

# 促甲状腺素通过促进 TNF- $\alpha$ 分泌下调 3T3-L1 脂肪细胞的 IRS-1 表达

张雅静 冯玲 赵伟 汤莎莎 张宏

**【摘要】** 转染促甲状腺素受体 (TSHR) shRNA 的 3T3-L1 脂肪细胞以牛促甲状腺素 (TSH) 刺激, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测培养基中肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 水平, Western 印迹法检测胰岛素受体底物 1 (IRS-1) 的蛋白表达, 免疫沉淀法检测 IRS-1 酪氨酸磷酸化。结果显示, 1 mIU/ml TSH 明显增加 3T3-L1 脂肪细胞 TNF- $\alpha$  分泌 [ (341.85  $\pm$  12.00 对 522.67  $\pm$  36.22) ng/L,  $P < 0.01$  ]; 随着 TSH 刺激浓度的增加, IRS-1 蛋白表达及其酪氨酸磷酸化明显降低 (均  $P < 0.01$  ), 而以 RNA 干扰下调 TSHR 后上述作用消失。另外, TNF- $\alpha$  拮抗剂 WP9QY 也可逆转 TSH 对 IRS-1 的下调作用。这些结果提示 TSH 与 3T3-L1 脂肪细胞表面 TSHR 结合后, 可能通过促进 TNF- $\alpha$  分泌进而下调 IRS-1 的表达及其酪氨酸磷酸化, 而参与胰岛素抵抗的发生。

**【关键词】** 胰岛素抵抗; 促甲状腺素; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 胰岛素受体底物 1; 小发夹 RNA

**Thyroid-stimulating hormone decreases insulin receptor substrate 1 expression via stimulating TNF- $\alpha$  secretion in 3T3-L1 adipocytes** Zhang Yajing, Feng Ling, Zhao Wei, Tang Shasha, Zhang Hong. Key Lab of Hormone and Development of Health Ministry, Research Institute of Endocrinology, the Metabolic Disease Hospital Affiliated to Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China  
Email: lianyajing@163.com

**【Summary】** 3T3-L1 adipocytes transfected with TSH receptor (TSHR) shRNA were incubated with bovine TSH. The concentration of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in culture medium was measured by enzyme linked immunosorbent assay. Protein level of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) was quantified by Western blotting. Tyrosine phosphorylation of IRS-1 was measured by immunoprecipitation. The results showed that 1 mIU/ml TSH significantly stimulated TNF- $\alpha$  release in 3T3-L1 adipocytes [ (341.85  $\pm$  12.00 vs 522.67  $\pm$  36.22) ng/L,  $P < 0.01$  ], along with the decreases in IRS-1 protein expression and its tyrosine phosphorylation ( $P < 0.01$ ). These effects disappeared when TSHR expression was down-regulated with RNA interference in 3T3-L1 adipocytes. In addition, WP9QY, a TNF- $\alpha$  antagonist, blocked TSH-decreased IRS-1 expression. These results suggest that TSH down-regulates IRS-1 protein expression and its tyrosine phosphorylation through stimulating production of TNF- $\alpha$ , and thus contributes to the development of insulin resistance.

**【Key words】** Insulin resistance; Thyrotropic-stimulating hormone; Tumor necrosis factor-alpha; Insulin receptor substrate 1; Small hairpin RNA

(Chin J Endocrinol Metab, 2014, 30: 65-68)

近年来,大量的研究表明,脂肪组织不仅是能量储存场所,而且是一个重要的内分泌器官<sup>[1]</sup>,能分泌多种生物活性物质包括肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 6 (IL-6)、抵抗素等影响胰岛素的敏感性。且亦有研究发现<sup>[2,3]</sup>,在脂肪细胞表面同样存在功能性促甲状腺素受体 (TSHR) 表达,促甲状腺素 (TSH) 是否参与脂肪细胞分泌促炎症因子,进而在胰岛素抵抗的发生中发挥作用,尚鲜见报道。本研究选用目前较为广泛应用于胰岛素抵抗研究的 3T3-L1 脂肪细胞株,通过研究 TSH 与脂肪细胞表面 TSHR 结合后是否通过促进脂肪细胞分泌

