt/β-catenin 信号通路;前体脂肪细胞因子-1

【中图分类号】R364.5 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-2-29

Effect of TNF-α on adipogenesis of SD rat bone marrow mesenchymal stem cells and the related molecular mechanism

Li Lin[1],*Xie Youhong*[2]

(*1. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;*
2. Center of Digestion, Affiliated University Town Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To investigate the effect of transforming growth factor-α(TNF-α) on adipogenesis of SD rat bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) and the related molecular mechanism. ***Methods***: The well grown third-passage(P3) SD rat BMSCs were divided into three groups: control group, Ad group and Ad+TNF-α group. RNA and proteins of the cells in three groups were collected at day 14. Cells were stained with oil red O on day 14 to examine the lipid accumulation in each group. Optical density for oil red O was determined by isopropanol extraction and was measured in a plate reader at 490 nm. The mRNA expressions of Wnt10b, peroxisome proliferator-activated receptor-γ(PPAR-γ), CCAAT/enhancer-binding protein-α(C/EBP-α), fatty acid binding protein-4(FABP-4) and preadipocyte factor-1(Pref-1) were detected by qRT-PCR. The protein expression levels of P-β-catenin, PPAR-γ, C/EBP-α, FABP-4 were detected by Western blot. ***Results***: The absorbance(A) value measured at 490 nm was significantly lower in Ad+TNF-α group(0.360 ± 0.035) than in Ad group(0.770 ± 0.025)(P=0.000). qRT-PCR analysis showed that mRNA expressions of Wnt10b and Pref-1 were significantly higher in Ad+TNF-α group(17.050 ± 2.706, 4.135 ± 0.280) than in Ad group(0.575 ± 0.065, 0.514 ± 0.060)(P=0.02, P=0.006). While the mRNA expressions of C/EBP-α, PPAR-γ and FABP-

作者介绍:李 琳,Email:18725730925@163.com,
研究方向:炎症微环境对干细胞成脂分化的影响。

通信作者:谢友红,Email:176763320@qq.com。

基金项目:重庆市渝中区科委资助项目(项目编号:X9237)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161027.1053.024.html (2016-10-27)

4 were significantly lower in Ad+TNF-α group (0.200 ± 0.012, 0.768 ± 0.030, 0.883 ± 0.048) than in Ad group (2.965 ± 0.455, 2.330 ± 0.211, 3.847±0.171) (*P*=0.019, *P*=0.000, *P*=0.001). Western blot showed the protein expressions of C/EBP-α, PPAR-γ and FABP-4 were significantly lower in Ad+TNF-α group (0.586 ± 0.013, 0.356 ± 0.008, 0.118 ± 0.002) than in Ad group (1.082 ± 0.018, 0.840 ± 0.112, 1.094 ± 0.038) (*P*=0.000). The protein expression of P-β-catenin was significantly lower in Ad+TNF-α group (0.648 ± 0.005) than in Ad group (3.376 ± 0.211) (*P*=0.000). ***Conclusion***: The fact that TNF-α inhibits the terminal differentiation of the adipogenesis of SD rat BMSCs and blocks the adipogenesis of SD BMSCs at preadipocyte stage may relate to the increased activity of *Wnt/β-catenin signaling pathway and high expression of Pref-1*.

【Key words】bone marrow mesenchymal stem cells; adipogenesis; Wnt/β-catenin signaling pathway; preadipocyte factor -1

