

TSH 与脂肪细胞 NF- κ B、肿瘤坏死因子- α 蛋白水平相关性的研究

张雅静 赵伟 张宏 吴晓明 刘佳 张琳 李维

【提要】 ELISA 法检测大鼠血清 TSH 水平, Western 印迹法检测大鼠脂肪组织及 3T3-L1 脂肪细胞 NF- κ B p65、肿瘤坏死因子(TNF)- α 蛋白水平。结果显示 TSH 与 NF- κ B p65、TNF- α 蛋白表达正相关, 与胰岛素作用指数负相关, TSH 促进脂肪细胞 NF- κ B p65 蛋白表达及 TNF- α 分泌呈剂量依赖性($P < 0.05$)。

【关键词】 胰岛素抵抗; 脂肪细胞; 促甲状腺激素; 肿瘤坏死因子- α ; 核转录因子- κ B

Correlation of thyroid-stimulating hormone with NF- κ B p65 and TNF- α in adipocytes ZHANG Ya-jing, ZHAO Wei, ZHANG Hong, WU Xiao-ming, LIU Jia, ZHANG Lin, LI Wei. Key Laboratory of Hormones and Development, Ministry of Health, Metabolic Diseases Hospital & Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Corresponding author: ZHANG Hong, Email: zh80008@163.com

【Summary】 Serum TSH level was determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The expression of NF- κ B p65 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were quantified by Western blotting. The results showed that serum TSH concentration was positively correlated with the expression of NF- κ B p65 and TNF- α , and negatively correlated with insulin activity index. The levels of TNF- α and NF- κ B p65 both were increased by TSH in a dose dependent manner($P < 0.05$).

【Key words】 Insulin resistance; Adipocyte; Thyroid-stimulating hormone; Tumor necrosis factor-alpha; Nuclear factor-kappa B

(Chin J Endocrinol Metab, 2013, 29; 257-259)

近年来有研究表明,脂肪细胞表面同样存在促甲状腺激素受体(thyroid-stimulating hormone receptor, TSHR)表达^[1,2]。其是否刺激脂肪细胞分泌促炎症因子,进而参与胰岛素抵抗的发生,尚少见报道。本研究拟探讨促甲状腺激素(TSH)与脂肪细胞核 NF- κ B、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)蛋白水平相关性。

一、材料和方法

1. 材料:大鼠由日本大冢制药株式会社德岛研究所引进;3T3-L1 前脂肪细胞株购于南京 KeyGENE 公司;3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-Isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)、胰岛素、地塞米松、DMSO、牛 TSH 购于美国 Sigma 公司;酶联免疫检测试剂盒购于美国 R&D systems 公司;抗体均购于美国 Santa cruz 公司。

2. 方法:(1)动物模型建立:4 周龄雄性 OLETF 大鼠,饲养至 42 周龄,经口服葡萄糖耐量试验(OGTT)证实已发生糖尿病的大鼠为糖尿病组,其同系非同株的 LETO 大鼠为正常对照组。糖尿病判定标准^[3]:血糖峰值 >16.7 mmol/L 和糖负荷后 2 h 血糖 >11.1 mmol/L 诊断为糖尿病。采用李氏^[4]公式计算胰岛素作用指数。(2)收集血清及脂肪组织:术前禁食 12 h,留取血清,于 -80°C 储存备用,择日采用酶联免疫吸附试验(ELISA)

法检测 TSH 浓度;取附睾脂肪组织, -80°C 冰箱冻存,择日用于 Western 印迹检测。(3)3T3-L1 前脂肪细胞培养和诱导分化:将细胞以 $1.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 密度接种,以含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基培养,每 48 h 更换 1 次培养基,细胞融合 2 d 后,换含 0.5 mmol/L 的 IBMX、 $1.7 \mu\text{mol/L}$ 胰岛素、 $0.25 \mu\text{mol/L}$ 地塞米松和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 48 h 后,撤去 IBMX 和地塞米松,再 48 h 后撤去胰岛素,每 48 h 换液 1 次,分化 8~10 d,油红 O 染色鉴定,倒置显微镜下观察细胞形态、拍照,记录细胞分化情况。(4)收集培养基及提取 3T3-L1 脂肪细胞总蛋白:予以不同浓度牛 TSH(0.01、0.1、1 mIU/ml)刺激 4 h 后,以及予以 $10 \mu\text{mol/L}$ 蛋白激酶 A 抑制剂——H89 预处理 15 min 后,收集培养基,ELISA 法检测 TNF- α 浓度,并收集细胞,提取蛋白用于 Western 印迹检测。予以干预因素之前,细胞在无血清 DMEM 培养基中过夜。实验重复进行 3 次。(5)Western 印迹结果判定:ECL 法显示蛋白条带,使用 SYNGENE 全自动凝胶成像分析系统中照相,用 Gene tool 分析软件进行灰度值测定,确定蛋白相对表达量。

