

# 酰基化 Ghrelin 对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 诱导的脂肪细胞单核细胞趋化蛋白 1 及脂联素分泌紊乱的影响

刘洋, 刘石平, 陈妙娇, 胡芳, 黄干, 周智广

(中南大学湘雅二医院内分泌科 中南大学糖尿病中心 糖尿病免疫学教育部重点实验室, 湖南省长沙市 410011)

[关键词] 酰基化 Ghrelin; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 脂肪细胞; 脂肪细胞因子; Toll 样受体 4

[摘要] **目的** 探讨酰基化 Ghrelin 是否可保护 3T3-L1 小鼠脂肪细胞免受肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 所介导的炎症损伤。**方法** 成熟 3T3-L1 脂肪细胞分为对照组、TNF- $\alpha$  处理组、酰基化 Ghrelin 处理组、酰基化 Ghrelin + TNF- $\alpha$  处理组。干预完成后, 分别检测 3T3-L1 脂肪细胞上 Toll 样受体 4 (TLR-4) mRNA 及蛋白水平、核因子  $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65) 磷酸化蛋白水平以及细胞上清液中脂联素和单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 的表达水平。**结果** ①与对照组比较, TNF- $\alpha$  处理组 3T3-L1 脂肪细胞 TLR-4 mRNA 和蛋白水平、NF- $\kappa$ B p65 磷酸化蛋白水平均上调, 细胞分泌 MCP-1 增多, 脂联素减少 ( $P < 0.05, n = 5$ )。②与对照组比较, 酰基化 Ghrelin 处理组 TLR-4 mRNA 和蛋白水平以及 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化蛋白水平下降 ( $P < 0.05, n = 5$ ), 脂肪细胞分泌脂联素减少 ( $P < 0.05, n = 5$ ), MCP-1 仅有下降趋势 ( $P > 0.05, n = 5$ )。③与 TNF- $\alpha$  (100  $\mu$ g/L) 处理组比较, 酰基化 Ghrelin 预孵育 4 h 可下调 TNF- $\alpha$  所致的 3T3-L1 脂肪细胞 TLR-4 mRNA 表达增多, 其蛋白水平以及 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化蛋白水平亦有所下调 ( $P < 0.05, n = 5$ ), 且呈剂量依赖性; 而脂肪细胞 MCP-1 及脂联素的分泌水平差异无显著性 ( $P > 0.05, n = 5$ )。**结论** TNF- $\alpha$  导致 3T3-L1 细胞 TLR-4、NF- $\kappa$ B p65 炎症通路活化, 脂肪细胞分泌促炎因子 (MCP-1) 增加, 而抗炎因子 (脂联素) 减少; 酰基化 Ghrelin 可剂量依赖性抑制 TNF- $\alpha$  介导的 3T3-L1 细胞 TLR-4、NF- $\kappa$ B p65 炎症通路的活化, 但不能完全改善脂肪细胞分泌促炎因子和抗炎因子的紊乱。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effects of Acylated Ghrelin on Monocyte Chemotactic Protein 1 and Adiponectins Parasecretion of Adipocytes Induced by Tumour-Necrosis Factor- $\alpha$

LIU Yang, LIU Shi-Ping, CHEN Miao-Jiao, HU Fang, HUANG Gan, and ZHOU Zhi-Guang

(Institute of Metabolism and Endocrinology, the Second Xiangya Hospital & Diabetes Center, Central South University & Key Laboratory of Diabetes Immunology, Ministry of Education, Changsha, Hunan 410011, China)

[KEY WORDS] Acylated Ghrelin; Tumour Necrosis Factor- $\alpha$ ; Adipocytes; Adipokines; Toll-like Receptor 4