TNF- $\alpha$ , 进而下调胰岛素受体底物 1 (IRS-1) 的蛋白表达及酪氨酸磷酸化,探讨 TSH 是否参与胰岛素抵抗的发生及可能机制。

## 一、材料和方法

1. 材料: 3T3-L1 前脂肪细胞株、DMEM 高糖培养基购于南京 KeyGNE 公司; 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、胰岛素、地塞米松、油红 O、牛 TSH 购于美国 Sigma 公司; TNF- $\alpha$  拮抗剂 WP9QY 购于美国 Santa cruz 公司; Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 购于美国 Invitrogen 公司; 高纯质粒抽提试剂盒购于北京 TIANGEN 公司; 小鼠 TNF- $\alpha$  酶联免疫检测试剂盒购于美国 R&D systems 公司; 小鼠单克隆 IRS-1 抗体、IRS-1 酪氨酸磷酸化抗体——抗 Phospho-cdc2 (Tyr15) 兔单克隆抗体、Protein A+G 琼脂糖购于碧云天生物技术研究所。 $\beta$ -tubulin 抗体购于天津三箭生物技术公司; 辣根过氧化物酶标记的二抗均购于北京中山金桥生物技术有限公司; 增强化学发光 (ECL) 试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2014.01.017

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目 (10JCZDJ19900); 天津医科大学科学基金 (2011KY25)

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

Email: lianyajing@163.com

2. 方法: (1) 3T3-L1 前脂肪细胞培养和诱导分化: 将细胞以  $1.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$  细胞密度接种于细胞培养瓶, 并以含 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养基, 置于  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱进行培养。每 48 h 更换 1 次培养基, 约 3~4 d 细胞生长至培养瓶底 60%~70% 汇合时, 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 高糖培养基培养 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。(2) 实验分组: 将细胞分为 3T3-L1 脂肪细胞组、TSHR shRNA 组、TNF- $\alpha$  拮抗剂组 ( $10 \mu\text{mol/L}$  WP9QY 预处理 15 min)。检测不同浓度牛 TSH 刺激 4 h 后培养基中 TNF- $\alpha$  水平, 24 h 后检测 IRS-1 的蛋白及其酪氨酸磷酸化水平。实验前诱导成熟的脂肪细胞在无血清 DMEM 培养基中过夜, 在干预之前, 予以  $100 \text{ nmol/L}$  胰岛素孵育 10 min, 实验重复进行 3 次。(3) TNF- $\alpha$  浓度的测定: 按照试剂盒说明, 取培养基上清, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 TNF- $\alpha$  浓度。(4) TSHR shRNA 转染: TSHR shRNA 重组表达质粒基因序列为 5'-CTGACCTGACCAAAGTTTA-3', 随机打乱 19 个碱基顺序作为阴性对照组。挑取少量 TSHR-shRNA 重组表达质粒菌种, 参照高纯质粒抽提试剂盒说明书提取质粒, 取 4  $\mu\text{g}$  质粒、10  $\mu\text{l}$  Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 稀释、混匀、室温孵育 20 min 转染 3T3-L1 脂肪细胞 12、24 和 48 h 后 Western 印迹法检测转染效果。(5) Western 印迹法检测 IRS-1 蛋白水平: RIPA 裂解液裂解贴壁的 3T3-L1 脂肪细胞, 提取总蛋白, BCA 法测定蛋白含量, 等量上样进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭、抗体孵育、ECL 法显示蛋白条带。(6) 免疫沉淀法 (Immunoprecipitation, IP) 检测 IRS-1 酪氨酸磷酸化水平: RIPA 裂解液裂解贴壁的 3T3-L1 脂肪细胞, 提取总蛋白, 取 200  $\mu\text{g}$  蛋白样品, 加入 2  $\mu\text{g}$  抗 Phospho-cdc2 (Tyr15) 兔单克隆抗体,  $4^\circ\text{C}$  缓慢摇动过夜, 再加入 20  $\mu\text{l}$  充分重悬的琼脂糖,  $4^\circ\text{C}$  缓慢摇动 3 h, 离心, 弃上清, PBS 洗涤, 上样进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。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, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 非正态分布的数据进行对数转化, 组间比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 二、结果

