

文章编号 1006-8147(2014)01-0001-03

论著

肥胖和缺氧对小鼠原代脂肪细胞分泌 $\text{TNF}\alpha$ 的影响

马晓芳, 童静凯, 牛文彦

(天津医科大学免疫学系, 天津 300070)

摘要 目的: 常氧和缺氧培养正常和肥胖小鼠的原代脂肪细胞, 比较其分泌的肿瘤坏死因子 α ($\text{TNF}\alpha$) 水平, 探讨缺氧在脂肪组织慢性炎症中的作用。方法: 高脂及普通饮食喂养 4 周龄 C57BL/6 雄性小鼠 16 周, 测量体质量、葡萄糖耐量、胰岛素耐量; 处死小鼠后取睾周脂肪组织, 提取原代脂肪细胞, 常氧或缺氧培养 24 h 后取上清, ELISA 法测定培养基中 $\text{TNF}\alpha$ 的浓度。结果: 高脂饮食喂养造成小鼠肥胖和胰岛素抵抗。常氧培养的肥胖小鼠脂肪细胞较正常小鼠的脂肪细胞分泌更多的 $\text{TNF}\alpha$; 缺氧孵育比常氧孵育的正常小鼠脂肪细胞分泌更多的 $\text{TNF}\alpha$; 但缺氧不进一步增加肥胖小鼠脂肪细胞分泌 $\text{TNF}\alpha$ 。结论: 缺氧和肥胖均上调小鼠原代脂肪细胞 $\text{TNF}\alpha$ 的分泌, 但缺氧不影响肥胖小鼠脂肪细胞分泌 $\text{TNF}\alpha$, 提示肥胖小鼠脂肪细胞缺氧与其慢性炎症及胰岛素抵抗有关。

关键词 肥胖; 脂肪细胞; 缺氧; 肿瘤坏死因子 α ; 炎症; 胰岛素抵抗; 小鼠

中图分类号 R398

文献标志码 A

Effect of obesity and hypoxia on $\text{TNF}\alpha$ secretion by primary adipocytes in mice

MA Xiao-fang, TONG Jing-kai, NIU Wen-yan

(Department of Immunology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To explore the effect of hypoxia on adipose tissue inflammation by culturing primary adipocytes from lean and obese mice under normoxia or hypoxia condition and measuring the $\text{TNF}\alpha$ levels in the culture medium (conditioned medium, CM). **Methods:** 4-week old C57BL/6 male mice were fed with high fat diet (HFD) or chow diet (LFD) for 16 weeks, then body weight, intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) and insulin tolerance test (ITT) were performed. The epididymal fat pads were taken and primary adipocytes were isolated and cultured under normoxic or hypoxic condition for 24 h. The levels of tumor necrosis factor- α ($\text{TNF}\alpha$) in CMs were determined by ELISA. **Results:** HFD increased body weight and caused insulin resistance. Adipocytes in obese mice secreted higher level of $\text{TNF}\alpha$ than normal mice. Hypoxia treatment increased the level of $\text{TNF}\alpha$ secreted by adipocytes in normal mice. However, hypoxia did not affect $\text{TNF}\alpha$ secretion in obese mice. **Conclusion:** Both hypoxia and obese up-regulate $\text{TNF}\alpha$ secretion from murine primary adipocytes, but hypoxia does not further increase $\text{TNF}\alpha$ secretion from adipocytes of obese mice.

Key words obesity; adipocyte; hypoxia; $\text{TNF}\alpha$; inflammation; insulin resistance; mouse

糖尿病是一种常见的代谢性疾病, 表现为胰岛素抵抗^[1]。90%的糖尿病为 2 型糖尿病, 肥胖是造成 2 型糖尿病的主要原因, 其中以腹型肥胖与胰岛素抵抗关系最为密切。肥胖的脂肪组织过度膨胀, 造成脂肪组织缺氧, 是肥胖的早期现象。肥胖伴缺氧的脂肪细胞分泌的细胞因子、脂肪因子、饱和脂肪酸等, 除了造成脂肪组织炎症和胰岛素抵抗外, 还可经血液循环, 影响骨骼肌和肝脏中的胰岛素作用, 造成周身胰岛素抵抗^[2]。本研究通过高脂饮食喂养 C57BL/6 雄性小鼠, 诱导其肥胖, 通过体外常氧或缺氧培养小鼠原代脂肪细胞, 检测其分泌肿瘤坏