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether acylated ghrelin can protect 3T3-L1 mouse adipocytes from inflammatory injury mediated by inflammatory factor tumour-necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). **Methods** Four experimental groups were set up: control group, TNF- $\alpha$  treated group, acylated ghrelin treated group and a group pretreated by acylated ghrelin followed by TNF- $\alpha$  treatment. After the completion of the intervention, the mRNA and protein levels of Toll-like receptor 4 (TLR-4), nuclear factor  $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65) protein phosphorylation level, the concentration of monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and adiponectin in the supernatant were detected. **Results** ① Compared with control group, mRNA and protein expression level of TLR-4 were increased by TNF- $\alpha$  intervention, as well as level of NF- $\kappa$ B p65 protein phosphorylation and MCP-1 protein in the murine 3T3-L1 adipocytes ( $P < 0.05, n = 5$ ). On the contrary, the adiponectin protein was decreased ( $P < 0.05, n = 5$ ). ② Compared with control group, the level of TLR-4 mRNA and protein expression, as well as NF- $\kappa$ B p65 protein phosphorylation were significantly decreased in acylated ghrelin treated group ( $P < 0.05, n = 5$ ). The adiponectin level in the cell supernatant was decreased (at 15 pmol/L most obvious) ( $P < 0.05, n = 5$ ), while level of the MCP-1 went down without statistically significant difference ( $P > 0.05, n = 5$ ). ③ Compared with

[收稿日期] 2014-05-30

[修回日期] 2014-10-02

[作者简介] 刘洋, 硕士研究生, 医师, 研究方向为肥胖与免疫, E-mail 为 xiyangyang 4608933@126.com。通讯作者刘石平, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向为肥胖与免疫。周智广, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向为 LADA。

TNF- $\alpha$  (100  $\mu\text{g/L}$ ) treated group, the incubation of acylated ghrelin could antagonise TNF- $\alpha$ -induced activation of TLR-4/NF- $\kappa\text{B}$  pathway in mouse 3T3-L1 adipocytes, mRNA and protein expression levels of TLR-4, the level of NF- $\kappa\text{B}$  p65 protein phosphorylation were decreased ( $P < 0.05, n = 5$ ) in a dose-dependent manner. The secretion of MCP-1 and adiponectin did not change significantly in 3T3-L1 adipocytes ( $P > 0.05, n = 5$ ). **Conclusions** TNF- $\alpha$  can activate TLR-4/NF- $\kappa\text{B}$  inflammatory pathways and increase secretion of pro-inflammatory cytokines (MCP-1), while decrease the secretion of anti-inflammatory cytokines (adiponectin) in 3T3-L1 adipocytes. Acylated ghrelin can antagonise TNF- $\alpha$ -induced activation of TLR-4/NF- $\kappa\text{B}$  pathway in a dose-dependent manner in mouse 3T3-L1 adipocytes, but can not completely improve the secretion disorder of MCP-1 and adiponectin.

肥胖患者体内存在着以脂肪组织巨噬细胞浸润为特征的慢性炎症状态<sup>[1]</sup>。近年来研究发现,肥胖症最大的健康危害不是脂肪组织本身,而是脂肪组织炎症。脂肪组织的慢性炎症状态可导致脂肪细胞因子促炎因子和抗炎因子分泌的平衡被打乱<sup>[2,3]</sup>。Ghrelin 是胃黏膜细胞分泌的一种胃肠肽激素,酰基化 Ghrelin 为其主要活性形式。研究表明, Ghrelin 具有多种生物作用。其中,令我们感兴趣的是它不但具有改善大血管内皮功能、刺激心血管内皮细胞生成、降低血压、改善充血性心力衰竭等多种有益心血管的作用<sup>[4-7]</sup>,还具有抗化学性炎症和感染性炎症的作用。不仅如此,我们前期研究发现,酰基化 Ghrelin (1、10、100 nmol/L) 亦具有抗代谢性炎症的作用<sup>[8]</sup>。酰基化 Ghrelin 是否能改善肥胖状态下脂肪组织炎症所致促炎症因子和抗炎因子分泌功能紊乱呢? 为此,本实验采用肥胖状态下,巨噬细胞与脂肪细胞相互作用正反馈中经典的炎症因子肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumour necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 干预脂肪细胞,在体外模拟脂肪组织炎症,探讨酰基化 Ghrelin 对脂肪细胞遭受炎症因子介导的炎症损伤是否具有保护作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

3T3-L1 小鼠脂肪细胞株(美国德州大学医学健康中心圣安东尼奥分校刘峰教授惠赠)、胎牛血清及高糖 DMEM 培养基(Gibco)、青/链霉素混合液及胰蛋白酶消化液、3-异丁基 1-甲基黄嘌呤、牛胰岛素、地塞米松、油红 O 染料和 TNF- $\alpha$  (Sigma)、酰基化 Ghrelin (Anaspec)、RIPA 细胞裂解液 (Biomed)、BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo)、TRIzol 及 RT-PCR 引物 (Invitrogen)、兔抗鼠 Toll 样受体 4 抗体 (Toll-like receptor 4, TLR-4) (Cell Signal)、兔抗鼠 GAPDH 抗体 (Abcom)、PVDF 膜 (Eppendorf)、增强化学发光 (ECL) 试剂盒 (Millipore)、小鼠脂联素 ELISA 试剂

