

乙酰胆碱及其特异性拮抗剂对小鼠前脂肪细胞功能的影响

陈玮¹, 梁春¹, 庞涛², 刘星¹, 吴宗贵¹

(第二军医大学 1 长征医院心内科, 2 长海医院普外科, 上海市 200003)

[关键词] 乙酰胆碱; 甲基牛扁碱; 前脂肪细胞; 核因子 κ B p65 蛋白

[摘要] 目的 观察副交感神经递质乙酰胆碱及其特异性 $\cdot 7$ n 型乙酰胆碱受体拮抗剂甲基牛扁碱对培养的小鼠前脂肪细胞的作用, 对其机制进行探讨。方法 乙酰胆碱刺激细胞后采用 MTT 观察细胞增殖能力, ELISA 检测上清中白细胞介素 6 和 10 的动态变化, 免疫印迹法检测核因子 κ B p65 蛋白水平。结果 乙酰胆碱促进前脂肪细胞增殖, 12 h 为对照组的 $122.0\% \pm 11.4\%$, 甲基牛扁碱能够阻断其对细胞增殖的作用; 乙酰胆碱刺激细胞分泌白细胞介素 6 6 h 后达到高峰, 同时抑制细胞分泌白细胞介素 10 12 h 后明显降低, 持续至 24 h 甲基牛扁碱对细胞因子的分泌无明显作用; 乙酰胆碱上调核因子 κ B p65 蛋白水平, 6 h 达顶峰, 此后逐渐下降, 但 24 h 时仍明显高于对照水平, 甲基牛扁碱不能够阻断该效应。结论 副交感神经递质乙酰胆碱可能通过促进前脂肪细胞核因子 κ B p65 蛋白核转位激活前脂肪细胞, 促进炎症反应, 甲基牛扁碱对此无明显作用, 提示细胞表面 $\cdot 7$ n 型乙酰胆碱受体并非其作用的主要受体。

[中图分类号] Q4

[文献标识码] A

Effect of Acetylcholine and Its Antagonist on Murine Preadipocytes Function

CHEN Wei¹, LIANG Chun¹, PANG Tao², LIU Xing¹, and WU Zong-Gui¹

(1 Department of Cardiology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2 Department of General Surgery, Changhai Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[KEY WORDS] Acetylcholine, Methyllycaconitine, Preadipocyte, NF- κ B p65 protein

[ABSTRACT] **Aim** To assess the effect of acetylcholine (ACh) and its antagonist methyllycaconitine (MLA) on murine preadipocytes. **Methods** MTT was used for the proliferation ability examination. ELISA was used for IL-6 and IL-10. Western blotting was used for NF- κ B p65 protein in nucleus. **Results** ACh could promote preadipocytes proliferation with $122.0\% \pm 11.4\%$ compared to control after stimulation for 12 h, and MLA could block its effect. ACh could induce preadipocytes secrete IL-6 and reach its peak at 6 h, significantly higher than that of control group ($P < 0.05$). ACh could decrease IL-10 concentration. MLA had little effect on cytokines secretion. ACh could increase the level of NF- κ B p65 in nucleus with the highest level at 6 h. MLA couldn't block its effect. **Conclusion** ACh could activate preadipocytes through promoting NF- κ B p65 protein translocation. MLA couldn't antagonize its action, suggesting that $\cdot 7$ n ACh receptor, which is the major receptor through which ACh exerts its anti-inflammation effect, didn't play an important role in the process.

