

论著

文章编号:1000-5404(2012)12-1206-04

牛黄熊脱氧胆酸抑制 TNF- α 刺激 3T3-L1 细胞脂肪分解

夏文燕,王丽静,刘小莺,林益川,刘礼斌 (350001 福州,福建医科大学协和临床医学院)

[摘要] **目的** 探讨牛黄熊脱氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid, TUDCA)对 TNF- α 刺激 3T3-L1 细胞脂肪分解及其可能的机制。**方法** 以 3T3-L1 前脂肪细胞经 1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤、地塞米松、胰岛素诱导分化成 3T3-L1 脂肪细胞,设:①对照组;②TNF- α (50 ng/ml)组;③TUDCA(1 mmol/L) + TNF- α (50 ng/ml)组;④TUDCA 组(1 mmol/L)。通过油红 O 染色观察脂滴形态变化并测定培养基中甘油含量作为评价脂肪分解的指标,同时用 Western blot 检测脂滴包被蛋白 perilipin A 蛋白表达。**结果** TNF- α 可以显著刺激 3T3-L1 细胞脂肪分解,包括功能学显示甘油释放量显著增加[(2.784 \pm 0.104) mmol/L, $P < 0.01$],形态学显示脂滴碎裂;TUDCA 可以明显抑制 TNF- α 刺激的 3T3-L1 细胞脂肪分解,包括阻止脂滴形态的改变,逆转甘油的释放[(1.718 \pm 0.085) mmol/L, $P < 0.01$]。通过 Western blot 检测结果显示 TNF- α 可以下调 perilipin A 蛋白表达[(0.227 \pm 0.004), $P < 0.01$],而 TUDCA 可以阻断 TNF- α 对 perilipin A 蛋白表达的下调作用[(0.705 \pm 0.066), $P < 0.01$]。**结论** TUDCA 可能通过阻止 perilipin A 蛋白下调而抑制 TNF- α 诱发脂肪分解,通过减少游离脂肪酸 FFA,从而对胰岛素抵抗、糖尿病等具有一定的改善作用。

[关键词] 脂肪分解;TUDCA;TNF- α ;脂肪细胞

[中图分类号] R341;R589.2;R963

[文献标志码] A

Tauroursodeoxycholic acid blocks lipolysis induced by TNF- α in 3T3-L1 adipocytes

Xia Wenyan, Wang Lijing, Liu Xiaoying, Lin Yichuan, Liu Libin (Department of Endocrinology, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian Province, 350001, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) on TNF- α -induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. **Methods** The 3T3-L1 adipocytes obtained from 3T3-L1 preadipocytes induced by the cocktail medium containing 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), dexamethasone and insulin were divided into 4 groups, including a control group, a TNF- α (50 ng/ml) group, a TUDCA (1 mmol/L) group and a TNF- α (50 ng/ml) + TUDCA (1 mmol/L) group. The intracellular lipid droplets were stained by oil red O. The content of glycerol released in medium was determined by colorimetric assay. The expression of perilipin A was detected by Western blotting. **Results** TNF- α significantly induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. The content of glycerol released in medium significantly increased (2.784 \pm 0.104 mmol/L, $P < 0.01$), and the lipid droplets dispersed. TUDCA could significantly block the lipolysis induced by TNF- α by inhibiting the dispersion of lipid droplets and reversing the glycerol release (1.718 \pm 0.085 mmol/L, $P < 0.01$). The Western blotting showed that TNF- α could downregulate the expression of perilipin A (0.227 \pm 0.004, $P < 0.01$), which could be blocked by TUDCA (0.705 \pm 0.066, $P < 0.01$). **Conclusion** TUDCA attenuates TNF- α -induced lipolysis by blocking the downregulation of perilipin A, and reduces the concentration of free fatty acids to improve insulin resistance and type 2 diabetes.