盒 (R&D)、小鼠单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) ELISA 试剂盒 (Ray-Biotech)。

### 1.2 3T3-L1 前脂肪细胞的培养及诱导分化

3T3-L1 小鼠脂肪细胞接种于含 10% 胎牛血清、1% 青/链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基中,置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中,隔日换液,待细胞长至 70%~80%,用含 0.25% EDTA 的胰酶按比例消化传代。或者待细胞生长至完全融合后 2 天时开始诱导分化(即第 1 天):将培养液换成含 10% 胎牛血清、11.2 g/L 3-异丁基 1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、6 g/L 牛胰岛素、2 g/L 地塞米松的高糖 DMEM 诱导分化液 1 刺激。3 天后(即第 4 天),撤去诱导分化液 1,换用只含 6 g/L 牛胰岛素的含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 诱导分化液 2,3 天后(即第 7 天)再次换诱导分化液 2,第 9 天时换用含 10% 胎牛血清的普通 DMEM 高糖培养液,诱导分化 10 天左右,3T3-L1 细胞 90% 呈脂肪细胞表型,细胞内可见明显脂滴。

### 1.3 油红 O 染色法鉴定脂肪细胞

移去诱导分化结束后细胞的培养基,用 PBS 洗 3 次,用 4% 甲醛室温下固定细胞 30 min,弃去固定液;PBS 洗 2 次,然后将细胞晾干,加入油红 O 染液,室温下染色 1.5 h,弃去染色剂,用蒸馏水洗去未着色的染料,倒置显微镜下观察。

### 1.4 实验分组

将 3T3-L1 脂肪细胞分为:对照组、TNF- $\alpha$  处理组(100  $\mu\text{g/L}$  的 TNF- $\alpha$  孵育 3T3-L1 小鼠脂肪细胞 24 h)、酰基化 Ghrelin 处理组(酰基化 Ghrelin 1.5 pmol/L、15 pmol/L、150 pmol/L、1500 pmol/L 干预细胞 28 h)以及酰基化 Ghrelin + TNF- $\alpha$  处理组(100  $\mu\text{g/L}$  的 TNF- $\alpha$  处理前分别加入 1.5 pmol/L、15 pmol/L、150 pmol/L、1500 pmol/L 的酰基化 Ghrelin 孵育 4 h)。

### 1.5 实时荧光定量 PCR 检测 3T3-L1 脂肪细胞 Toll 样受体 4 mRNA 的表达

PBS 清洗 3T3-L1 脂肪细胞后,参照说明书,用

TRIzol 试剂从培养的细胞中抽提总 RNA。用紫外蛋白质核酸分析仪测 RNA 浓度及纯度。以 18 S 作为内参基因。小鼠 TLR-4 引物序列为正义链 5'-TTTAT-TCAGAGCCGTTGGTG-3', 反义链 5'-CAGAGGATT-GTCCTCCCATT-3'。内参 18 S 引物序列为正义链 5'-AGTCCCTGCCCTTTGTACA CA-3', 反义链 5'-CGATC-CGAGGGCCTCACTA-3'。使用 Roche 的 FastStart Universal SYBR Green Master(Rox) 以及 Thermo 的 Prime-Script two Step™ RT-PCR Kit II 试剂盒, 按说明书配成体系后进行 PCR 反应(反应体系 20  $\mu$ L), 反应结束后, 确认扩增曲线和融解曲线, 得出 Ct 值, 计算 TLR-4 基因的 Ct 值与 18 S 的 Ct 值的差值  $\Delta$ Ct, 以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  作为 TLR-4 mRNA 的相对含量。