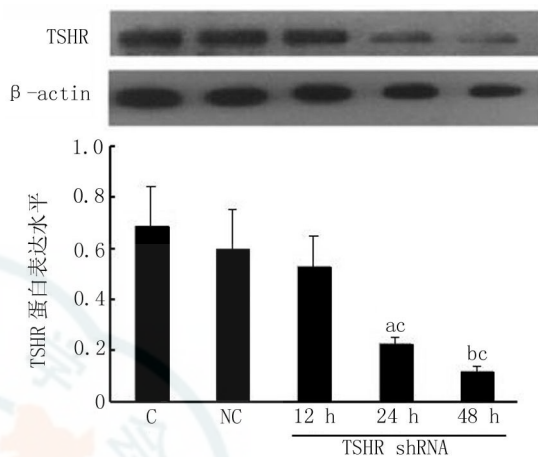
1. 3T3-L1 前脂肪细胞的培养及诱导分化: 小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞与成纤维细胞形态相似; 经油红 O 染色, 诱导分化成熟脂肪细胞胞浆内遍布亮红色颗粒, 苏木素复染后, 细胞核呈蓝色, 偏离细胞中央, 可用于实验。

2. TSHR shRNA 质粒转染: 荧光显微镜下观察质粒转染效率, 未转染的 3T3-L1 脂肪细胞作为正常对照组, 未发现绿色荧光颗粒出现, 即无增强的绿色荧光蛋白 (eGFP) 表达; 分别观察转染后 12、24 及 48 h 的 eGFP 表达情况, 同一显微镜视野下观察, 随转染时间的延长, eGFP 表达量逐渐增多, 转染 48 h 后效率最高。

进一步以 Western 印迹法验证 TSHR shRNA 转染成熟脂肪

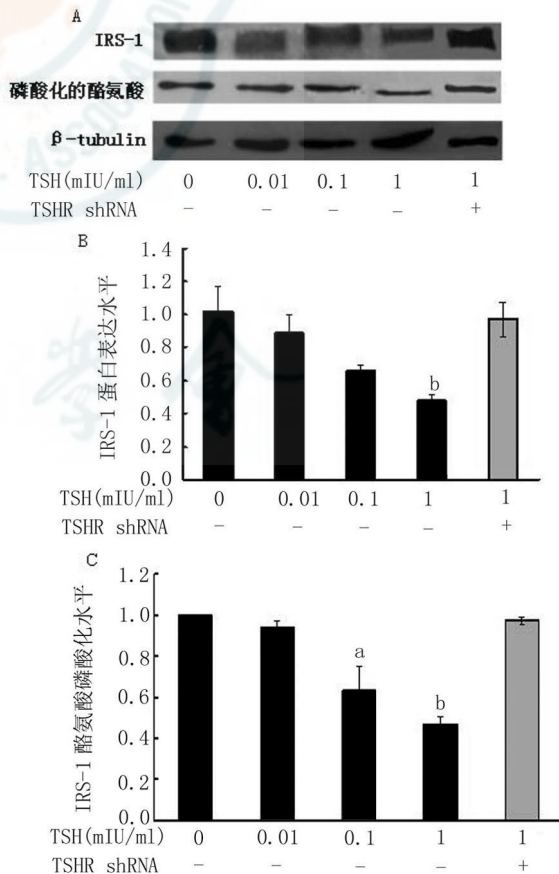
细胞后 TSHR 蛋白表达情况。与正常对照组 (C 组) 及阴性对照组 (NC 组) 相比, 转染 48 h 后 TSHR 蛋白表达减少最为明显, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ , 图 1)。

3. TSH 对 3T3-L1 脂肪细胞 TNF- $\alpha$  分泌的影响: 以 0.01、0.1 和 1 mIU/ml 牛 TSH 刺激诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞 4 h 后, 3T3-L1 脂肪细胞组培养基中的 TNF- $\alpha$  水平随 TSH 刺激