成脂分化是指脂肪前体细胞分化成脂肪细胞的过程，包括决定相和分化相[1]。成脂分化的正常进行对脂肪组织发挥正常的生理功能至关重要。成脂分化障碍与肥胖相关代谢性疾病（如胰岛素抵抗、脂血症、2 型糖尿病）的发生发展息息相关[2-3]。成脂分化受多种信号通路和关键转录因子调控，其中 CCAAT 区增强子结合蛋白-α（CCAAT/enhancer-binding protein-α, C/EBP-α）和过氧化物酶体增殖物激活受体-γ（*peroxisome proliferator-activated receptor-γ*, PPAR-γ）起着至关重要的作用，两者相互协调共同促进脂肪细胞功能蛋白葡萄糖转运体-4（glucose transporter type 4, GLUT-4）、脂肪酸结合蛋白-4（fatty acid binding protein-4, FABP-4）的激活和表达[4]。近几十年的研究发现，Wnt/β-catenin 信号通路通过抑制关键转录因子 C/EBP-α 和 PPAR-γ 的表达抑制成脂分化[5-6]。前体脂肪细胞因子-1（preadipocyte factor-1, Pref-1）是前体脂肪细胞特异表达的蛋白，Pref-1 可以抑制成脂分化[7]。已有研究者发现转化生长因子（transforming growth factor-α, TNF-α）通过激活 Wnt/β-catenin 信号通路和促进 Pref-1 的表达而抑制小鼠 3T3-L1 前体脂肪细胞的成脂分化[8]，这些研究多以前体脂肪细胞为研究对象，而关于 TNF-α 对 SD 大鼠骨髓间充质干细胞（bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs）成脂分化的影响却鲜有报道。本课题以 SD 大鼠 BMSCs 为研究对象，通过观察经典 Wnt 通路、Pref-1 及成脂相关基因的表达来探讨 TNF-α 对 SD 大鼠 BMSCs 成脂分化决定相和分化相的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 4 周龄 SD 大鼠，SPF 级，体质量 80~100 g，由重庆医科大学实验动物中心提供，合格证号：SYXK（渝）2012-0001。

1.1.2 实验试剂 DMEM/F-12 干细胞培养液购自美国 Hyclone 公司，胎牛血清（FBS）购自德国 PNA 公司，TNF-α 购自美国 Peprotech 公司，牛胰岛素、地塞米松、吲哚美辛、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤（IBMX）、β-磷酸甘油、抗坏血酸购自日本 Sigma 公司，茜素红染料、油红 O 染料购自广州赛业公司，Trizol、逆转录试剂盒、扩增试剂盒购自日本 Takara 公司，蛋白提取试剂盒、BCA 试剂盒购自重庆碧云天公司，抗磷酸化 β-catenin（P-β-catenin, Ser33）抗体、抗 FABP-4 抗体、抗 C/EBP-α 抗体购自英国 Abcam 公司，抗 GAPDH 抗体、抗 PPAR-γ 抗体购自美国 Immunoway 公司，羊抗兔 IgG-HRP 购自重庆博培生物技术有限公司，大鼠 BMSCs 表面标记物 CD44、CD29、CD90、CD45、CD11b 抗体购自美国 Ebioscience 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 SD 大鼠 BMSCs 的分离、培养和鉴定 采用全骨髓贴壁法分离大鼠原代 BMSCs。用 FBS 体积分数为 10%的 DMEM/F-12 完全培养基培养原代和传代细胞。原代细胞 48 h 后首次全量换液，此后每 2~3 d 换 1 次液，待细胞生长至 70%~80%汇合时胰酶消化传代。

1.2.1.1 采用流式细胞仪检测 BMSCs 表面分子 CD44、CD29、CD90、CD45、CD11b 的表达 取生长状态良好的 P3 代 BMSCs，0.25%胰酶消化，1 500 r/min 离心 5 min，重悬，调整细胞浓度，每管依次加入抗体，并设立空白对照组，冰上避光孵育 30~45 min，用 PBS 洗涤 3 次除去未结合的抗体，200 μL PBS 重悬细胞，流式细胞仪上机检测。

1.2.1.2 成脂分化诱导鉴定 生长良好的 P3 代细胞生长至 100%汇合后，加入成脂诱导液作用 3 d，接着更换成脂诱导维持液作用 1 d，诱导液与维持液交替使用 3~5 次（12~20 d），然后用维持液再培养 1~7 d，直到脂滴变大、变圆，维持液诱导期间，每隔 2~3 d 更换新鲜维持诱导液。诱导结束后油红 O 染色并记录成脂诱导情况。成脂诱导液的配制：以含有 10%FBS 的 DMEM/F-12 为基础培养液，含诱导成分及终浓度为：地塞米松 1 μmol，IBMX 0.5 mmol，胰岛素 170 nmol，吲哚美辛 100 μmol。成脂诱导维持液的配制：以含有 10% FBS 的 DMEM/F-12 为基础培养液，含诱导成分及终浓度为：胰岛素 170 nmol。