### 1.6 Western blot 分析技术检测 3T3-L1 脂肪细胞 Toll 样受体 4 和核因子 $\kappa$ B p65 磷酸化蛋白的表达

用 PBS 清洗诱导分化成熟的 3T3-L1 脂肪细胞 2 次, 用 RIPA 裂解液与 PMSF 以 98:2 混合后, 裂解细胞提取蛋白。使用 BCA 蛋白定量试剂盒将各组蛋白浓度调成一致, 各组取蛋白样品 30  $\mu$ g, 以 20% 比例加入 SDS 凝胶加样缓冲液, 98 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min 待用。以样品中的 GAPDH 为内参, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜, 然后用含 10% 脱脂奶粉 TBST 封闭 PVDF 膜 1 h, 用抗体稀释液将所有蛋白的一抗按比例稀释成工作液, 将聚偏氟乙烯(PVDF)膜在一抗中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 然后移除一抗工作液, 在摇床上用 TBST 洗膜, 漂洗 15 min 三次, 配制二抗工作液, 用 5% 脱脂牛奶将二抗按 1:3000 比例稀释, 将 PVDF 膜二抗室温下孵育 1 h, 漂洗 15 min 三次, 用 ECL 化学发光显色剂, Image Lab 软件扫描显影保存。

### 1.7 ELISA 检测各组细胞培养上清液中脂联素、单核细胞趋化蛋白 1 水平

试剂盒提前 30 min 从 4 $^{\circ}$ C 冰箱中取出, 使试剂及酶标板均平衡至室温。设置空白孔、标准孔、待测样品孔。按试剂盒使用指南分别在每个孔内加入一定量标准液(MCP-1 100  $\mu$ L, 脂联素 50  $\mu$ L)(MCP-1 浓度分别为 0 ng/L、2.74 ng/L、8.23 ng/L、24.69 ng/L、74.07 ng/L、222.2 ng/L、666.7 ng/L、2000 ng/L; 脂联素浓度依次为 0  $\mu$ g/L、0.16  $\mu$ g/L、0.31  $\mu$ g/L、0.62  $\mu$ g/L、1.25  $\mu$ g/L、2.5  $\mu$ g/L、5  $\mu$ g/L 和 10  $\mu$ g/L) 或待测样品后孵育, 洗涤后每孔加入 100  $\mu$ L 工作液, 摇匀后孵育。弃去液体, 在无尘纸上倒扣轻拍甩干后, 每孔加 400  $\mu$ L 洗涤液, 充分洗涤 4~6 次后, 倒扣轻拍甩干。每孔加 100  $\mu$ L 底物溶液, 轻摇晃混匀, 覆盖薄膜, 室温孵育。每孔加

100  $\mu$ L 终止溶液, 轻摇晃混匀终止反应, 确保孔内无气泡。立即使用酶标仪在试剂盒要求的波长下(MCP-1 在 450 nm 波长, 脂联素在 570 nm 波长)测量各孔的吸光度值(OD 值)。使用酶标仪自带程序做出标准曲线, 并计算待测样品(脂联素或 MCP-1)浓度。

### 1.8 统计学处理方法

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理。所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两组间比较采用最小显著差法(LSD)检验。 $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 前脂肪细胞的诱导分化及鉴定

诱导分化前的 3T3-L1 脂肪细胞呈典型的梭形, 形态与成纤维细胞相似, 胞浆中无脂滴。细胞完全汇合后, 3T3-L1 脂肪细胞处于生长停滞状态, 此时行诱导分化, 分化第 4 天, 细胞变大变圆, 细胞中有脂滴出现。诱导分化第 8 天, 出现细胞双核现象。诱导分化第 10 天时, 90% 的 3T3-L1 前脂肪细胞都分化为成熟的脂肪细胞, 表现为细胞浆丰富, 含有大量的脂滴, 脂滴分布于核周围, 形成戒环样结构, 为典型的成熟脂肪细胞形态, 油红 O 染色后脂滴着红色(图 1)。

### 2.2 酰基化 Ghrelin 对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 孵育的 3T3-L1 脂肪细胞 Toll 样受体 4 mRNA 水平的影响

与对照组相比, TNF- $\alpha$  处理组 TLR-4 mRNA 水平显著增加( $P < 0.01$ ), 1.5 pmol/L、15 pmol/L 以及 150 pmol/L 浓度下酰基化 Ghrelin 处理组 TLR-4 mRNA 水平明显下降( $P < 0.05$ ; 图 2)。与 TNF- $\alpha$  处理组相比, 随着 TNF- $\alpha$  干预前酰基化 Ghrelin 干预浓度的增加, TLR-4 mRNA 水平呈下降趋势, 在浓度为 15 pmol/L 及 150 pmol/L 时下降明显, 且在 150 pmol/L 处达最低值( $P < 0.01$ ; 图 2)。