脂肪组织是人体炎症因子的重要来源, 能够分泌 MCP-1、IL-6、IL-8 等多种细胞因子^[1], 这是动脉粥样硬化以及其相关疾病如糖尿病、高血压、高血脂等患者处于慢性炎症状态的重要原因。研究证明脂肪组织中的非脂肪细胞虽然仅占细胞总成分的 20% ~ 40%, 却是炎症因子的主要来源。前脂肪细胞是非脂肪组织主要的细胞成分之一, 不仅能够分化为成熟的脂肪组织, 并且在病理状态下较之脂肪

细胞具有更强的炎症因子分泌能力^[2], 甚至表现出类似吞噬细胞的表型和活性。已经证明脂肪组织接受神经的直接支配, 表达几乎所有的 n 型乙酰胆碱受体 (nAChR) 亚基^[3], 对培养的前脂肪细胞进行检测发现其表面存在 β 受体^[4], 副交感系统对炎症因子分泌的作用越来越受到重视, 因此本研究选取副交感神经递质乙酰胆碱对前脂肪细胞炎症分泌的作用及其可能机制进行探讨。

[收稿日期] 2010-09-07 [修回日期] 2010-11-02

[基金项目] 国家自然科学基金 (81072981, 30900528, 30971101); 军队中医药科研专项课题面上项目 (2010Z227)

[作者简介] 陈玮, 博士, 研究方向为冠心病及动脉粥样硬化的防治, Email 为 cecila0505@163.com。梁春, 博士, 副主任医师, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化。庞涛, 博士, 住院医师, 助教, 研究方向为内皮祖细胞与 MODS。吴宗贵, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病防治。

1 材料和方法

1.1 试剂

3T3-L1 细胞购自美国 ATCC; 核蛋白提取试剂盒购自南京建成生物研究所; 乙酰胆碱、甲基牛扁碱购自 Sigma 公司; 鼠抗人单克隆 NF- κ B p65 抗体购

自 Santa Cruz 公司; DMEM /F12 培养基购自 Hyclone 公司, 小牛血清购自 Gibco 公司; IL-6 和 IL-10 细胞因子 ELISA 检测试剂盒购自 R&D 公司。

1.2 ELISA 检测

以标准品 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 及 0 ng/L 之 OD 值在半对数纸上作图, 画出标准曲线, 每孔中各加入样品稀释液 100 μ L, 待测品孔每孔各加入待测样品 100 μ L, 混匀后置 37 $^{\circ}$ C 120 min, 充分洗涤反应板后每孔中加入第一抗体工作液 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 60 min 后每孔加酶标抗体工作液 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 60 min 后每孔加入底物工作液 100 μ L, 暗处反应 5~10 min, 每孔加入终止液混匀, 于 492 nm 处测吸光值, 据样品 OD 值在标准曲线图上查出相应蛋白质含量。

1.3 核蛋白提取

胰酶消化后收集细胞, 按照细胞体积加入预冷的 Buffer A, 冰上放置 15 min 后加入预冷的 Buffer B, 剧烈涡旋震荡 5 s 后, 4 $^{\circ}$ C、16000 g 离心 5 min, 收集上清, 获得胞浆蛋白。在离心沉淀物中加入预冷 Buffer C, 涡旋震荡后放置冰上 40 min, 16000 g 离心 10 min, 收集上清获取核蛋白。

1.4 MTT 检测

单细胞悬液接种于 96 孔培养板, 培养箱分别培养 2 h、6 h、12 h 及 24 h 加入 2 g/L MTT 液 (每孔 100 μ L), 继续培养 4 h, 吸出孔内培养液后, 加入 DMSO 液后于波长 570 nm 检测各孔 OD 值。

1.5 免疫印迹法检测

将提取的蛋白样品煮沸变性后加入聚丙烯酰胺凝胶, 电泳分离后转移至 PVDF 膜, 于含 5% 脱脂奶粉 (TBST 溶剂) 的封闭液中室温封闭 1 h, 加入用稀释液 1:1000 稀释的一抗, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 5% TBST 洗涤, 加入二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 5% TBST 洗涤后显影。

1.6 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 乙酰胆碱及甲基牛扁碱阻断后对细胞增殖的作用

于前脂肪细胞培养液中加入乙酰胆碱分别刺激 6 h、12 h 及 24 h 后, 与对照组相比, 刺激 6 h 后细胞数目无明显改变, 但 12 h 和 24 h 后细胞数目明显上升 ($P < 0.05$)。于前脂肪细胞培养液中提前加入甲基牛扁碱后, 乙酰胆碱对细胞增殖的影响消失, 阻断