3. 统计学处理:采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, Pearson 相关分析。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

二、结果

1. 动物模型建立:42 周龄大鼠 OGTT 显示,OLETF 大鼠血糖峰值均大于 16.7 mmol/L, OGTT 2 h 血糖均大于 11.1 mmol/L,而 LETO 大鼠血糖值始终介于 5.2~8.3 mmol/L,提示

DOI:10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2013.03.018

基金项目:天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目(10JCZDJC19900)

作者单位:300070 天津医科大学代谢病医院内分泌研究所,卫生部激素与发育重点实验室

通信作者:张宏,Email: zh80008@163.com

表 1 两组大鼠特征比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	胰岛素作用指数	TSH (mIU/L)	促甲状腺激素受体	NF- κ B p65	肿瘤坏死因子- α
对照组	8	0.19 \pm 0.05	2.46 \pm 0.45	0.63 \pm 0.14	0.30 \pm 0.10	0.59 \pm 0.18
糖尿病组	8	0.06 \pm 0.01 ^b	3.93 \pm 0.23 ^b	1.02 \pm 0.40 ^a	0.62 \pm 0.20 ^b	0.77 \pm 0.12 ^a

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$

造模成功。

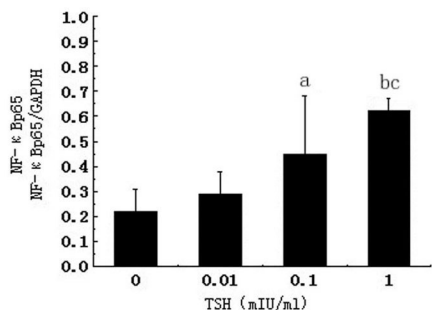
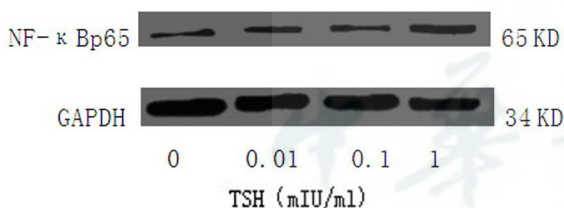
2. 2 组大鼠一般特征比较:42 周龄时,糖尿病组血清 TSH、附睾脂肪组织 TSHR、NF- κ B p65、TNF- α 蛋白表达水平均高于对照组,而胰岛素敏感性低于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$,表 1)。

3. Pearson 相关分析:大鼠血清 TSH 水平与附睾脂肪组织 NF- κ B p65、TNF- α 蛋白表达水平均呈正相关($r=0.591$, $r=0.607$, $P<0.05$),与 IAI 呈负相关($r=-0.854$, $P<0.01$)。

4. 3T3-L1 前脂肪细胞的培养及诱导分化:诱导成熟的 3T3-L1 脂肪细胞经油红 O 染色,胞浆内遍布亮红色颗粒,苏木素复染后,细胞核呈蓝色,偏离细胞中央。10 倍光镜下观察,随机计数 10 个非重复视野内脂肪细胞占总细胞数的比例,大于 95% 呈脂肪细胞表型。

5. TSH 对 3T3-L1 脂肪细胞 TNF- α 分泌的影响:以不同浓度牛 TSH 刺激脂肪细胞,结果显示,随着 TSH 刺激浓度的增加,TNF- α 水平呈上升趋势,差异有统计学意义(341.85 \pm 12.00 对 411.08 \pm 12.03,431.51 \pm 30.10,522.67 \pm 36.22, $P<0.05$ 或 $P<0.01$),而 H89 可以抑制这一效应(326.71 \pm 43.23 对 341.85 \pm 12.00, $P>0.05$)。

6. TSH 对 3T3-L1 脂肪细胞 NF- κ B p65 蛋白表达的影响:以不同浓度牛 TSH 刺激脂肪细胞,Western 印迹法检测 NF- κ B p65 水平,结果显示,与空白对照组相比,NF- κ B p65 水平呈上升趋势,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图 1)。H89 同样抑制上述效应(0.36 \pm 0.03 对 0.22 \pm 0.09, $P>0.05$)。