死因子 α ($\text{TNF}\alpha$) 的水平, 探讨肥胖和缺氧对小鼠原代脂肪细胞分泌 $\text{TNF}\alpha$ 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 C57BL/6 小鼠(军事医学科学院实验动物中心), 高脂饲料和普通饲料(美国 Research Diets 公司), 葡萄糖、胶原酶(美国 Sigma 公司), 胰岛素(加拿大 Eli Lilly 公司), 血糖仪、血糖试纸(瑞士 Roche 公司), DMEM(天津百若克公司), 胎牛血清(以色列 Bioind 公司), $\text{TNF}\alpha$ ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠喂养 SPF 级 4 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 20 只, 体质量 (18.70 ± 0.73) g, 经适应性培养 5 d 后随机分为高脂饮食组 (HFD, $n=10$) 和普通饮食组 (LFD, $n=10$), 分别用高脂饲料(脂肪含量 60%)和普通饲料(脂肪含量 10%)喂养 HFD 和 LFD 小鼠 16

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81170740); 国家自然科学基金委国际合作项目(81161120545); 高等学校博士学科点专项基金(20121202110014)

作者简介 马晓芳(1987-), 女, 硕士在读, 研究方向: 免疫学; 通信作者: 牛文彦, E-mail: wniu@tjmu.edu.cn。

周。小鼠自由摄食,饮水;饲养于温度(22 ± 2)℃、湿度(55 ± 10)%、12 h 照明/非照明循环房间。

1.2.2 小鼠葡萄糖耐量及胰岛素耐量实验 C57BL/6 小鼠经过 16 周喂养后进行腹腔注射葡萄糖耐量实验(ipGTT)和胰岛素耐量实验(ITT)。小鼠饥饿处理 4 h(ipGTT)和 16 h(ITT)后腹腔注射葡萄糖(2 g/kg 体重)和胰岛素(0.75 IU/kg 体重),分别在注射后 0、30、60、90、120 min 5 个时间点检测小鼠尾末梢静脉全血血糖水平。

1.2.3 测量小鼠体质量及肝脏和脂肪质量 处死小鼠后取肝脏和附睾脂肪垫(epididymal fat pads, EFP)的白色脂肪组织,观察其形态、称重并计算肝脏和 EFP 占体质量百分比,记为肝脏和 EFP 指数(Liver/EFP Index)。

1.2.4 脂肪细胞原代培养及缺氧处理 将两组小鼠 EFP 脂肪组织剪碎后,加入胶原酶(2 mL/g),37℃培养箱孵育 30 min。用含 10%(v/v)FBS 的 DMEM 高糖培养基灭活胶原酶(20:1),2 000×g 离心 15 min,上层浑浊液体即为原代脂肪细胞。LFD 小鼠脂肪细胞为正常组(Control, C),HFD 为肥胖脂肪细胞组(Fat, F),两种细胞分别在 21% O₂ 常氧(normoxia, N)和 1% O₂ 缺氧(hypoxia, H)条件下孵育 24 h,提培养上清。常氧和缺氧条件下正常脂肪细胞的培养基记为 CN 和 CH;常氧和缺氧培养的高脂脂肪细胞条件培养基记为 FN 和 FH。

1.2.5 ELISA 法测定 TNF α 水平 ELISA 试剂盒测定 4 种条件培养基中 TNF α 的浓度, $n=6$ 。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件包进行统计学分析。实验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,图中误差线为标准误(s_x);两组间数据采用独立样本 t 检验,多组数据间采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为均值差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高脂喂养小鼠体质量、肝脏和脂肪组织质量 与 LFD 相比,经高脂喂养的 HFD 小鼠身形肥硕,体积增大,体质量增加得更快;解剖后见其肝脏较 LFD 小鼠增大变软、颜色淡红,肠系膜脂肪、肾周脂肪垫及附睾周脂肪垫体积明显增大、质地松散。HFD 小鼠体质量、肝脏和附睾脂肪垫质量明显增加;附睾脂肪比例(EFP Index)显著增加(表 1)。

