

黄芪多糖对脂肪细胞释放肿瘤坏死因子- α 及白细胞介素-6 的影响

刘 琼,翁孝刚

(新乡医学院 第一临床学院内分泌科,河南 新乡 453003)

摘 要:目的:探讨黄芪多糖对脂肪细胞释放肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)的抑制作用及机制.方法 由 3T3-L1 细胞诱导分化成熟的脂肪细胞随机分为实验组和对照组.实验组脂肪细胞以 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芪多糖培养基干预,对照组脂肪细胞普通培养基培养.ELISA 法测两组脂肪细胞及培养基中 TNF- α 、IL-6 蛋白的含量,及逆转录-聚合酶链反应检测两组脂肪细胞 TNF- α 蛋白和 IL-6 蛋白 mRNA 水平.结果 实验组脂肪细胞及培养基中 TNF- α 、IL-6 蛋白的含量低于对照组($P=0.000$),而且实验组脂肪细胞 TNF- α 蛋白和 IL-6 蛋白 mRNA 水平低于对照组($P=0.000$).结论:黄芪多糖可抑制脂肪细胞释放炎症细胞因子,控制脂肪组织的慢性炎症反应.

关键词:黄芪多糖;脂肪细胞;肿瘤坏死因子- α ;白介素-6

中图分类号:Q455;R965

文献标志码:A

脂肪组织结构包含脂肪细胞、免疫反应细胞及毛细血管,脂肪细胞作为一种高度分化的细胞,不仅可以储存和释放能量,而且可分泌白介素类、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor alpha, TNF- α)等炎症细胞因子,免疫反应细胞如巨噬细胞、中性粒细胞等被激活也可释放炎症细胞因子,而毛细血管内皮细胞可释放细胞趋化因子,趋化炎症细胞浸润,继发激活炎症因子的表达,白介素-6(Interleukin-6, IL-6)即是其中重要的一种促炎性细胞因子.脂肪组织是肥胖所致的慢性炎症反应的主要起始部位,表现出脂肪细胞体积增大并伴随细胞数目增多、脂肪组织内大量巨噬细胞浸润等病理表现,而巨噬细胞激活和趋化可以激活炎症信号转导通路,介导胰岛素受体的异常,导致胰岛素抵抗所致的 2 型糖尿病(Type 2 diabetic mellitus, T2DM)^[1,2].因此降低脂肪细胞释放炎症因子,阻断脂肪组织内炎症细胞的浸润,有效控制脂肪组织的慢性炎症反应,是目前对于 T2DM 干预相关基础研究的热点.黄芪多糖(Astragalus polysaccharides, APS)是黄芪的有效成分,具有消炎镇痛、抗自由基、强心利尿、提高机体抵抗力等多种药理作用^[3-4].

本研究以 3T3-L1 细胞株培养分化诱导的脂肪细胞为研究对象,考察黄芪多糖干预与否对脂肪细胞释放的 TNF- α 、IL-6 影响,探讨黄芪多糖是否干预脂肪细胞的炎症反应及探索其机制.

1 材料与方 法

1.1 细胞与试剂

3T3-L1 前脂肪细胞株购于中国科学院上海生命科学研究院,DMEM 高糖培养液、胎牛血清和胰酶购自 HyClone 公司,地塞米松购于美国 Sigma 公司,TNF- α 和 IL-6 酶联检测试剂盒购于北京博奥森生物技术有限公司,RT-PCR 试剂盒购于北京 Invitrogen 公司,注射用黄芪多糖(250 mg/支,批号:8K01101)购于美国泛华公司北京代表处,黄芪多糖以 10%胎牛血清的 DMEM 培养基稀释至 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 备用(简称黄芪多糖培

收稿日期:2015-02-01

基金项目:河南省科技厅资助项目(072300450370);2013 年度新乡医学院研究生科研创新支持计划项目.

作者简介:刘 琼(1989-),女,河南西平人,新乡医学院硕士研究生,研究方向:巨噬细胞向脂肪细胞趋化及活化的干预,

E-mail:liuqiong0076@163.com.

通信作者:翁孝刚(1965-),新乡医学院教授,博士,研究方向为糖尿病的基础与临床研究,E-mail:wengxiaogang@aliyun.com.

培养基). 引物序列和目的片段: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 上游引物序列为 5'-AACGACCGCTTCATTGAC-3', 下游引物序列为 5'-TCGACGATACTCAGCAC-3', 扩增片段长度为 191 bp; TNF- α 上游引物序列为 5'-CCACGTCGTAGCAAACCAC-3', 下游引物序列为 5'-GGAGTAGACAAGGTACAACCCA-3', 扩增片段长度为 139 bp; IL-6 上游引物序列为 5'-CCG-GAGAGGAGACTTCACAG-3', 下游引物序列为 5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3', 扩增片段长度为 134 bp.