[Key words] lipolysis; tauroursodeoxycholic acid; TNF- α ; adipocytes

Supported by the Youth Scientific Research Programme of Fujian Provincial Health Department (2009-1-17) and the Nursery Foundation of Fujian Medical University (2010MP040). Corresponding author: Liu Libin, E-mail: libin.Liu@hotmail.com

[基金项目] 福建省卫生厅青年科研课题(2009-1-17);福建医科大学苗圃基金(2010MP040)

[通信作者] 刘礼斌, E-mail: libin.Liu@hotmail.com

肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor- α , TNF- α)是介导胰岛素抵抗和2型糖尿病发生的主要炎症因子之一。其具体机制包括刺激细胞脂肪分解进而影响糖脂代谢、诱导胰岛素抵抗。脂肪细胞的脂解增加将导致甘油三酯增高及游离脂肪酸(FFA)水平的提高^[1], FFA的增加又将限制葡萄糖的利用,并可诱发胰岛素抵抗^[2]。围脂滴包被蛋白(perilipin A)是脂滴表面的主要蛋白,对脂肪分解起着屏障作用,未被磷酸化时保护甘油三酯不被水解,其含量减少或磷酸化增加均可导致脂肪分解增加。而在基础状态下减少 perilipin A的水平也是一种增加脂解率的机制^[3]。已有研究证实 TNF- α 可以激活细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)并显著减少 perilipin A 的蛋白表达水平^[4]。为此,寻找有效药物阻断 TNF- α 刺激的脂肪分解或将成为靶目标可以用于治疗慢性炎症诱发的代谢紊乱,包括糖耐量受损和血脂异常等。近年来,牛黄熊脱氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid, TUDCA)成为这方面的研究热点药物,它是内源性胆汁的一种衍生物,以证实这种分子伴侣可以明显减轻内质网应激、改善胰岛素敏感性^[5]。所以本实验研究 TUDCA 能否对 TNF- α 刺激 3T3-L1 细胞脂解产生影响,并探讨可能的分子机制,为其改善胰岛素敏感性提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

3T3-L1 前脂肪细胞株(American type culture collection, ATCC),高糖无酚红(DMEM)培养基、油红 O、地塞米松(D4902)、1-甲基-3-异丁基-黄嘌呤(I5879,美国 Sigmag 公司),DMEM 培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司)。胎牛血清(美国 PAA 公司),胰岛素(丹麦诺和诺德公司)。TNF- α (美国 Pepro-Tech 公司),兔抗牛 Perilipin A 抗体(北京博奥森公司)。TUDCA(德国 Merck),甘油检测试剂盒(上海超研生物公司)。

1.2 方 法

1.2.1 3T3-L1 前脂肪细胞的培养和诱导分化 3T3-L1 前脂肪细胞的培养和诱导分化可参考王丽静等^[6]的研究方法。

1.2.2 细胞生存率测定——MTT 实验 ①在 96 孔培养板中每孔接种 100 μ l 共 5×10^4 个细胞,分化后的成熟脂肪细胞于不同浓度(0.1、1.0、10.0、20.0、50.0、100.0) ng/ml 的 TNF- α , 作用 24 h 后加入 MTT 溶液之后具体操作可参照黄艳等^[7]最后计算细胞存活率。

1.2.3 3T3-L1 脂肪细胞分组 将 3T3-L1 脂肪细胞分为:①对照组;②TNF- α 组;③TUDCA + TNF- α 组;④TUDCA 组。细胞用无血清培养同步化 12 h,以使所有细胞的生长状态一致后,TUDCA + TNF- α 组、TUDCA 组两组无血清培养液中分别都加

入 TUDCA,并使 TUDCA 的终浓度达 1 mmol/L,预处理 3 h 后, TNF- α 组、TUDCA + TNF- α 组分别都加入 TNF- α (50 ng/ml),继续温育 24 h。