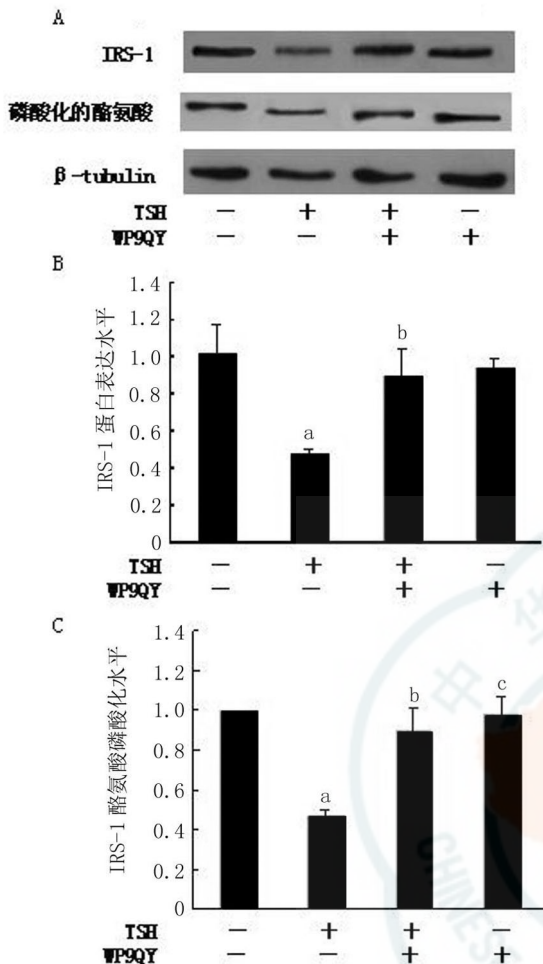
注: C: 正常对照组; NC: 阴性对照组; TSHR: 促甲状腺素受体; shRNA: 小发夹 RNA; 与 C 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与 NC 组相比, <sup>c</sup> $P < 0.05$

图 1 TSHR shRNA 下调 TSHR 的蛋白表达



注: TSHR: 促甲状腺素受体; IRS-1: 胰岛素受体底物 1; 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 2 下调 TSHR 表达对抗 TSH 降低的 IRS-1 蛋白表达及其酪氨酸磷酸化



注: IRS-1: 胰岛素受体底物 1; WP9QY: 肿瘤坏死因子  $\alpha$  拮抗剂; 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 TSH 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 3 WP9QY 逆转 TSH 降低的 IRS-1 蛋白表达及其酪氨酸磷酸化

浓度增加呈上升趋势, 差异有统计学意义 [ $(341.85 \pm 12.00$  对  $411.08 \pm 12.03, 431.51 \pm 30.10, 522.67 \pm 36.22)$  ng/L,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ], 而该作用不存在于 TSHR shRNA 转染后的脂肪细胞 [ $(339.62 \pm 14.39$  对  $347.00 \pm 21.67, 356.23 \pm 22.38, 368.50 \pm 26.11)$  ng/L,  $P > 0.05$ ].

4. TSH 对 3T3-L1 脂肪细胞 IRS-1 蛋白表达及其酪氨酸磷酸化的影响: 与空白对照组比较, 随着 TSH 刺激浓度的增加, IRS-1 蛋白表达及其酪氨酸磷酸化水平呈下降趋势, TSH 浓度增至 1 mIU/ml 时, 与对照组相比差异均有统计学意义 ( $0.48 \pm 0.03$  对  $1.02 \pm 0.26$ , 均  $P < 0.01$ , 图 2)。上述效应均未见于 TSHR shRNA 转染脂肪细胞组, 此变化趋势与 TNF- $\alpha$  变化趋势相反。WP9QY 可以逆转 TSH 对脂肪细胞 IRS-1 的抑制效应 (图 3)。

### 三、讨论

近年来, 大量的研究发现<sup>[4,6]</sup>, TSHR 不仅表达于甲状腺滤泡细胞表面, 亦表达于脂肪组织, 且血清 TSH 与胰岛素抵抗的发生相关。本课题前期研究同样发现<sup>[7]</sup>, 2 型糖尿病患者血清 TSH 水平显著高于正常人群 ( $P < 0.01$ ), 在 2 型糖尿病大鼠的研究中发现, 血清 TSH 水平与附睾脂肪组织核转录因子- $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65)、TNF- $\alpha$  蛋白表达水平正相关, 与胰岛素敏感