1.2.1.3 成骨分化诱导鉴定 生长良好的 P3 代细胞生长至 100%汇合后，成骨诱导液作用 14 d，2~3 d 换 1 次诱导液，茜素红染色观察并记录成骨诱导情况。成骨诱导液的配置：以含 10%FBS 的 DMEM/F-12 为基础培养液，含诱导成

分及终浓度为：地塞米松 1 mmol，β-磷酸甘油 1 mol，抗坏血酸 50 mmol。

1.2.2 实验分组 取生长良好的 P3 代 BMSCs 进行如下分组：对照组（Con 组）：DMEM/F-12 完全培养基（10%FBS）培养 BMSCs。成脂诱导组（Ad 组）：成脂诱导液和维持液培养 BMSCs。10 ng/mL TNF-α 干预成脂诱导组（Ad+TNF-α 组）：在成脂诱导液和维持液中加入 TNF-α（终浓度为 10 ng/mL）培养 BMSCs。每组分别接种 5 块 6 孔板，培养 14 d 后收集各组细胞的 RNA 和蛋白质。同样的实验重复 3 次。

1.2.3 油红 O 染色及异丙醇萃取后检测吸光度（absorbance，A）值 将 P3 代 BMSCs 进行如下分组：Con 组、Ad 组和 Ad+TNF-α 组。每组细胞各接种 1 个 96 孔板。各组培养 14 d 后进行油红 O 染色并拍照，用异丙醇萃取后用酶标仪检测 A 值，波长 490 nm。同样的实验重复 3 次。

1.2.4 qRT-PCR 采用 Trizol 法提取细胞总 RNA，紫外分光光度计测定 RNA 浓度。将 RNA 标化到相同浓度，按照逆转录试剂盒操作说明将总 RNA 逆转录成 cDNA。采用 SYBR Green 荧光定量 qRT-PCR 检测细胞的 mRNA Ct 值。PCR 反应引物如下：Wnt10b 上游 5'-CAGGCTTTGTGTGGAGTCATT-3'；下游 5'-GAGGTTCTGGGCTGTAGTGG-3'；C/EBP-α 上游 5'-AGGTTTCCTTGGTGAGTTCG-3'；下游 5'-CCCA-GTGTCTTCATCCTCCA-3'；PPAR-γ 上游 5'-CTGGCCTCC-CTGATGAATAA-3'；下游 5'-AAAGTCACCAAAGGGCTTCC-3'；FABP-4 上游 5'-CGACCACCATAAAGAGGAGAC-3'；下游 5'-AAACCACCAAATCCCATCAA-3'；Pref-1 上游 5'-TA-CCCCTAACCCATGCGAGA-3'；下游 5'-ACAGACACTCGAA-GCTCACC-3'；GAPDH 上游 5'-ACAGCAACAGGGTGG TGG-AC-3'；下游 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3'；取 1 μL 逆转录产物进行 qRT-PCR，以 GAPDH 作为内参照，反应体系为 10 μL。反应条件如下：预变性（95 ℃ 30 s）；PCR 反应（40 个循环，95 ℃ 5 s，60 ℃ 30 s，70 ℃ 1 min）。溶解曲线步骤：95 ℃ 15 s，60 ℃ 30 s，95 ℃ 15 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 计算基因相对表达量，$2^{-\Delta\Delta Q}$ 表示实验组目的基因 mRNA 相对表达量相对于对照组改变的倍数。

1.2.5 Western blot 印迹检测 按照蛋白提取试剂盒的说明提取 3 组处理 14 d 后的细胞总蛋白，BCA 法进行蛋白浓度检测并标化，每孔上样量 50 μg，GADPH 作内参照蛋白。样品蛋白加变性缓冲液煮沸 5 min。SDS-PAGE 凝胶电泳，然后转至 PVDF 膜。5%脱脂奶粉 37 ℃孵育 2 h，先后加入特异性一抗和相应的二抗，最后 ECL 光化学法显色。使用 Fusion 软件进行分析。