### 2.3 酰基化 Ghrelin 对肿瘤坏死因子 $\alpha$ 孵育的 3T3-L1 脂肪细胞 Toll 样受体 4、核因子 $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, 与对照组相比, TNF- $\alpha$  处理组 TLR-4 及 NF- $\kappa$ B p65 蛋白水平显著上调( $P < 0.01$ ), 各浓度酰基化 Ghrelin 处理组 TLR-4 蛋白及 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化蛋白水平均明显下降, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ; 图 3)。与 TNF- $\alpha$  处理组相比, 随着 TNF- $\alpha$  干预前酰基化 Ghrelin 干预浓度的增加, TLR-4 蛋白及 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化蛋白水平



均明显下降,且在 150 pmol/L 处达最低值 ( $P < 0.01$ ;图 3)。

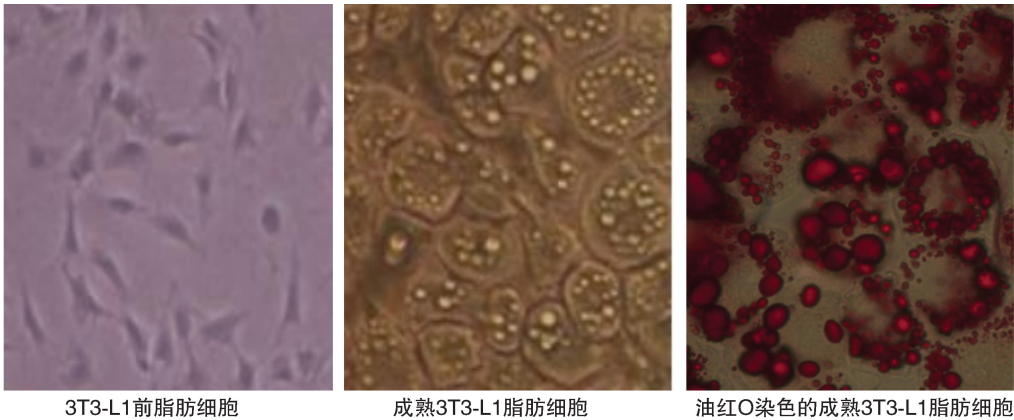


图 1. 3T3-L1 前脂肪细胞诱导分化成熟的鉴定(40 × )  
Figure 1. The appraisal of 3T3-L1 pre-adipocytes differentiation into mature adipocytes (40 × )

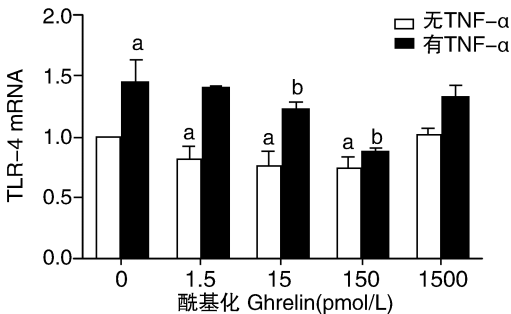


图 2. 酰基化 Ghrelin 对 TNF- $\alpha$  孵育的 3T3-L1 脂肪细胞 TLR-4 mRNA 表达的影响( $n=5$ ) a 为  $P<0.05$ ,与对照组相比;b 为  $P<0.05$ ,与 TNF- $\alpha$  处理组相比。  
Figure 2. The effect of acylated ghrelin on the Toll-like receptor 4 mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes incubated by TNF- $\alpha$ ( $n=5$ )

2.4 酰基化 Ghrelin 对肿瘤坏死因子  $\alpha$  孵育的 3T3-L1 脂肪细胞分泌脂联素以及单核细胞趋化蛋白 1 的影响

ELISA 结果显示,与对照组相比,TNF- $\alpha$  处理组细胞上清液中炎症因子 MCP-1 的浓度显著上调( $P < 0.01$ ),而脂联素浓度明显下调( $P < 0.05$ ),酰基化 Ghrelin 处理组随着 Ghrelin 浓度的增加, MCP-1 的浓度有下降趋势,但差异不显著( $P > 0.05$ ;表 1);同时,脂联素浓度亦呈下降趋势,且在 15 pmol/L 处下降明显,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;表 1)。与 TNF- $\alpha$  处理组相比,随着 TNF- $\alpha$  干预前酰基化 Ghrelin 干预浓度的增加,细胞上清液中 MCP-1 及脂联素浓度均无明显改变( $P > 0.05$ ;表 1)。