6 h、12 h 及 24 h 后, 细胞数目与对照组无明显差异 (图 1)。

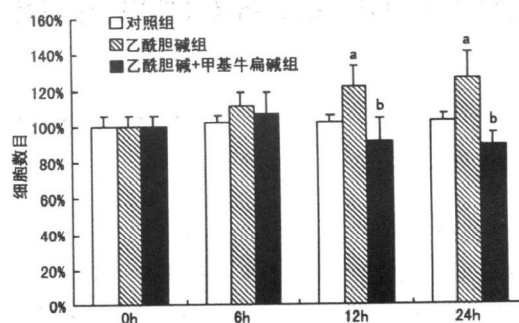


图 1 乙酰胆碱及其拮抗剂甲基牛扁碱刺激后细胞数目比较 ($n=3$) a 为 $P < 0.05$ 与对照组同一时间点比较; b 为 $P < 0.05$ 与乙酰胆碱同一时间点比较。

2.2 乙酰胆碱及甲基牛扁碱阻断后对 IL-6 分泌的影响

于前脂肪细胞培养液中加入乙酰胆碱分别刺激 2 h、6 h、12 h 及 24 h 后, 上清中 IL-6 浓度在刺激 6 h 后达到高峰, 与对照组相比有明显差异 ($P < 0.05$, 表 1)。预先加入甲基牛扁碱, 再用乙酰胆碱分别刺激 2 h、6 h、12 h 及 24 h 后, 上清中 IL-6 浓度在刺激 6 h 后达到高峰, 与对照组相比有明显差异 ($P < 0.05$), 但与乙酰胆碱组间比较无明显差异 (图 2)。

2.3 乙酰胆碱及甲基牛扁碱阻断后对 IL-10 分泌的影响

于前脂肪细胞培养液中加入乙酰胆碱分别刺激 2 h、6 h、12 h 及 24 h 后, 上清中 IL-10 浓度随着药物刺激时间的延长逐渐下降, 并在 24 h 达到最低点 ($P < 0.05$)。甲基牛扁碱阻断后乙酰胆碱分别刺激 2 h、6 h、12 h 及 24 h 上清中 IL-10 浓度随着药物刺激时间的延长逐渐下降, 刺激 24 h 后上清 IL-10 浓度与对照组差异明显, 但与乙酰胆碱组无明显差别 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.4 乙酰胆碱及甲基牛扁碱阻断后对前脂肪细胞 NF- κ B 的影响

于前脂肪细胞培养液中加入乙酰胆碱分别刺激 2 h、6 h、12 h 及 24 h 后, 核蛋白中 NF- κ B p65 水平随着时间的延长逐渐上升, 并在 6 h 达到顶峰, 此后开始逐渐下降, 但始终高于对照组。浆蛋白中 p65 水平随着刺激时间的延长也有轻微增长的趋势, 但只在 6 h 时与对照组存在统计学差异 ($P < 0.05$, 图 2)。甲基牛扁碱阻断后乙酰胆碱分别刺激 2 h、6 h、12 h 及 24 h 后, 核蛋白中 NF- κ B p65 水平随着时间的延长逐渐上升, 6 h 达到顶峰, 与单纯给予乙酰胆

碱组相比上升幅度轻度下降,但始终高于对照组 ($P < 0.05$)。浆蛋白中 p65 水平随着刺激时间的延长没有明显的变化 (图 3)。

表 1. 上清中 IL-6 和 IL-10 浓度 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$ ng/L)