1.3 统计学处理

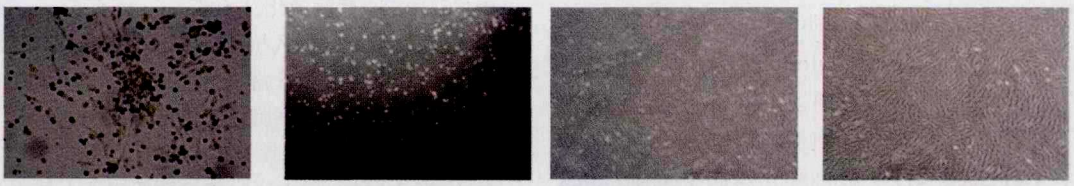
所有数值采用 SPSS 17.0 统计软件，所有结果以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）形式表示，多样本均数比较用单因素方差分析，两两比较采用 LSD/Dunnett's T3 法比较组间差异，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 原代 BMSCs 的培养及鉴定

BMSCs 经过 48 h 首次换液后，可见长梭形、多角形细胞呈集落样贴壁生长，周围杂细胞较多，如图 1A 所示；3~4 d 可见细胞呈漩涡状生长，以长梭形、多角形细胞为主，细胞质丰富，细胞核大，核仁清晰，杂细胞随着换液逐渐减少，如图 1B 所示。5~7 d 见细胞呈长梭形，漩涡状生长明显，细胞汇合度达 90%，如图 1C 所示。传代培养：细胞生长旺盛，形态均一，呈典型的长梭形，漩涡状生长，如图 1D 所示。

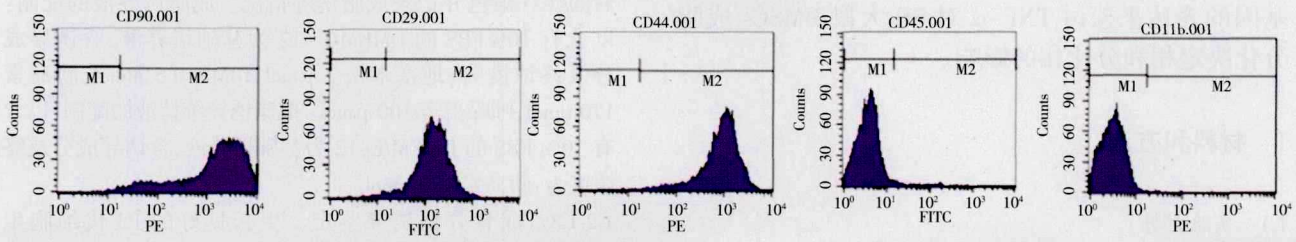
BMSCs 表面标记物的表达：流式细胞仪检测结果显示，第 3 代大鼠 BMSCs 均一表达 CD90、CD29、CD44，表达率分别为 99.5%、99.0%、99.9%；CD45、CD11b 呈阴性表达，阳性率分别为 1.37%、0.17%，如图 2 所示。



A. BMSCs 在培养的第 48 小时（100×） B. BMSCs 在培养的第 4 天（40×） C. BMSCs 在培养的第 6 天（40×） D. 第 3 代 BMSCs（40×）

图 1 不同培养时期 SD 大鼠 BMSCs 形态学观察

Fig.1 Morphology of BMSCs at different phases



A. CD90，表达率 99.5% B. CD29，表达率 99.0% C. CD44，表达率 99.9% D. CD45，表达率 1.37% E. CD11b，表达率 0.17%

图 2 SD 大鼠 BMSCs 表面标记物的表达

Fig.2 Expression of surface markers in BMSCs of SD rats

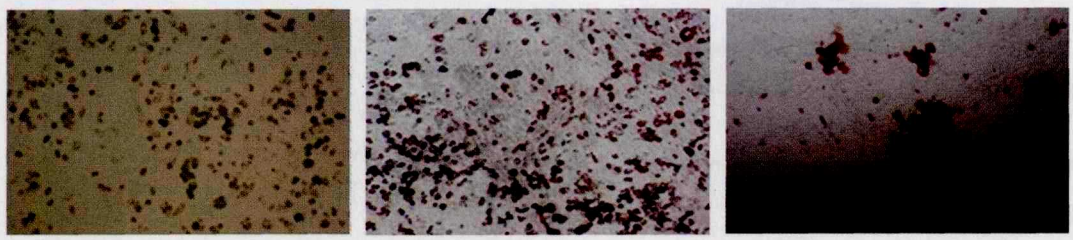
SD大鼠 BMSCs 多向分化鉴定：SD 大鼠 BMSCs 成脂诱导 21 d，随着诱导时间的延长，细胞形态由长梭形变成圆形，细胞质内开始出现脂滴，脂滴饱满大小不一，呈串珠状排列，油红 O 染色呈鲜红色，如图 3A、B 所示。SD 大鼠 BMSCs 成骨诱导 14 d，细胞由长梭形变为多角形，细胞出现重叠，间质内形成大量矿盐沉积的钙化结节，茜素红染色呈红色，如图 3C 所示。