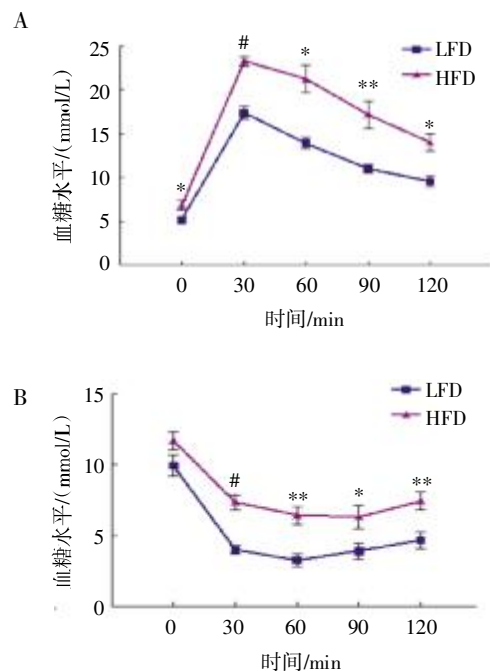
表 1 高脂饮食对小鼠体质量和组织质量的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The effect of HFD on body and tissues weight of mice ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体质量/g	肝脏质量/g	Liver Index/%	EFP 质量/g	EFP Index/%
LFD	10	30.26 \pm 2.19	1.21 \pm 0.16	4.03 \pm 0.63	0.54 \pm 0.13	1.81 \pm 0.48
HFD	10	38.35 \pm 5.01	1.72 \pm 0.27	4.51 \pm 0.72	1.86 \pm 0.31	4.88 \pm 0.77
t		4.676 [#]	19.353 [#]	1.595	4.676 [#]	10.723 [#]

与 LFD 组相比,[#] $P<0.001$

2.2 高脂饮食对小鼠 ipGTT 和 ITT 的影响 图 1 可见,与 LFD 相比,HFD 小鼠经过夜饥饿后其血糖水平较高,经腹腔注入葡萄糖后 30 min 内血糖快速上升达到最高值,且下降速度缓慢,120 min 内血糖均显著高于 LFD(图 1A),表明 HFD 小鼠糖耐量降低;腹腔注入胰岛素后,HFD 小鼠血糖值下降缓慢、降幅小、最低水平时间后延,120 min 内血糖值始终高于 LFD 小鼠(图 1B),提示 HFD 小鼠周身胰岛素抵抗。

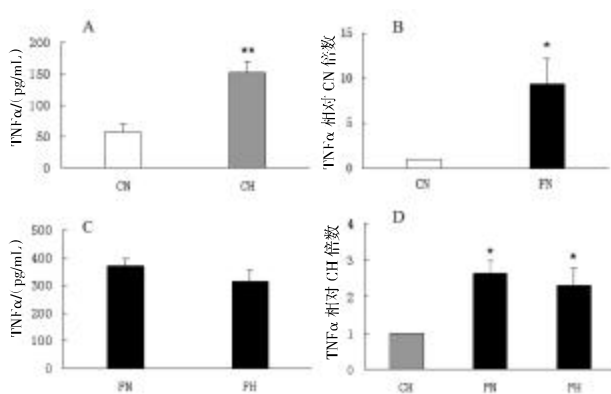


与 LFD 组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,[#] $P<0.001$

图 1 高脂饮食对小鼠 ipGTT 和 ITT 的影响($n=10$)

Fig 1 The effect of HFD on ipGTT and ITT of mice ($n=10$)

2.3 4 种脂肪细胞条件培养基中 TNF α 水平 图 2 显示 4 种条件培养基中 TNF α 绝对和相对水平。缺氧处理 LFD 小鼠原代脂肪细胞显著升高 TNF α 的分泌($P<0.01$),上升至 2.7 倍(图 2A)。在常氧环境中,HFD 小鼠脂肪细胞分泌的 TNF α 高于 LFD 组,为 LFD 组的 9.4 倍($P<0.05$,图 2B)。在 HFD 组中,体外缺氧培养不影响小鼠脂肪细胞分泌 TNF α ($P=0.403$,图 2C)。HFD 组相比于 LFD 缺氧组 CH, FN 和 FH 分别上升 2.6 和 2.3 倍($P<0.05$,图 2D)。



与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图2 小鼠原代脂肪细胞条件培养基中 TNF α 水平($n=6$)

Fig 2 TNF α level in conditioned medium of mice primary adipocytes ($n=6$)

3 讨论

本实验选用 C57BL/6 小鼠, 通过脂肪含量为 60% 的高脂饲料喂养制造肥胖模型。本研究中高脂饮食喂养 16 周后, 小鼠体质量显著高于对照组, 且体质量增长更为快速, 肝脏和白色脂肪组织质量显著增加, 同时出现脂肪肝样病变, 脂肪组织所占体质量比例大大增加, ipGTT 和 ITT 实验显示 HFD 小鼠胰岛素抵抗, 表明肥胖模型建立成功。