分 组	对照组	乙酰胆碱组	乙酰胆碱 + 甲基牛扁碱组
IL-6			
0 h	45.37 \pm 2.31	48.31 \pm 2.86	50.32 \pm 2.75
2 h	45.99 \pm 3.47	51.52 \pm 5.26	62.82 \pm 5.09
6 h	46.71 \pm 3.02	67.12 \pm 4.72 ^{ab}	78.99 \pm 4.70 ^{ab}
12 h	47.22 \pm 4.11	42.65 \pm 4.36	52.36 \pm 3.31
24 h	49.01 \pm 3.95	42.43 \pm 9.93	41.83 \pm 5.04
IL-10			
0 h	89.46 \pm 4.53	90.97 \pm 4.04	90.93 \pm 3.98
2 h	91.23 \pm 5.46	101.15 \pm 7.86	88.78 \pm 2.17
6 h	91.75 \pm 4.97	82.52 \pm 4.38	72.20 \pm 5.87
12 h	92.87 \pm 4.32	58.51 \pm 7.17 ^{ab}	44.58 \pm 1.81 ^{ab}
24 h	93.02 \pm 5.05	51.35 \pm 1.83 ^a	43.75 \pm 4.63 ^a

a 为 $P < 0.05$ 与同一组别 0 h 时比较; b 为 $P < 0.05$ 与同一时间点对照组比较。

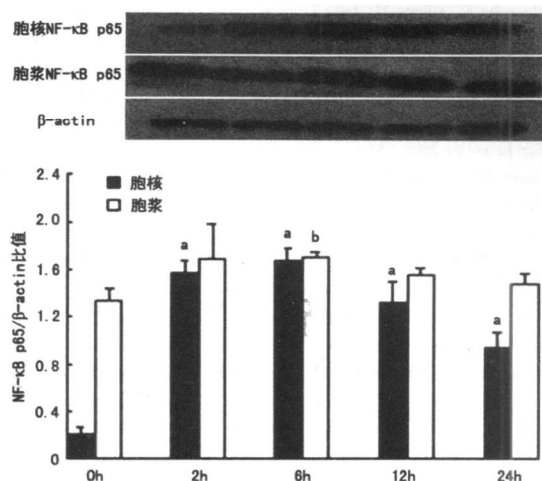


图 2. 乙酰胆碱对前脂肪细胞胞浆及胞核 NF-κB p65 水平的影响 ($n = 3$) a 为 $P < 0.05$, 与同组 0 h 时比较。

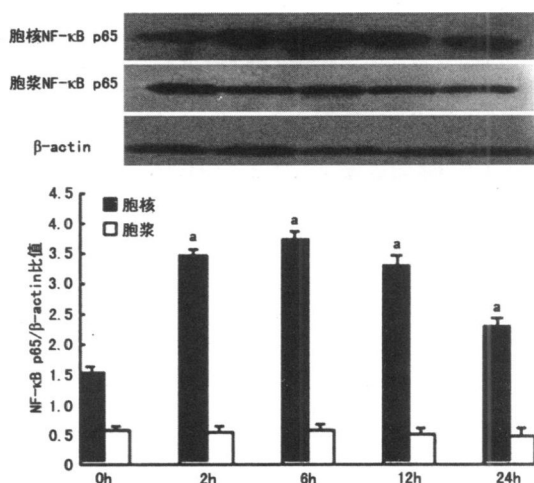


图 3. 甲基牛扁碱阻断后乙酰胆碱对前脂肪细胞胞浆及胞核 NF-κB p65 水平的影响 ($n = 3$) a 为 $P < 0.05$, 与同组 0 h 时比较。

3 讨论

自主神经系统 (ANS) 功能紊乱与脂肪组织的慢性炎症状态是动脉粥样硬化、糖尿病发生发展的重要因素, 两者相辅相成。ANS 可以调节脂肪组织中多种细胞成分的增殖、凋亡、分化以及炎症因子的分泌等功能, 反之, 脂肪组织通过其分泌的各种细胞因子恶化 ANS 功能紊乱。本研究通过使用神经递质乙酰胆碱及其特异性 $\cdot 7n$ 乙酰胆碱受体 ($\cdot 7nAChR$) 拮抗剂甲基牛扁碱刺激培养的小鼠前脂肪细胞, 结果发现, 乙酰胆碱在刺激前脂肪细胞 12 h 后明显促进其增殖, 甲基牛扁碱能够阻断其促细胞增殖作用; 乙酰胆碱刺激培养的前脂肪细胞分泌 IL-6 抑制其分泌 IL-10 对此甲基牛扁碱无明显拮抗作用; 乙酰胆碱对 p65 蛋白的表达为非时间依赖性, 在 6 h 达到顶峰, 此后逐渐下降, 但 24 h 时仍明显高于对照水平, 甲基牛扁碱能够部分阻断其对 NF-κB p65 表达的影响。