2.2 TNF-α 抑制 SD 大鼠 BMSCs 的成脂分化

3 组细胞经成脂诱导 14 d 后进行油红 O 染色，Ad 组油红 O 染色明显，可见大量红染的脂肪细胞，如图 4A 所示。Ad+TNF-α 组油红 O 染色不明显，视野中很少红染的脂肪细胞，明显少于 Ad 组，大多数细胞仍维持长梭形，如图 4B 所示。Con 组未见有红染的脂肪细胞，细胞呈长梭形，如图 4C 所示。异丙醇萃取细胞内的油红 O 染料后肉眼可见 Ad 组异丙醇溶液呈鲜红色，颜色明显深于 Ad+TNF-α 组和 Con 组，如图 4D 所示。异丙醇萃取油红 O 染料后检测 A 值，Con 组、Ad组、Ad+TNF-α 组的平均 A 值为（0.065 ± 0.005）、（0.770 ± 0.025）、（0.360 ± 0.035），3 组 A 值差异具有统计学意义（F=595.885，P=0.000）。两两比较结果显示 Ad 组的 A 值均高于 Con 组和 Ad+TNF-α 组（P=0.000），Ad+TNF-α 组的 OD 值也高于 Con 组（P=0.000），如图 4E 所示。

2.3 TNF-α 对 SD 大鼠 BMSCs 成脂相关基因表达的影响

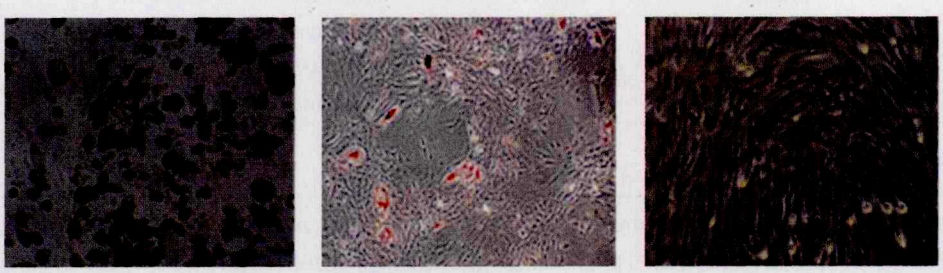
以 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 计算 3 组各基因的相对表达量，将 Ad+TNF-α组和 Ad 组的各基因表达量用 Con 组相应的基因表达量进行标准化，GAPDH 作为内参基因。qRT-PCR 结果显示：Ad+TNF-α 组中 Wnt10b、Pref-1 的 mRNA 水平明显高于 Ad 组（P=0.019，P=0.003）和 Con 组（P=0.020，P=0.006），方差分析分别检验 Wnt10b、Pref-1 的 mRNA 水平在 3 组的表达差异，差异具有统计学意义。PPAR-γ、FABP-4 在 Ad+TNF-α 组表达水平显著低于 Ad 组（P=0.000，P=0.001），而与 Con 组相比无明显统计学意义（P=0.060，P=0.100）。C/EBP-α 在 Ad+TNF-α组表达水平明显低于 Ad 组和 Con 组（P=0.000，P=0.019）。方差分析分别检验 C/EBP-α、PPAR-γ、FABP-4 的 mRNA 水平在 3 组的表达差异，差异具有统计学意义。具体结果见表 1。



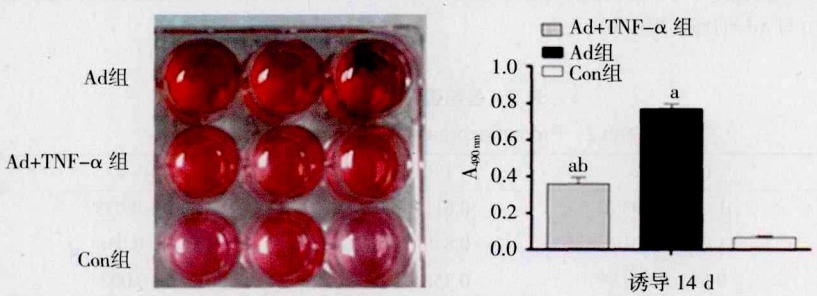
A. 成脂诱导 21 d油红 O 染色前　B. 成脂诱导 21 d 油红 O 染色后　C. 成骨诱导 14 d 后茜素红染色