为探究肥胖引发炎症和胰岛素抵抗的原因, 我们检测肥胖时脂肪组织缺氧这一因素对脂肪细胞分泌炎症细胞因子 TNF α 的影响。结果发现缺氧培养和肥胖均能促进脂肪细胞分泌更多的 TNF α , 表明缺氧促进正常小鼠脂肪细胞 TNF α 的分泌, 其作用类似于肥胖对 HFD 小鼠脂肪细胞的影响。肥胖人群脂肪组织缺氧诱导因子 HIF-1 α 升高, 提示脂肪组织缺氧^[3], 由此推测本研究中肥胖小鼠脂肪组织也处于慢性缺氧状态。为排除体外常氧培养可能消除肥胖在小鼠体内缺氧的作用, 本研究将肥胖小鼠脂肪细胞在体外分别常氧和缺氧培养, 结果发现, 缺氧培养没有进一步升高肥胖小鼠脂肪细胞分泌 TNF α 的水平, 说明肥胖状态下脂肪组织慢性缺氧对脂肪细胞分泌 TNF α 的促进作用仍然存在。TNF α 是炎症细胞因子, 本研究中体外缺氧培养的原代脂肪细胞分泌的 TNF α 显著增多, 与文献报道的肥胖个体血中 TNF α 水平升高结果一致^[4], 提示肥胖小鼠的脂肪组织处于炎症状态。

白色脂肪组织不仅是机体储能的主要器官, 还具有重要的内分泌作用, 分泌瘦素(Leptin)、TNF α 、白介素 6(IL-6)等多种细胞因子和脂肪因子^[5]。在肥胖症患者中脂肪组织过度肥大, 脂肪细胞先于血管生成即造成了局部脂肪组织缺氧, 缺氧使脂肪组织处于炎症状态, 炎症状态的脂肪组织能分泌更多的炎症因子。本课题组前期工作证实, 体外缺氧培养的脂肪细胞能够分泌更多的炎症因子, 包括 TNF α 、IL-6 和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)等, 缺氧的脂肪细胞条件培养基造成小鼠骨骼肌细胞的胰岛素抵抗^[6]。脂肪组织缺氧诱发的慢性炎症与胰岛素抵抗密切相关, 本研究发现肥胖小鼠脂肪细胞分泌 TNF α 水平增加, 胰岛素抵抗, 与前期结果呼应。已知 TNF α 是导致胰岛素抵抗的重要的炎症因子, 可通过激活 JNK、NF- κ B 和下调脂联素的表达等多种机制造成胰岛素抵抗。据此推测本研究中肥胖小鼠脂肪细胞分泌的过量的 TNF α 与小鼠胰岛素抵抗相关。

综上所述, 在高脂饮食诱导的肥胖小鼠中, 脂肪组织慢性缺氧造成脂肪细胞分泌更多的炎症因子 TNF α , 可能与周身胰岛素抵抗相关, 缺氧对脂肪组织炎症和胰岛素抵抗的影响的详细机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Saquib N, Khanam M A, Saquib J, et al. High prevalence of type 2 diabetes among the urban middle class in Bangladesh[J]. BMC Public Health, 2013, 13(1): 1032
- [2] Sears D D, Miles P D, Chapman J, et al. 12/15-lipoxygenase is required for the early onset of high fat diet-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice[J]. PLoS One, 2009, 4(9): e7250
- [3] 王慧, 牛文彦. 脂肪组织缺氧与胰岛素抵抗的相关性研究[J]. 天津医科大学学报, 2012, 18 (1): 7
- [4] Burgos-Ramos E, Canelles S, Perianes-Cachero A, et al. Adipose tissue promotes a serum cytokine profile related to lower insulin sensitivity after chronic central leptin infusion[J]. PLoS One, 2012, 7 (10): e46893
- [5] Montecucco F, Mach F. Update on therapeutic strategies to increase adiponectin function and secretion in metabolic syndrome[J]. Diabetes Obes Metab, 2009, 11 (5): 445
- [6] Yu J, Shi L, Wang H, et al. Conditioned medium from hypoxia-treated adipocytes renders muscle cells insulin resistant[J]. Eur J Cell Biol, 2011, 90(12): 1000

(2013-09-29 收稿)