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养诱导分化

3T3-L1 前脂肪细胞以 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 每 2 d 换液 1 次, 细胞生长至完全融合后 2 d 开始诱导分化. 以含 10% 胎牛血清 0.5 mmol · L⁻¹ IBMX、10 g · mL⁻¹ 胰岛素和 0.25 mol · L⁻¹ 地塞米松的 DMEM 培养基培养 3 d, 然后以含 10 g · mL⁻¹ 胰岛素及 10% 胎牛血清 DMEM 培养基培养 3 d, 然后再换用仅含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养, 每 2 d 换液 1 次, 8 d 后 90% 的细胞呈现脂肪细胞表型, 10~12 d 分化为成熟脂肪细胞, 即可用于实验.

1.2.2 细胞分组及处理

采用数字随机法将脂肪细胞分为黄芪组和对照组两组. 黄芪组: 脂肪细胞以黄芪多糖培养基培养 2 h; 对照组: 脂肪细胞以 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 2 h.

1.2.3 ELISA 实验

1.2.3.1 培养液 ELISA 实验 分别收集两组脂肪细胞的培养液各 5 mL, 1 500 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 配制标准品、加样、室温温育 120 min、洗板、显色液室温温育 20 min、终止显色, 混匀 30 s, 酶标仪在波长 490 nm 处读出光密度(OD)值, 以 OD 值为纵坐标, 以标准品浓度为横坐标, 使用 curxpt 软件绘制标准曲线, 计算各组培养液中 TNF- α 蛋白和 IL-6 蛋白的含量.

1.2.3.2 细胞 ELISA 实验 胰酶消化培养瓶中的细胞, 收集并计数, 1 500 r · min⁻¹ 离心 10 min, 完全培养基调整细胞悬液浓度至 2×10^5 mL⁻¹, 种植于 96 孔板上, 100 μ L · 孔⁻¹, 37 °C 孵育过夜, PBS 洗板两次, 每孔加 125 μ L 10% 福尔马林缓冲液于室温环境下固定 15 min, 双蒸水洗两次, 每孔加 250 μ L 含 2% BSA 的 PBS 37 °C 孵育 1 h, 双蒸水洗两次, 每孔加 250 μ L 含 1% BSA 的 PBS 37 °C 孵育 1 h, 双蒸水洗三次, 碳酸盐缓冲液洗两次, 每孔加工作浓度底物液 50 μ L, 室温孵育 20 min, 每孔加 4.5 N 硫酸溶液 25 μ L, 酶标仪测波长 490 nm 处光密度值, 分别以标准品浓度为横坐标、光密度值为纵坐标, 并以 curxpt 软件绘制标准曲线, 计算细胞中 TNF- α 蛋白和 IL-6 蛋白的含量.

1.2.4 逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction

RT-PCR) Trizol 一步法分别提取两组脂肪细胞的总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 采用 RT-PCR 试剂盒配制 20 μ L 反应体系, 检测 TNF- α 蛋白和 IL-6 蛋白的 mRNA 表达. 反应条件为: 90 °C, 30 s, 90 °C, 30 s, 55 °C, 30 s, 72 °C, 50 s, 72 °C 5 min, 共 30 个循环. 以 GAPDH 为内参照, PCR 反应条件和反应体系同上. 通过 Bandleader 3.0 软件分析 PCR 目的条带与内参照条带的灰度比值.

1.3 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS13.0 软件处理数据, 采用 *t* 检验进行统计学分析. 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 两组细胞培养液中 TNF- α 蛋白和 IL-6 蛋白的含量

黄芪多糖干预的实验组脂肪细胞培养液中 TNF- α 蛋白含量低于无黄芪多糖干预的对照组($t = 10.016$, $P = 0.000$), 且 IL-6 蛋白含量低于也低于对照组($t = 19.215$, $P = 0.000$). 结果具有统计学意义, 见表 1.

2.2 两组脂肪细胞 TNF- α 蛋白和 IL-6 蛋白的含量

黄芪多糖干预的实验组脂肪细胞中 TNF- α 蛋白含量低于无黄芪多糖干预的对照组($t = 10.016$, $P = 0.000$), 且 IL-6 蛋白含量低于也低于对照组($t = 19.215$, $P = 0.000$). 结果具有统计学意义, 见表 2.

表 1 两组培养液中 TNF- α 和 IL-6 含量的比较($x \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

组别	TNF- α	IL-6	<i>t</i>	<i>P</i>
实验组	47.83 \pm 7.22	24.73 \pm 3.02	9.625*	0.000*
对照组	52.37 \pm 11.06	29.75 \pm 4.28	8.204**	0.000**

* 两组 TNF- α 蛋白含量比较; ** 两组 IL-6 蛋白含量比较.