乙酰胆碱能够促进多种细胞增殖, Cheng 等^[5]发现结肠癌细胞能够分泌乙酰胆碱, 并通过自分泌的方式促进肿瘤细胞生长。Maouche 等^[6]则发现乙酰胆碱促支气管上皮增生与 $\cdot 7nAChR$ 有关。本研究中, 乙酰胆碱促进培养的前脂肪细胞增殖, 虽然程度并不明显, 但在 12 h 和 24 h 时都达到了统计学差异, 给予甲基牛扁碱阻断后, 细胞增殖被抑制, 与对照组无显著差异, 这与既往的研究是一致的。

目前研究认为胆碱能系统的激活能够调控炎症反应, Borovkova 等发现乙酰胆碱能够明显抑制脂多糖刺激的巨噬细胞释放炎症因子 TNF、IL-1 β 、IL-6、IL-18 等, 但不能减少抗炎因子 IL-10 的释放, Giebelen 等^[7]也有类似发现。目前认为胆碱能系统的抗炎作用主要是通过 $\cdot 7nAChR$ 介导的, Wang 等对 $\cdot 7$ 亚基因敲除的小鼠进行迷走神经电刺激, 发现胆碱能的抗炎作用不再出现, 同样 Saeed 等^[8]发现人血管内皮细胞也表达 $\cdot 7nAChR$, 胆碱能激动剂烟碱和 CAP55 能通过此受体抑制内皮细胞黏附分子的表达, 减少内皮细胞活化, 减轻炎症反应。但在本研究中乙酰胆碱可以促进前脂肪细胞分泌 IL-6 减少其分泌 IL-10 这可能与不同细胞表面表达的受体类型、数量及其状态有关^[9]。体外实验证实培养的支气管上皮细胞、巨噬细胞和平滑肌细胞在乙酰胆碱的诱导下能够释放炎症介质, 趋化炎症细胞, 动物实验也有类似的结果, 而乙酰胆碱的 M 受体可能是这种促炎反应的主要介导受体^[10]。此外, 甲基牛扁碱对乙酰胆碱诱导的前脂肪细胞细胞因子分泌反

应无明显的拮抗作用,这些都间接提示了乙酰胆碱对小鼠前脂肪细胞作用的主要受体并不是 $\cdot 7nA chR$,因此不能观察到明显的胆碱能抗炎效应。但在本研究中给予甲基牛扁碱干预后 IL-6 仍有进一步上升的趋势,而 IL-10 则有进一步下降的趋势,因此不能否认在小鼠前脂肪细胞表面 $\cdot 7nA chR$ 的存在^[11],缺乏统计学意义的结果也可能与本研究的例数不足相关。

NF- κ B 蛋白家族是一种多效性的转录因子,能够调控炎症性因子、细胞表面受体、转录因子、黏附分子等的生成。Madonna 等^[12]发现 NF- κ B 信号通路的激活能够促进内皮细胞表达 VCAM-1, Ungvari 等^[13]则发现氧化应激通过激活血管局部的 NF- κ B 诱导炎症反应,进而促进多种疾病包括动脉粥样硬化的发生。这些研究都证明了 NF- κ B 的活化在动脉粥样硬化中具有重要的地位。p65 蛋白是 NF- κ B 的一个亚基,是其最重要的功能亚基之一,生理状态下以非活性形式存在于胞浆中,在受到各种刺激因素作用后, NF- κ B p65 转位至细胞核中发挥作用。我们的研究发现在受到乙酰胆碱刺激后核蛋白中 NF- κ B p65 水平迅速升高,同时伴有细胞因子 IL-6 的分泌增加, IL-10 的分泌减少,提示神经递质介导的炎症作用可能是通过 NF- κ B 的活化进行的,而甲基牛扁碱对乙酰胆碱诱导的 NF- κ B p65 核转位抑制作用并不明显,再次提示 $\cdot 7nA chR$ 不是乙酰胆碱作用于前脂肪细胞的主要受体。核内 NF- κ B p65 水平在 6 h 达到顶峰后再次下降,可能与长时间的刺激造成细胞对乙酰胆碱的某些受体类型脱敏有关^[14],从而在不同的时期激动了不同的受体。