1.2.4 3T3-L1 脂肪细胞脂肪分解的测定 将脂肪细胞分组后进行不同的干预,孵育后测定培养基中甘油累积量作为衡量脂肪细胞分解的指标。用 GPO-POD 酶测定培养基中甘油含量作为其指标。将细胞孵育一定时间后直接测定培养基中甘油含量作为累积值。在酶标板中每组各设置 5 个孔,将 50 μ l 无酚红 DMEM 培养液中加入 150 μ l 工作液中,37 $^{\circ}$ C 静置 15 min,于波长 550 nm 处比色。绘制标准曲线计算甘油浓度。

1.2.5 油红 O 染色观察脂滴的形态变化 吸去培养液,用 PBS 漂洗 3 次后用多聚甲醛固定 30 min,再用稀释后过滤的油红每孔加 1.5 ml 染色 40 min,再用 60% 异丙醇漂洗,后用 PBS 再次漂洗,最后拿至显微镜下观察。

1.2.6 Western blot 检测 perilipin A 蛋白的表达 具体步骤除了膜封闭后加入 perilipin A 多克隆抗体孵育过夜,其余可参考王丽静等^[6]的方法。

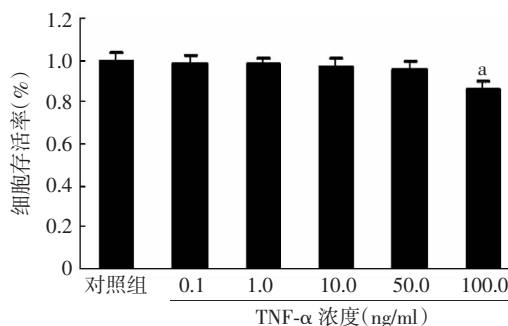
1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间采用单因素方差分析,并用 LSD 法多重比较。

2 结 果

2.1 不同浓度的 TNF- α 对 3T3-L1 细胞存活率的影响

不同浓度(0.1、1.0、10.0、50.0、100.0 ng/ml)的 TNF- α 分别都作用 24 h 后,结果发现 100.0 ng/ml 的 TNF- α 对细胞的存活率影响很大,与对照组比差异有统计学意义($P < 0.01$),而其余各组浓度(0.1、1.0、10.0、50.0 ng/ml),与对照组比较,无统计学差异($P > 0.05$)。见图 1。鉴于实验不受细胞自身存活数的影响,我们选择 TNF- α 浓度为 50.0 ng/ml 用于实验研究。



a: $P < 0.01$, 与对照组比较

图 1 不同浓度的 TNF- α 对 3T3-L1 细胞存活率的影响

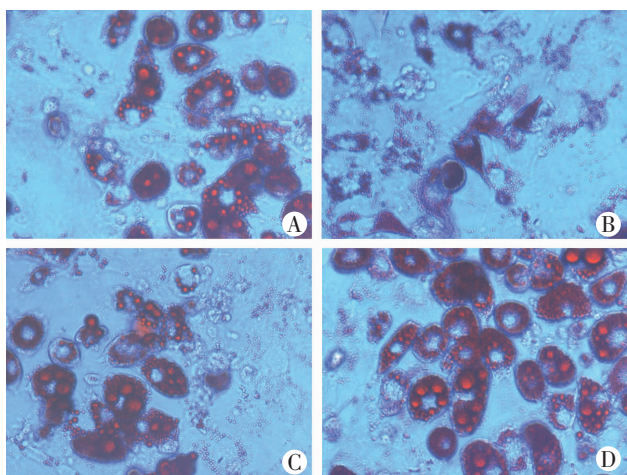
2.2 TUDCA 对 TNF- α 诱发的 3T3-L1 细胞脂肪分解的影响

测定培养基中甘油累积量作为衡量脂肪细胞分解的指标,结果显示 TNF- α 组的甘油释放量(2.784 ± 0.104) mmol/L,较对照组(1.663 ± 0.034) mmol/L 明显增高($P < 0.01$),说明 TNF- α 可以显著刺激脂肪细胞发生脂解反应;TUDCA + TNF- α