表 2 两组脂肪细胞 TNF- α 和 IL-6 含量的比较($x \pm s, \text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

组别	TNF- α	IL-6	<i>t</i>	<i>P</i>
实验组	106.24 \pm 16.15	128.12 \pm 7.29	10.016 [△]	0.000 [△]
对照组	189.49 \pm 11.27	207.34 \pm 10.57	19.215 ^{△△}	0.000

[△] 两组 TNF- α 蛋白含量比较; ^{△△} 两组 IL-6 蛋白含量比较.

2.3 两组脂肪细胞 TNF- α 蛋白和 IL-6 蛋白 mRNA 表达

通过 RT-PCR 检测两组脂肪细胞 TNF- α 蛋白和 IL-6 蛋白 mRNA 水平,以 GAPDH 为内参照,结果显示:实验组 TNF- α 蛋白 mRNA 表达低于对照组($t=18.062, P=0.000$),实验组 IL-6 蛋白 mRNA 表达低于对照组($t=14.217, P=0.000$).结果具有统计学意义,见图 1、表 3.

表 3 两组脂肪细胞 TNF- α 蛋白和 IL-6 蛋白 mRNA 表达比较

组别	灰度比值	<i>t</i>	<i>P</i>
TNF- α	实验组	0.281 \pm 0.026	18.062 [▲] 0.000 [▲]
	对照组	0.338 \pm 0.012	
IL-6	实验组	0.274 \pm 0.034	14.217 ^{▲▲} 0.001 ^{▲▲}
	对照组	0.315 \pm 0.013	

[▲] TNF- α mRNA 两组比较; ^{▲▲} IL-6 蛋白 mRNA 两组比较.

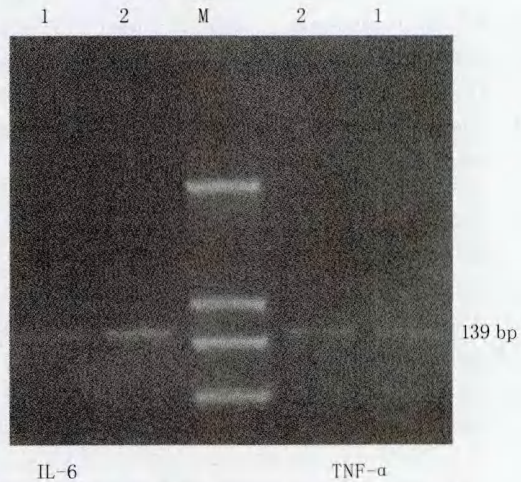


图 1 两组脂肪细胞 TNF- α 蛋白和 IL-6 蛋白 mRNA 水平 RT-PCR 方法检测结果

3 讨 论

脂肪组织不仅是脂肪储存蓄积的场所,在维持能量平衡及内环境稳定、物质代谢及转运等方面起着重要的作用,而且脂肪组织还是一个重要内分泌场所,参与免疫应答、内分泌的调节等生理过程.脂肪组织与糖尿病及其并发症的发生发展密切相关.

TNF- α 可由多种炎症细胞合成和分泌,脂肪细胞也是其重要来源.研究表明脂肪组织局部 TNF- α 高表达可改变胰岛素受体和胰岛素受体底物-1 结合干扰胰岛素信号转导,引起胰岛素抵抗(insulin resistance, IR),引起糖代谢紊乱,是 T2DM 发病关系密切的原因之一.在动物实验研究中表明在小鼠的脂肪细胞中 TNF- α 可通过以下两条途径引发 IR:减少葡萄糖转运体 4 的表达以及脂蛋白酯酶的活性导致 IR;使 SOCS-3 的表达升高,从而阻断了胰岛素信号通路,导致 IR.肥胖引起慢性炎症反应是 T2DM 的发病机制之一^[5-6].而且 TNF- α 作为炎症级联反应的始动因子,在脂肪细胞中 TNF- α 通过 JNK 和 IKK β /NF- κ B 通路达到一种慢性低级炎症的状态,进而促进脂肪细胞释放其他炎症因子,比如白介素类的释放^[7-10].IL-6 是一个多效能的细胞炎症因子,由免疫细胞、肌肉细胞、脂肪细胞等合成分泌促进,可促进 β 细胞增生分化和抗体分泌,介导炎症反应.高胰岛素-正葡萄糖钳夹技术证实,血清 IL-6 水平下降可增加机体对胰岛素的敏感性即血清 IL-6 增多,可造成高胰岛素血症产生 IR,导致糖代谢紊乱^[11-14].