表 1. 酰基化 Ghrelin 对 TNF- $\alpha$  孵育的 3T3-L1 细胞培养上清液中 MCP-1、脂联素浓度的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )  
Table 1. The effect of acylated ghrelin on the concentration of MCP-1 and adiponectins in 3T3-L1 adipocytes incubated by TNF- $\alpha$ ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

分 组	MCP-1( ng/L)	脂联素( $\mu$ g/L)
对照组	41.92 $\pm$ 13.96	6.56 $\pm$ 0.97
TNF- $\alpha$ 处理组	1968.09 $\pm$ 44.24 <sup>a</sup>	4.91 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>
1.5 pmol/L 酰基化 Ghrelin 组	81.03 $\pm$ 17.87 <sup>b</sup>	6.56 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>
15 pmol/L 酰基化 Ghrelin 组	32.81 $\pm$ 4.53 <sup>b</sup>	5.12 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>
150 pmol/L 酰基化 Ghrelin 组	47.26 $\pm$ 1.57 <sup>b</sup>	5.12 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>
1500 pmol/L 酰基化 Ghrelin 组	38.25 $\pm$ 2.88 <sup>b</sup>	5.03 $\pm$ 1.33 <sup>a</sup>
1.5 pmol/L 酰基化 Ghrelin + TNF- $\alpha$ 组	1919.90 $\pm$ 99.05 <sup>a</sup>	4.57 $\pm$ 0.86 <sup>a</sup>
15 pmol/L 酰基化 Ghrelin + TNF- $\alpha$ 组	2068.16 $\pm$ 94.41 <sup>a</sup>	4.86 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup>
150 pmol/L 酰基化 Ghrelin + TNF- $\alpha$ 组	1866.48 $\pm$ 29.80 <sup>a</sup>	3.99 $\pm$ 1.19 <sup>a</sup>
1500 pmol/L 酰基化 Ghrelin + TNF- $\alpha$ 组	2104.47 $\pm$ 93.70 <sup>a</sup>	5.50 $\pm$ 1.64