图 3　SD 大鼠 BMSCs 多向分化结果（40×）

Fig.3　Results of multi-directional differenatiation of SD rats BMSCs（40×）



A. Ad 组油红 O 染色　B. Ad+TNF-α 组油红 O 染色　C. Con 组油红 O 染色



D. 3 组油红 O 染色对比　E. 异丙醇萃取后 A 值

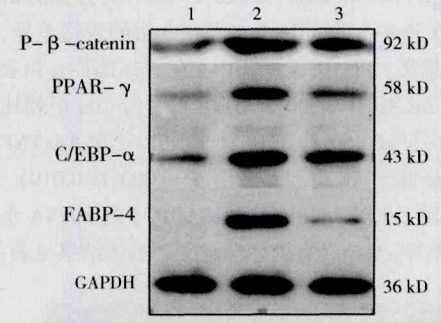
a：与 Con 组相比，P<0.05；b：与 Ad 组相比，P<0.05

图 4　油红 O 染色及异丙醇萃取后 A 值

Fig.4　Oil red O staining and A value for oil red O determined by isopropanol extraction and measured in a plate reader at 490 nm

2.4 TNF-α 对 SD 大鼠 BMSCs 成脂相关蛋白表达的影响

Western blot 结果显示，诱导 14 d 后，Ad+TNF-α 组的 C/EBP-α、PPAR-γ、FABP-4 蛋白表达水平明显低于 Ad 组（均 P=0.000）和 Con 组（P=0.027，P=0.029，P=0.000）。方差分析分别检验 C/EBP-α、PPAR-γ、FABP-4 蛋白表达水平在 3 组之间的差异，差异均具有统计学意义。P-β-catenin 表达水平在 Ad+TNF-α 组明显低于 Ad 组（P=0.000）和 Con 组（P=0.000），方差分析 3 组 P-β-catenin 蛋白表达水平的差异，差异具有统计学意义。具体结果见图 5、表 2。



1：Ad+TNF-α 组；2：Ad 组；3：Con 组

图 5 各组 P-β-catenin，C/EBP-α，PPAR-γ，FABP-4蛋白的表达

Fig.5 Protein expressions of P-β-catenin，C/EBP-α，PPAR-γ，and FABP-4 in each group

3 讨 论

大鼠 BMSCs 具有多向分化潜能，可以向脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞方向分化。BMSCs 的成脂分化同样要经历决定相和分化相。在决定相，BMSCs 不可逆地分化为前体脂肪细胞，不再具有向其他细胞系分化的能力；在分化相，前体脂肪细胞进一步分化，最终分化为具有储存脂肪和胰岛素反应功能的成熟脂肪细胞[1,9]。TNF-α、Pref-1 和 Wnt/β-catenin 信号通路均对成脂分化过程产生负调控作用[5,7-8,10]。Birgit 和 Ulf[8]研究发现 TNF-α 可以抑制 3T3-L1 前体脂肪细胞成脂分化。然而该研究是建立在成脂分化的分化相上进行的探讨，TNF-α 对成脂分化的决定相的影响如何却鲜有报道。

本实验中，BMSCs 多向分化鉴定和表面标记物流式细胞鉴定结果可以表明，本次培养和使用的细胞为 BMSCs。油红 O 染色和 490 nm 处 A 值结果中，Ad+TNF-α 组中红染的脂肪细胞数及 A 值明显降低，提示 TNF-α 抑制了 BMSCs 向脂肪细胞的分化。qRT-PCR 和 Western blot 结果显示，在 Ad+TNF-α