在本研究结果中显示由 3T3-L1 细胞诱导分化成熟的脂肪细胞培养液和细胞 TNF- α 表达高于由黄芪多糖干预的培养液和细胞 TNF- α 表达,提示黄芪多糖可以下调脂肪细胞的 TNF- α 表达,减轻继发的炎症细胞因子的释放,减轻慢性炎症反应的发生.而在本研究关于 IL-6 的结果,也证实了 TNF- α 始动的 IL-6 释放在黄芪多糖的干预下减少(见表 1,表 2).RT-PCR mRNA 检测结果也表明有黄芪多糖干预的脂肪细胞 TNF- α 蛋白和 IL-6 蛋白的 mRNA 水平低于无干预的脂肪细胞,进一步从蛋白表达水平证实了黄芪多糖对

脂肪细胞的炎症因子的释放有抑制作用。

综上所述,本研究认为黄芪多糖可以抑制脂肪细胞释放炎症细胞因子,减轻脂肪组织的炎症因子的级联激活,可控制脂肪组织的慢性炎症反应。

参 考 文 献

- [1] McGarry J D. Dysregulation of fattyacid metabolism in the etiology of t ype 2 diabetes[J]. Diabetes,2001,50(2):6-7.
- [2] Taskinen M R. Diabetic dys lipidaemia; from basic research to clinical practice[J]. Diabetologia,2003,46:733-743.
- [3] 李飞飞,沈建平,庄海峰. 黄芪多糖对免疫作用的研究进展[J]. 医学综述,2012,18(4):1227-1229.
- [4] 王 健,龚兴国. 多糖的抗肿瘤及免疫调节进展[J]. 中国生化药物杂志,2011,22(1):52-54.
- [5] Wu T, Ma J, Bound M J, et al. Effects of sitagliptin on glycemia, incretin hormones, and antropyloroduodenal motility in response to intraduodenal glucose infusion in healthy lean and obese humans and patients with type 2 diabetes treated with or without metformin[J]. Diabetes,2014,63(8):2776-87.
- [6] Schellenberg E S, Dryden D M, Vandermeer B, et al. Lifestyle interventions for patients with and at risk for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis[J]. Annals of Internal Medicine,2013,159(8):543-551.
- [7] Figgett W A, Vincent F B, Saulep-Easton D, et al. Roles of ligands from the TNF superfamily in B cell development, function, and regulation[J]. Seminars in Immunology,2014,26(3):191-202.
- [8] Waters J P, Pober J S, Bradley J R. Tumour necrosis factor and cancer[J]. Journal of Pathology,2013,230(3):241-248.
- [9] Croft M, Duan W, Choi H, et al. TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights[J]. Trends in Immunology,33(3):144-152.
- [10] Bach E, Nielsen R R, Vendelbo M H, et al. Direct effects of TNF-alpha on local fuel metabolism and cytokine levels in the placebo-controlled, bilaterally infused human leg: increased insulin sensitivity, increased net protein breakdown, and increased IL-6 release[J]. Diabetes,2013,62(12):4023-9.
- [11] Nishimoto N. Interleukin-6 as a therapeutic target in candidate inflammatory diseases[J]. Clinical Pharmacology & Therapeutics,2010,87(4):483-487.
- [12] Tanaka T, Kishimoto T. The biology and medical implications of interleukin-6[J]. Cancer Immunology Research,2014(4):288-294.
- [13] Matthews VB, Allen TL, Risis S, et al. Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance[J]. Diabetologia,2010;53:2431-41.
- [14] Franckhauser S, Elias I, Rotter Sopsakis V, et al. Overexpression of IL-6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice[J]. Diabetologia,2008,51:1306-1316.

Effect of Astragaloside on Lipocyte Secreting Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6

LIU Qiong, WENG Xiaogang

(Department of Endocrinology, The First Clinical College of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Objective: To explore the inhibition of astragaloside (APS) on secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6). Methods: 3T3-L1 preadipocytes was cultured and induced into mature adipocytes. These adipocytes were then divided into experiment group and control group. Adipocytes were treated with $0.1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ APS in experiment group, but control group adipocytes were cultured normally. The TNF- α and IL-6 contents in the cultured supernatant and these adipocytes two groups were determined by ELISA method, and the two proteins' mRNA were adipocytes by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). All datas were analysed by one-samples test. Results: The TNF- α and IL-6 contents in the cultured supernatant and adipocytes in experiment group were significantly lower than control group, and the levels of two proteins' mRNA in experiment group were also significantly lower than control group. These results show statistical significance ($P < 0.05$). Conclusion: APS has the inhibitory effect on secretion inflammatory cytokines from adipocytes, so control chronic inflammation of adipose tissue.

Keywords: astragaloside; adipocytes; tumor necrosis factor alpha; interleukin-6