指数呈负相关<sup>[8]</sup>。脂肪组织为胰岛素作用的重要靶组织, 其分泌的 TNF- $\alpha$  等多种炎症因子在胰岛素抵抗发生中具有重要作用。TSH 是否参与脂肪细胞分泌 TNF- $\alpha$  等促炎症因子, 进而在胰岛素抵抗的发生中发挥作用, 尚少见报道。

在生理状态下, TSH 与甲状腺滤泡细胞膜上 TSHR 结合后, 经 G 蛋白介导, 通过环腺苷酸 (cAMP) 或二磷酸肌醇途径, 产生相应的生物学效应。本课题前期关于 TSH 在脂肪细胞的甲状腺以外效应的研究中发现<sup>[8,9]</sup>, TSH 可激活脂肪细胞 cAMP-蛋白激酶 A 信号途径, 活化 NF- $\kappa$ B, 诱导 TNF- $\alpha$  基因转录, 进而抑制葡萄糖转运蛋白 4 的蛋白表达及转位。为进一步探索 TSH 是否通过脂肪细胞表面 TSHR 介导而促进 TNF- $\alpha$  分泌, 本研究采用 TSHR shRNA 沉默脂肪细胞表面 TSHR, 结果显示, 随着 TSH 刺激浓度增加, 3T3-L1 脂肪细胞培养基中的 TNF- $\alpha$  水平呈上升趋势, 而下调 TSHR 后此作用消失, 提示 TSH 通过脂肪细胞表面 TSHR, 剂量依赖性地促进 TNF- $\alpha$  分泌。

众所周知, 胰岛素信号转导经由靶细胞膜上胰岛素受体 (IR) 介导, IRS-1 是 IR 下游第一个底物分子, 广泛分布于胰岛素敏感组织。IRS-1 通过自身酪氨酸磷酸化介导胰岛素信号转导, 磷酸化的 IRS-1 与磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3-K) 的 p85 调节亚单位结合, 催化 p110 而激活 PI3-K, 进一步使蛋白激酶 B 的丝氨酸残基磷酸化, 从而导致 GLUT4 从胞浆转位至细胞膜, 促进葡萄糖的摄取、利用。组织细胞内 IRS-1 蛋白水平、结构、功能状态 (酪氨酸磷酸化) 是胰岛素信号转导的基础, 当 IRS-1 浓度降低或结构、活性异常, 均可导致胰岛素信号转导阻滞, 进而导致胰岛素抵抗的发生<sup>[10]</sup>。

TNF- $\alpha$  是导致胰岛素抵抗的重要因素之一, 脂肪细胞分泌的 TNF- $\alpha$  通过多种途径影响胰岛素信号转导<sup>[11]</sup>。有研究表明<sup>[12]</sup>, TNF- $\alpha$  抑制 IRS-1 酪氨酸磷酸化的可能机制包括 IRS-1 降解加速和 IRS-1 蛋白上的丝氨酸残基磷酸化反馈抑制酪氨酸磷酸化。近年来, 有研究表明<sup>[13]</sup>, TNF- $\alpha$  能够有效抑制胰岛素敏感细胞 IR 的酪氨酸蛋白激酶的催化活性, 影响脂肪细胞胰岛素受体水平或抑制其自身酪氨酸磷酸化。

与 Shen 等<sup>[13]</sup>的研究不同, 本研究检测不同浓度 TSH 刺激 3T3-L1 脂肪细胞发现, 随着 TSH 刺激浓度的增加, 3T3-L1 细胞 IRS-1 蛋白表达水平及酪氨酸磷酸化均呈下降趋势, 但仅当 TSH 浓度增至 1 mIU/ml 时, IRS-1 蛋白水平较对照组及 0.01 mIU/ml TSH 组明显降低, 而当 TSH 浓度增至 0.1 mIU/ml 时 IRS-1 酪氨酸磷酸化水平即已较对照组明显降低, 提示当 TSH 刺激 TNF- $\alpha$  分泌浓度较高时, 可下调 IRS-1 蛋白的表达, 而较小剂量的 TSH 促进脂肪细胞分泌较低浓度的 TNF- $\alpha$  时即可抑制 IRS-1 酪氨酸磷酸化。IRS-1 的上述变化趋势与 TNF- $\alpha$  分泌趋势相反。进一步予以 TNF- $\alpha$  拮抗剂——WP9QY 干预后显示, WP9QY 可以逆转 TSH 对 IRS-1 的抑制作用。因此, 本研究结果提示 TSH 与脂肪细胞表面 TSHR 结合后, 可能通过促进脂肪细胞分泌 TNF- $\alpha$  进而下调 IRS-1 的表达, 并干扰 IRS-1 正常的酪氨酸磷酸化, 抑制胰岛素的 PI3K 信号通路, 导致 GLUT4 的表达和胞膜转位下调<sup>[9,14]</sup>, 进而参与胰岛素抵抗的发生。