组甘油释放量(1.718 ± 0.085) mmol/L,与 TNF-α 组相比显著降低($P < 0.01$),而对照组分别与 TUDCA + TNF-α 组和 TUDCA 组(1.642 ± 0.048) mmol/L 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),说明 1 mmol/L 的 TUDCA 预处理 3 h 后,可以阻止脂肪分解,表明 TUDCA 可以显著抑制 TNF-α 刺激的脂肪分解。

2.3 TUDCA 对 TNF-α 诱发的 3T3-L1 脂肪细胞内脂滴形态的影响

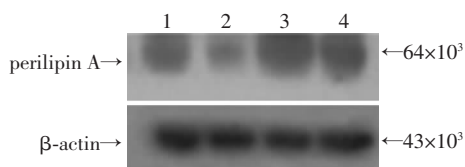
从图 2 可以观察到 TNF-α 组与对照组相比,脂滴碎裂明显,说明 TNF-α (50 ng/ml) 可以明显改变细胞内的脂滴形态,在给予 TNF-α 之前细胞内脂滴体积较大,数量较少,刺激 24 h 后,细胞内的脂滴无论是核周围还是周边都明显出现脂滴碎裂。同时也观察到 TUDCA + TNF-α 组中脂滴形态并未表现出 TNF-α 组中脂滴碎裂程度,提示预处理 TUDCA (1 mmol/L) 3 h 后可以显著抑制 TNF-α 的诱发的脂滴形态改变。



A: 对照组; B: TNF-α 组; C: TUDCA + TNF-α 组; D: TUDCA 组
图 2 TNF-α 和 TUDCA 对细胞内脂滴形态的影响
(倒置电子显微镜 ×400)

2.4 TUDCA 对 TNF-α 刺激后 3T3-L1 脂肪细胞内 perilipin A 蛋白表达的影响

结果显示 TNF-α 组中 perilipin A 蛋白的表达明显减少(0.277 ± 0.004),与对照组(0.717 ± 0.046)相比,差异有统计学意义($P < 0.01$),而 TUDCA + TNF-α 组 TUDCA (1 mmol/L) 预处理 3 h 后抑制了 TNF-α 导致的 perilipin A 蛋白减少(0.705 ± 0.066),与 TNF-α 组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$); TUDCA + TNF-α 组和 TUDCA 组(0.593 ± 0.039)分别与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 3。



1: 对照组; 2: TNF-α 组; 3: TUDCA + TNF-α 组; 4: TUDCA 组
图 3 Western blot 检测各组 perilipin A 蛋白表达

3 讨论

TNF-α 是目前研究最广的与胰岛素抵抗有关的脂肪细胞因子,它可以通过抑制脂肪细胞 FFA 的摄取、抑制脂肪生成以及通过脂解刺激 FFA 的释放,又促进肝细胞内脂质合成而直接改变脂代谢,促进胰岛素抵抗及代谢综合征的发生。sTNF-α 在 TNF-α 加工中受损则可以提高系统的胰岛素敏感性^[8]。所以我们选择了 TNF-α 作为一种药物研究工具,研究与脂代谢紊乱的关系。