注:与对照组相比,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与 0.01 和 0.1 mIU/ml TSH 组相比,^c $P<0.01$

图 1 TSH 对 3T3-L1 脂肪细胞 NF- κ Bp65 蛋白表达的影响

三、讨论

大量的研究发现血清 TSH 与胰岛素抵抗的发生相关^[5,6]。

本课题前期研究显示,高血糖可能通过蛋白非酶糖基化通路造成 2 型糖尿病大鼠甲状腺功能呈下降趋势,反馈调节血清 TSH 水平和甲状腺滤泡上皮细胞 TSHR 表达增高^[7]。但 2 型糖尿病状态下,升高的血清 TSH 及脂肪组织 TSHR 相互结合后,是否进一步参与胰岛素抵抗的发生尚未见报道。

本研究发现,糖尿病大鼠血清 TSH 水平及附睾脂肪组织 TSHR 蛋白表达水平均高于正常对照组,且血清 TSH 水平与附睾脂肪组织 NF- κ B p65、TNF- α 蛋白表达水平正相关,与胰岛素敏感指数呈负相关。众所周知,TNF- α 是导致胰岛素抵抗的重要因素,脂肪细胞分泌 TNF- α ,通过多种途径影响胰岛素信号转导,而 NF- κ B 参与调控多种炎症因子的基因表达,NF- κ B 活化后与细胞核内的 κ B 位点结合,可增强 TNF- α 等基因的转录,使 TNF- α 等炎症因子产生和释放增多。本研究结果提示升高的血清 TSH 与相应增加的脂肪细胞膜上的 TSHR 结合后,有可能影响 NF- κ B、TNF- α 等调控环节,进而参与了胰岛素抵抗的发生^[8]。

生理状态下,TSH 与甲状腺滤泡细胞膜上 TSHR 结合后,经 G 蛋白介导,通过 cAMP 或二磷酸肌醇途径,产生相应的生物学效应。近年来,吕红彬等^[9]研究发现,以不同浓度的 TSH 刺激体外培养的脂肪细胞,随 TSH 浓度的升高,脂肪细胞释放 cAMP 和甘油浓度增加。本研究进一步以 3T3-L1 脂肪细胞为研究对象发现,TSH 刺激脂肪细胞 NF- κ B p65 蛋白表达及 TNF- α 分泌均呈剂量依赖性,而予以 PKA 抑制剂 H89,可以抑制 TSH 对 NF- κ B p65 蛋白表达及 TNF- α 分泌的促进作用。因此,本研究结果提示 TSH 与 3T3-L1 脂肪细胞表面 TSHR 结合后,有可能激活 cAMP-PKA 途径,活化 NF- κ B,活化的 NF- κ B 进入细胞核,形成环状结构与 NF- κ B DNA 元件结合,诱导 TNF- α 基因转录。TNF- α 是 NF- κ B 的重要诱导因子^[10],TNF- α 的表达增高又可以诱导 NF- κ B 激活,进而再次激活 NF- κ B,产生级联瀑布效应,有可能进一步参与胰岛素抵抗的发生。

但是,胰岛素抵抗和 2 型糖尿病发病机制复杂,本研究结果尚不能完全解释 TSH 在脂肪组织所发挥的作用及其机制。值得注意的是,TSH 在人体脂肪细胞所发挥的作用是不可忽视的因素之一,有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Sorisky A, Bell A, Gagnon A. TSH receptor in adipose cells. *Horm Metab Res*, 2000,32:468-474.
- [2] Crisp M, Starkey KJ, Lane C, et al. Adipogenesis in thyroid eye disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000,41:3249-3255.
- [3] Kawano K, Hirashima T, Mori S, et al. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes*, 1992,41:1422-1428.
- [4] 李光伟,胡英华,杨文英,等.胰岛素抵抗,胰岛素分泌功能对 2 型糖尿病发生的影响. *中华内科杂志*, 1998,37:600-604.