总之, 本研究为胰岛素抵抗发生机制的研究提供了新思路, 临床上合理调控血清 TSH 水平, 可能有助于胰岛素抵抗及

2 型糖尿病的防治。但胰岛素抵抗发病机制复杂,本研究仅选用 3T3-L1 脂肪细胞株体外培养进行研究,不能完全模拟人体内环境,不能完全解释 TSH 在机体内脂肪组织的甲状腺以外效应,有待于在今后研究中进一步完善。

### 参 考 文 献

- [1] Ahima RS. Adipose tissue as an endocrine organ [J]. *Obesity*, 2006, 14:242-249.
- [2] Sorisky A, Bell A, Gagnon A. TSH receptor in adipose cells [J]. *Horm Metab Res*, 2000, 32:468-474.
- [3] Crisp M, Starkey KJ, Lane C, et al. Adipogenesis in thyroid eye disease [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000, 41:3249-3255.
- [4] Gormez S, Demirkan A, Atalar F, et al. Adipose tissue gene expression of adiponectin, tumor necrosis factor- $\alpha$  and leptin in metabolic syndrome patients with coronary artery disease [J]. *Intern Med*, 2011, 50:805-810.
- [5] Lai Y, Wang J, Jiang F, et al. The relationship between serum thyrotropin and components of metabolic syndrome [J]. *Endocr J*, 2011, 58:23-30.
- [6] Lu S, Guan Q, Liu Y, et al. Role of extrathyroidal TSHR expression in adipocyte differentiation and its association with obesity [J]. *Lipids Health Dis*, 2012, 11:17.
- [7] 张宏, 方佩华, 郑凝, 等. 住院 2 型糖尿病患者甲状腺功能状态的分析 [J]. *国际内分泌代谢杂志*, 2007, 27:139-141.
- [8] 张雅静, 赵伟, 张宏, 等. TSH 与脂肪细胞 NF- $\kappa$ B、TNF- $\alpha$  蛋白水平相关性的研究 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2013, 29:74-76.
- [9] 张雅静, 赵伟, 张宏, 等. 促甲状腺激素受体对 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖转运体 4 表达的抑制作用 [J]. *中华老年医学杂志*, 2013, 32:219-223.
- [10] Hemi R, Yochananov Y, Barhod E, et al. p38 Mitogen-activated protein kinase-dependent transactivation of ErbB receptor family a novel common mechanism for stress-induced IRS-1 serine phosphorylation and insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2011, 60:1134-1145.
- [11] Dfiaz-Delfin J, Hondares E, Iglesias R, et al. TNF- $\alpha$  represses  $\beta$ -Klotho expression and impairs FGF21 action in adipose cells: involvement of JNK1 in the FGF21 pathway [J]. *Endocrinology*, 2012, 153:4238-4245.
- [12] Hotamisligil GS. Mechanisms of TNF-alpha-insulin resistance [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1999, 107:119-125.
- [13] Shen SC, Chang WC, Chang CL. Fraction from wax apple [syzygium samarangense (blume) merrill and perry] fruit extract ameliorates insulin resistance via modulating insulin signaling and inflammation pathway in tumor necrosis factor  $\alpha$ -treated FL83B mouse hepatocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13:8562-8577.
- [14] Im SS, Kwon SK, Kim TH, et al. Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes [J]. *IUBMB Life*, 2007, 59:134-145.

(收稿日期:2013-05-21)  
(本文编辑:周丽斌)

CHINESE MEDICAL ASSOCIATION  
1915  
中华医学学会