表 1 各组基因 mRNA 的相对表达量（$\bar{x}\pm s$）

Tab.1 mRNA expressions in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	Wnt10b	Pref-1	C/EBP-α	PPAR-γ	FABP-4
Con组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
Ad 组	0.575 ± 0.065^{a1}	0.514 ± 0.060^{c1}	2.965 ± 0.455^{e1}	2.330 ± 0.211^{g1}	3.847 ± 0.171^{i1}
Ad+TNF-α 组	17.050 ± 2.706^{ab}	4.135 ± 0.280^{cd}	0.200 ± 0.012^{ef}	0.768 ± 0.030^{gh}	0.883 ± 0.048^{ij}
F 值	108.350	420.589	87.699	140.451	801.900
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注：Con 组各基因 mRNA 的相对表达量标化为（1.000 ± 0.000）。a1：与 Con 组比较，P=0.016；a：与 Con 组比较，P=0.020；b：与 Ad 组比较，P=0.019；c1：与 Con 组比较，P=0.011；c：与 Con 组比较，P=0.006；d，与 Ad 组比较，P=0.003；e1：与 Con 组比较，P=0.036；e：与 Con 组比较，P=0.000；f：与 Ad 组比较，P=0.019；g1：与 Con 组比较，P=0.000；g：与 Con 组比较，P=0.060；h：与 Ad 组比较，P=0.000；i1：与 Con 组比较，P=0.030；i：与 Con 组比较，P=0.100；j：与 Ad 组比较，P=0.001

表 2 各组蛋白的表达（$\bar{x}\pm s$）

Tab.2 Protein expressions in each group（$\bar{x}\pm s$）

组别	C/EBP-α	PPAR-γ	FABP-4	P-β-catenin
Con组	1.030 ± 0.930	0.611 ± 0.055	0.360 ± 0.028	1.630 ± 0.025
Ad 组	1.082 ± 0.018^{a}	0.840 ± 0.112^{c}	1.094 ± 0.038^{e}	3.376 ± 0.211^{g}
Ad+TNF-α 组	0.580 ± 0.013^{alb}	0.356 ± 0.008^{c1d}	0.118 ± 0.002^{e1f}	0.648 ± 0.005^{g1h}
F 值	73.500	164.784	1 028.645	378.309
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注：a，与 Con 组比较，P=0.738；a1：与 Con 组比较，P=0.027；b：与 Ad 组比较，P=0.000；c：与 Con 组比较，P=0.033；c1：与 Con 组比较，P=0.029；d：与 Ad 组比较，P=0.000；e：与 Con 组比较，P=0.000；e1：与 Con 组比较，P=0.000；f：与 Ad 组比较，P=0.000；g：与 Con 组比较，P=0.000；g1：与 Con 组比较，P=0.000；h：与 Ad 组比较，P=0.000

组，C/EBP-α、PPAR-γ 和 FABP-4 的 mRNA 和蛋白质的表达受到明显抑制，这提示 TNF-α 抑制了成脂关键转录因子和脂肪细胞功能蛋白的表达，而这导致了 BMSCs 成脂分化的受阻。

Wnt/β-catenin 信号通路高度保守，正常情况下，大肠腺瘤样蛋白（adenomatosis polyposis coli，APC）、轴素多聚蛋白（Axin）和糖原合成酶激酶（glycogen synthase kinase 3，GSK-3β）组成的复合物将 β-catenin 磷酸化，磷酸化的 β-catenin（P-β-catenin）易被泛素降解系统降解以维持胞内游离 β-catenin 的低浓度。当 Wnt/β-catenin 信号通路激活时，APC、Axin 和 GSK-3β 的复合物失去对 β-catenin 的磷酸化作用，P-β-catenin 减少，β-catenin 得以在胞内稳定存在并向胞内转移，与 TCF/LEF 家族相互作用后调节下游基因的转录和表达[11]。在 Ad+TNF-α 组，P-β-catenin 的表达明显低于 Ad 组，结合 Wnt10b mRNA 的高表达可知，TNF-α 增加了 Wnt/β-catenin 信号通路的活性。从上述结果可以推测，TNF-α 抑制 SD 大鼠 BMSCs 的成脂分化是通过增加经典Wnt 通路的活性，进而抑制成脂转录因子 C/EBP-α、PPAR-γ 和脂肪功能蛋白 FABP-4 的表达来实现的。该实验结果与报道的结果一致[8,12]。然而该抑制作用是作用于 BMSCs 成脂分化的决定相还是分化相还不得而知，为此本课题组检测了 Pref-1 的表达情况。Pref-1 是前体脂肪细胞的特异表达因子。诱导 14 d 后，Ad+TNF-α 组 Pref-1 的 mRNA 表达水平明显升高，并且明显高于 Con 组和 Ad 组，这表明在 Ad+TNF-α 组，BMSCs 经历了决定相分化为前体脂肪细胞，由此推测 TNF-α 并不能阻止 BMSCs 向前体脂肪细胞的分化（即决定相）。由于只检测了 Pref-1 的 mRNA 表达水平，TNF-α 对其蛋白表达的影响如何尚待研究，这样可以更好地探讨 TNF-α 对 BMSCs 成脂分化决定相的影响。