首先实验中我们先通过 MTT 法检测不同浓度 TNF-α 作用 24 h 后的细胞生存率,从实验结果中可知,我们可以选择的 TNF-α 最大浓度为 50 ng/ml,而无法选择国外研究 TNF-α 脂解的所用最大剂量 100 ng/ml TNF-α 的浓度相同,这也许和细胞自身状态和培养有关^[9]。继之我们也同样证实了 TNF-α 与脂肪细胞脂肪分解密切相关,50 ng/ml 的 TNF-α 处理 24 h 后可以显著刺激 3T3-L1 脂肪细胞脂肪分解,甘油释放量增加($P < 0.01$),从而增加 FFA 量。这与 Laurencikiene 等^[10]在人体脂肪细胞的研究实验结果一致。

perilipin A 蛋白对基础脂肪分解起着屏障作用,防止各种脂肪酶如激素敏感性脂肪酶(hormonesensitive lipase, HSL)和甘油三酯脂肪酶(adipose triglyceride lipase, ATGL)等接近脂滴而保护脂滴不被分解,当其含量减少时该屏障被修饰而发生相应变化,导致脂肪分解^[11]。Gandotra 等^[12]研究证明 perilipin 是甘油三酯正常储存的必需条件以及其缺失所致的脂代谢紊乱能导致严重的胰岛素抵抗和糖调节受损。perilipin A 与 TNF-α 导致脂肪分解的机制相关,本实验证实 TNF-α 可以显著下调 perilipin A 的蛋白表达量,并推测 TNF-α 可能是通过减少 perilipin A 在脂滴表面覆盖的面积,增加了脂肪酶与甘油三酯的接触机会,从而促进脂肪分解。这也符合 Zhai 等^[13]在 129/SvEv perilipin 基因敲除小鼠导致血浆脂肪酸增加的研究结果,他们也同时提出了 perilipin 的缺失,也导致胰岛素增加,出现胰岛素抵抗。所以抑制 perilipin A 的减少,有助于抑制脂解的发生,本实验结果正显示若阻止了 perilipin A 的下调,则脂解基本被抑制。

以往 TUDCA 多应用在肝细胞中,治疗肝细胞脂质过氧化、内质网应激等,而最近几年已有研究证实牛黄熊脱氧胆酸 TUDCA 在内皮细胞、脂肪细胞中提高了胰岛素的反应性和受损的糖耐量^[14],最新证实在 C57BL/6 小鼠中 TUDCA 可以减轻肥胖导致的代谢紊乱包括糖耐量异常、胰岛素抵抗、高胰岛素血症以及血

压异常^[15]。由此 TUDCA 具有一定的应用前景。因此我们实验中也选择 TUDCA 用于 3T3-L1 脂肪细胞中,以研究对脂肪细胞脂代谢的影响。鉴于以往国外对 TUDCA 在体外细胞中的使用剂量,在不影响细胞存活率下,有选择在 100 nmol/L ~ 1 mmol/L 之间,预处理时间有过夜到 1 h 不等,我们参照 TUDCA 在腺细胞中研究所用浓度^[16],再根据自己预实验结果调整,最终选择 1 mmol/L TUDCA 预处理 3 h 方案用于实验研究。对 TUDCA 的作用评价,部分可以从甘油释放量的测定推断 TUDCA 可以干预 3T3-L1 脂肪细胞的脂代谢,本实验证明 TUDCA 可以通过抑制 TNF- α 脂解,减少 FFA,这对胰岛素敏感性的提高可能存在一定的益处。从脂滴形态改变方面分析,TUDCA 可以保护脂滴形态不受改变,这也是抑制脂肪分解的一种表现。另外,为了进一步研究其可能的分子机制,我们研究了 TUDCA 对 perilipin A 的影响。发现 TUDCA + TNF- α 组与对照组的 perilipin A 蛋白表达量无差异 ($P > 0.05$),说明 TUDCA 可能通过阻断 TNF- α 对 perilipin A 的作用而抑制脂肪分解,这一推断在上述的甘油释放量检测中得到初步证实,但具体的机制还有待进一步探索。

此外,鉴于内质网应激是脂代谢紊乱发生的机制之一^[17],而在肥胖动物体中,已证实 TUDCA 可以调节内质网功能,使得内质网应激元件减少,改善脂代谢紊乱,提高胰岛素敏感性^[18],因此我们推测内质网应激信号通路是否参与 TUDCA 抑制 TNF- α 诱发的脂肪分解,有待进一步研究证实。

参考文献:

[1] 杨林辉,陈东风. TNF- α 对脂肪变性肝细胞 SREBP-1c 的表达及甘油三酯含量的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(23): 2354 - 2357.