- [5] Gormez S, Demirkan A, Atalar F, et al. Adipose tissue gene expression of adiponectin, tumor necrosis factor- α and leptin in metabolic syndrome patients with coronary artery disease. *Intern Med*, 2011, 50:805-810.
- [6] Roos A, Bakker SJ, Links TP, et al. Thyroid function is associated with components of the metabolic syndrome in euthyroid subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92:491-496.
- [7] 张宏, 董如娇, 赵伟, 等. 终末糖基化终产物对糖尿病大鼠甲状腺组织的影响. *天津医药*, 2007, 35:758-760.
- [8] Vraskou Y, Roher N, Díaz M, et al. Direct involvement of tumor necrosis factor- α ; in the regulation of glucose uptake in rainbow trout muscle cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011, 300:R716-R723.
- [9] 吕红彬, 闫乃红, 罗清礼, 等. 促甲状腺素受体在 BALB/c 小鼠主要组织和器官的分布及其意义. *解剖学杂志*, 2006, 29:557-560.
- [10] Lee J, Lim KT. Expression of TNF- α and IL-6 in HMC-1 cells treated with bisphenol A is attenuated by plant-originating glycoprotein (75 kDa) by blocking p38 MAPK. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2010, 382:51-61.

(收稿日期:2012-09-12)

(本文编辑:陈文辉)

● 基础研究 ●

胆固醇酯转运蛋白对小鼠肝脏 SR-B1 基因表达的调控

郭雯 杨涛 付真真 孙妍 朱晓慧 高贝贝 周红文

【摘要】 研究胆固醇酯转运蛋白(CETP)对肝脏 B 族 I 型清道夫受体(SR-B1)基因表达的影响。结果表明 CETP 转基因小鼠血清中的总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇低于对照组,但肝脏内的 TC、胆固醇酯却高于对照组($P < 0.05$),而两组小鼠血清中的甘油三酯差异无统计学意义;CETP 转基因小鼠肝脏 SR-B1 mRNA 表达量均显著低于对照组($P < 0.05$)。

【关键词】 胆固醇酯转运蛋白;低密度脂蛋白受体;B 族 I 型清道夫受体

Cholesterol ester transfer protein regulates the hepatic SR-B1 mRNA expression in mice GUO Wen, YANG Tao, FU Zhen-zhen, SUN Yan, ZHU Xiao-hui, GAO Bei-bei, ZHOU Hong-wen. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China
Corresponding author: ZHOU Hong-wen, Email: drhongwenzhou@gmail.com

【Summary】 The effect of cholesterol ester transfer protein(CETP) on SR-B1 mRNA expression in mouse liver was investigated. The results demonstrated that CETP transgenic mice showed lower serum total cholesterol and high density lipoprotein-cholesterol levels but higher total cholesterol and cholesterol ester content in liver when compared with wild type mice($P < 0.05$). The expression of SR-B1 mRNA in liver of CETP transgenic mice was significantly lower as compared with the control group($P < 0.05$).

【Key words】 Cholesterol ester transfer protein; Low density lipoprotein receptor; Scavenger receptor class B type I

(Chin J Endocrinol Metab, 2013, 29: 259-260)

胆固醇酯转运蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)是一种疏水性糖蛋白,主要介导胆固醇酯(CE)和甘油三酯(TG)在高密度脂蛋白(HDL)和含 apoB 的脂蛋白[低密度脂蛋白(LDL)、极低密度脂蛋白(VLDL)]间的交换。CETP 能够促进胆固醇逆向转运,使得大量的胆固醇酯流向肝脏中被代谢,已有研究证实此代谢过程中肝脏中的 CE 增加后,CETP 转基因小鼠肝脏表面的 LDL 受体 mRNA 表达量减少^[1],那么与胆固醇逆向转运密切相关的肝脏 B 族 I 型清道夫受体(SR-B1)变化

如何?为此,本实验主要研究 CETP 转基因小鼠肝脏表面 SR-B1 基因表达情况。

一、材料和方法

1. 实验动物与试剂:NFR-CETP 转基因小鼠,雄性,SPF 级,由美国纽约州立大学下州医学中心 Dr. Jiang's Lab 赠送并引进,同窝野生型 C57BL/6J 小鼠,雄性,SPF 级,由南京大学模式动物研究所提供。小鼠血清总胆固醇(TC)试剂盒、TG 试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒均购于北京北化康泰临床试剂有限公司;Trizol、PrimeScript™ RT 试剂盒、SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒均购自大连 TaKaRa 公司。引物序列由上海英潍捷基贸易有限公司合成。

2. 小鼠血脂谱的测定:正常 C57BL/6J 小鼠 16 周龄($n=5$)为对照组;NFR-CETP Tg 小鼠 16 周龄($n=5$)为实验组。眼眶

DOI:10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2013.03.019

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170747);江苏省六大人

才高峰(2008-18D)

作者单位:210029 南京医科大学第一附属医院内分泌科

通信作者:周红文,Email: drhongwenzhou@gmail.com