上述结果与 Bowers 和 Lane[13]的结果相似，该研究发现，在 10T1/2 多能干细胞和 A33 前体脂肪细胞中，Wnt/β-catenin 信号通路有着相反的表达活性，A33 前体脂肪细胞中经典 Wnt 通路的激活有利于前体脂肪细胞的增殖，但是前体脂肪细胞继续分化成为脂肪细胞需要经典 Wnt 通路的再抑制。本实验结果也印证了体内的研究结果，许多研究发现肥胖者的脂肪组织中并不缺少分化成成熟脂肪细胞的前体脂肪细胞，而是由于在肥胖时，抑制前体脂肪细胞分化的蛋白表达增加[如炎症因子 TNF-α、Wnt1 诱导的信号蛋白（WISP2）]导致了成脂分化过程受阻[14]。

综上所述得出 TNF-α 对 BMSCs 成脂过程分化相的抑制作用可能是通过增加 Wnt/β-catenin 信号通路的活性以及促进 Pref-1 的表达来实现的，最终将 SD 大鼠 BMSCs 的成脂分化阻断在了前体脂肪细胞阶段。这为人们深入认识炎症微环境抑制成脂分化提供了更多的依据，然而细胞内信号通路繁多，且相互之间有沟通对话，不排除有其他因素参与 TNF-α 抑制 BMSCs 成脂分化的过程中，更多深入的研究尚待进行。

参 考 文 献

[1] Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, et al. Adipocyte and adipogenesis[J]. European Journal of Cell Biology, 2013, 92(6): 229-236.

[2] Gustafson B, Smith U. Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk[J]. Atherosclerosis, 2015, 241(1): 27-35.

[3] Neeland IJ, Turer AT, Ayers CR, et al. Dysfunctional adiposity and the risk of prediabetes and type 2 diabetes in obese adults[J]. JAMA, 2012, 308(11): 1150-1159.

[4] Wu Z, Rosen ED, Brun R, et al. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity[J]. Molecular Cell, 1999, 3(2): 151-158.

[5] Ross SE, Hemati N, Longo KA, et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling[J]. Science, 2000, 289(5481): 950-953.

[6] Shen L, Glowacki J, Zhou S. Inhibition of adipocytogenesis by canonical WNT signaling in human mesenchymal stem cells[J]. Exp Cell Res, 2011, 317(13): 1796-1803.

[7] Smas CM, Sul HS. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation[J]. Cell, 1993, 73(73): 725-734.

[8] Birgit G, Ulf S. Cytokines promote Wnt signaling and inflammation and impair the normal differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes[J]. J Bio Chem, 2006, 281(281): 9507-9516.

[9] Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression[J]. J Nutr, 2000, 130(12s): 3122-3126.

[10] Sullivan CB, Porter RM, Evans CH, et al. TNF-α and IL-1β influence the differentiation and migration of murine MSCs independently of the NF-κB pathway[J]. Stem Cell Research & Therapy, 2014, 5(4): 1-13.

[11] Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface[J]. Journal of Cell Science, 2006, 119(3): 395-402.

[12] Isakson P, Hammarstedt A, Gustafson B, et al. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor-alpha, and inflammation[J]. Diabetes, 2009, 58(7): 1550-1557.

[13] Bowers RR, Lane MD. Wnt signaling and adipocyte lineage commitment[J]. Cell Cycle, 2008, 7(9): 1191-1196.

[14] Hammarstedt A, Hedjazifar S, Jenndahl L, et al. WISP2 regulates preadipocyte commitment and PPAR-γ activation by BMP4[J]. PNAS, 2013, 110(7): 2563-2568.

（责任编辑：冉明会）