[2] Tinahones F J, Garrido-Sanchez L, Miranda M, *et al.* Obesity and insulin resistance-related changes in the expression of lipogenic and lipolytic genes in morbidly obese subjects [J]. *Obes Surg*, 2010, 20(11): 1559 - 1567.

[3] Kovsan J, Ben-Romano R, Souza S C, *et al.* Regulation of adipocyte lipolysis by degradation of the perilipin protein; nelfinavir enhances lysosome-mediated perilipin proteolysis [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(30): 21704 - 21711.

[4] Chung T H, Yen-Ping-Kuo M, Chen J K, *et al.* YC-1 rescues cancer cachexia by affecting lipolysis and adipogenesis [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(9): 2274 - 2283.

[5] Jiao P, Ma J, Feng B, *et al.* FFA-induced adipocyte inflammation and

insulin resistance: involvement of ER stress and IKK β pathways [J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2011, 19(3): 483 - 491.

[6] 王丽静,张尉,刘小莺,等. 地塞米松诱导 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型的建立 [J]. 福建医科大学学报, 2007, 41(3): 282 - 284.

[7] 黄艳,黄刚,胡长江,等. GW3965 在 Raji 细胞中对 BLyS 表达的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(13): 1342 - 1345.

[8] Serino M, Menghini R, Fiorentino L, *et al.* Mice heterozygous for tumor necrosis factor-alpha converting enzyme are protected from obesity-induced insulin resistance and diabetes [J]. *Diabetes*, 2007, 56(10): 2541 - 2546.

[9] Bezaire V, Mairal A, Anesia R, *et al.* Chronic TNFalpha and cAMP pre-treatment of human adipocytes alter HSL, ATGL and perilipin to regulate basal and stimulated lipolysis [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(18): 3045 - 3049.

[10] Laurencikiene J, Van-Harmelen V, Arvidsson-Nordstrom E, *et al.* NF-kappaB is important for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes [J]. *J Lipid Res*, 2007, 48(5): 1069 - 1077.

[11] Arrese E L, Mirza S, Rivera L, *et al.* Expression of lipid storage droplet protein-1 may define the role of AKH as a lipid mobilizing hormone in *Manduca sexta* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2008, 38(11): 993 - 1000.

[12] Gandotra S, Le-Dour C, Bottomley W, *et al.* Perilipin deficiency and autosomal dominant partial lipodystrophy [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(8): 740 - 748.

[13] Zhai W, Xu C, Ling Y, *et al.* Increased lipolysis in adipose tissues is associated with elevation of systemic free fatty acids and insulin resistance in perilipin null mice [J]. *Horm Metab Res*, 2010, 42(4): 247 - 253.

[14] Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, *et al.* Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes [J]. *Science*, 2006, 313(5790): 1137 - 1140.

[15] Purkayastha S, Zhang H, Zhang G, *et al.* Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(7): 2939 - 2944.

[16] Malo A, Kruger B, Seyhun E, *et al.* Tauroursodeoxycholic acid reduces endoplasmic reticulum stress, trypsin activation, and acinar cell apoptosis while increasing secretion in rat pancreatic acini [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, 299(4): G877 - G886.

[17] Yamamoto K, Takahara K, Oyadomari S, *et al.* Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6alpha-knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(17): 2975 - 2986.

[18] Anderson C D, Upadhyya G, Conzen K D, *et al.* Endoplasmic reticulum stress is a mediator of posttransplant injury in severely steatotic liver allografts [J]. *Liver Transpl*, 2011, 17(2): 189 - 200.

(收稿:2011-11-16;修回:2012-02-27)

(编辑 栾嘉)