综合以上结果,可以得出这样的结论:副交感神经系统能够促进前脂肪细胞分泌炎症因子,加剧机体的炎症反应,特异性的 $\cdot 7nA chR$ 受体拮抗剂甲基牛扁碱对于这些炎症分泌的作用具有促进作用,但并未达到统计学差异,提示 $\cdot 7nA chR$ 可能不是其作用的主要受体,其促炎作用可能是通过其他类型的受体介导的。

[致谢] 本研究得到第二军医大学附属长征医院中心实验室多位老师的支持和帮助,再次一并表示感谢!

[参考文献]

- [1] Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, et al. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes [J]. *Endocrinology*, 2007, **148** (2): 868-877.
- [2] Chung S, Lapoint K, Matinaz K, et al. Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes [J]. *Endocrinology*, 2006, **147** (11): 5340-5351.
- [3] Giordano A, Song CK, Bowers RR, et al. White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006, **291** (5): R1243-255.
- [4] Lai E, Rosen OM, Rubin CS. Dexamethasone regulates the beta-adrenergic receptor subtype expressed by 3T3-L1 preadipocytes and adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 1982, **257** (12): 6691-696.
- [5] Cheng K, Samin R, Xie GF, et al. Acetylcholine release by human colon cancer cells mediates autocrine stimulation of cell proliferation [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, **295**: 591-597.
- [6] Maouche K, Polette M, Jolly T, et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor regulates airway epithelium differentiation by controlling basal cell proliferation [J]. *Am J Pathol*, 2009, **175**: 1868-882.
- [7] Giebelen I, Leenderse M, Florquin S, et al. Stimulation of acetylcholine receptors impairs host defence during pneumococcal pneumonia [J]. *Eur Respir J*, 2009, **33** (2): 375-381.
- [8] Saeed RW, Vama S, Peng-Nameroff T, et al. Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation [J]. *J Exp Med*, 2005, **201** (7): 1113-123.
- [9] Gosens R, Rieks D, Meurs H, et al. Muscarinic M3 receptor stimulation increases cigarette smoke-induced IL-8 secretion by human airway smooth muscle cells [J]. *Eur Respir J*, 2009, **34**: 1436-443.
- [10] Profita M, Bonanno A, Siena L, et al. Acetylcholine mediates the release of IL-8 in human bronchial epithelial cells by a NF- κ B/ERK-dependent mechanism [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, **582**: 145-153.
- [11] 吴静, 卢慧玲, 胡秀芬, 等. 3T3-L1 前脂肪细胞烟碱样胆碱能受体 $\alpha 7$ 亚型功能状态对 chemerin 及其受体 chemerinR 基因表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (6): 435-439.
- [12] Madonna R, Massaro M, Pandolfi A, et al. The prominent role of p38 mitogen-activated protein kinase in insulin-mediated enhancement of VCAM-1 expression in endothelial cells [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2007, **20** (3): 539-555.
- [13] Ungvari Z, Orosz Z, Labinskyy N, et al. Increased mitochondrial H_2O_2 production promotes endothelial NF- κ B activation in aged rat arteries [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, **293** (1): H37-47.
- [14] Takeda N, Manabe I, Shindo T, et al. Synthetic retinoid Am80 reduces scavenger receptor expression and atherosclerosis in mice by inhibiting IL-6 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26** (5): 1177-183.

(此文编辑 文玉珊)