a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 TNF- $\alpha$  处理组比较。

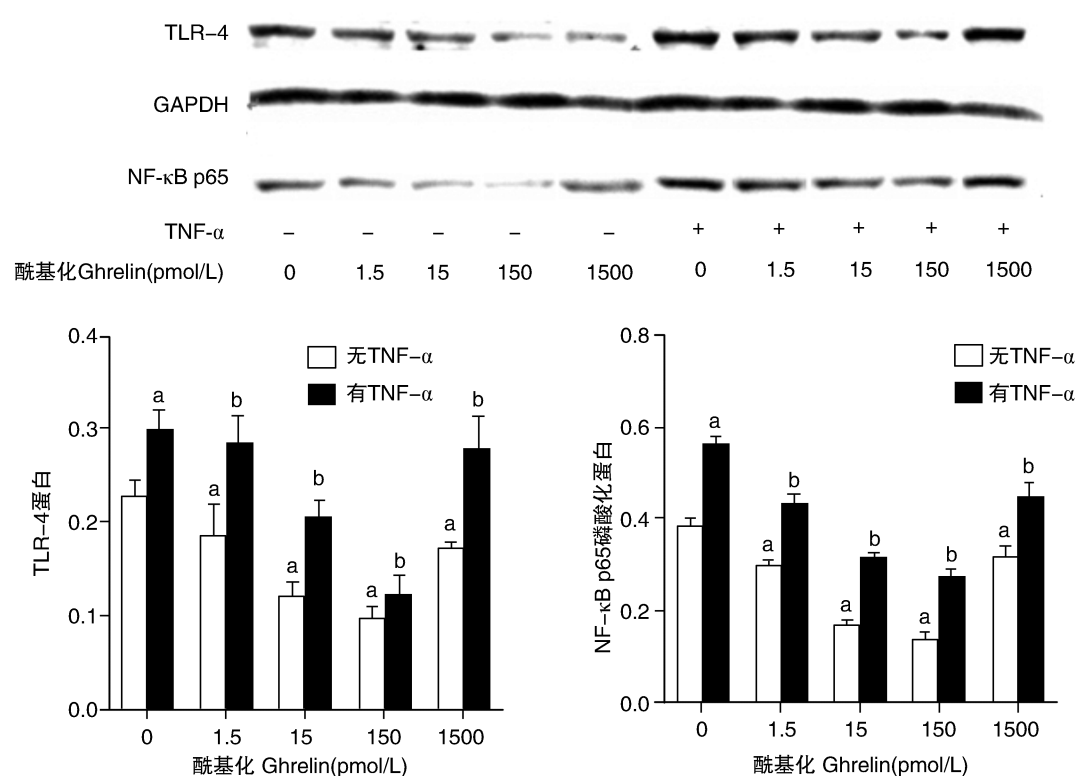


图 3. 酰基化 Ghrelin 对 TNF- $\alpha$  孵育的 3T3-L1 脂肪细胞 TLR-4、NF- $\kappa$ B p65 磷酸化蛋白表达的影响 ( $n=5$ ) a 为  $P<0.05$ , 与对照组相比; b 为  $P<0.05$ , 与 TNF- $\alpha$  处理组相比。

Figure 3. The effect of acylated ghrelin on the protein levels of TLR-4 and NF- $\kappa$ B p65 phosphorylation in 3T3-L1 adipocytes incubated by TNF- $\alpha$  ( $n=5$ )

### 3 讨论

在肥胖症及其相关疾病(糖尿病、血脂异常症、动脉粥样硬化、非酒精性脂肪肝等)的发病过程中,对机体造成最大健康危害的不是脂肪组织本身,而是肥胖者体内的慢性炎症状态。美国心脏病学的一项研究发现<sup>[9]</sup>,与单纯肥胖者相比,肥胖伴脂肪组织炎的患者存在更明显的胰岛素抵抗、促动脉粥样硬化因子的表达以及血管内皮的损伤。Wu 等<sup>[10]</sup>发现,肥胖伴炎症的小鼠模型与单纯肥胖小鼠模型相比,前者的胰岛体积明显较小、胰岛  $\beta$  细胞凋亡较多,而且胰岛素的合成及分泌亦被明显抑制<sup>[11]</sup>。提示,肥胖者体内的慢性炎症状态较肥胖本身更需引起重视。

脂肪组织中大量巨噬细胞浸润是肥胖患者慢性炎症状态最为常见的特征<sup>[1]</sup>。脂肪炎症可导致脂肪细胞促炎因子 IL-6、IL-8、MCP-1 等分泌增多,而脂联素等抗炎因子减少。体外模拟脂肪组织炎症的脂肪细胞与巨噬细胞共培养体系发现,巨噬细胞分泌的 TNF- $\alpha$  是导致脂肪细胞分泌紊乱的重要因子<sup>[12]</sup>。为此,本实验采用 TNF- $\alpha$  干预脂肪细胞

模拟脂肪组织炎症。结果显示,与对照组相比, TNF- $\alpha$  处理组成功导致脂肪细胞释放促炎症因子 MCP-1 增加而抗炎因子脂联素减少,提示脂肪细胞炎症模型造模成功。

Ghrelin 是日本学者发现的一种新型脑肠肽,有两种存在形式,酰基化及非酰基化 Ghrelin,其中,酰基化 Ghrelin 为其活性形式。已发现 Ghrelin 可与促生长激素分泌受体 (GHSR) 结合,发挥包括心血管保护等多种作用。近年来的研究提示, Ghrelin 与炎症反应关系密切,其在感染性炎症、类风湿性关节炎等慢性炎症的抑制中扮演重要角色<sup>[13-15]</sup>。本课题组前期研究表明:酰基化 Ghrelin 可抑制棕榈酸诱导的 THP-1 巨噬细胞 TLR-4/NF- $\kappa$ B 信号通路的活化而下调巨噬细胞炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 的释放,提示酰基化 Ghrelin 可发挥抗代谢性炎症的作用。基于 Ghrelin 的心血管保护作用可能与 Ghrelin 抑制脂肪炎症,从而改善脂肪细胞分泌的心血管相关因子紊乱的认识,本研究探讨了 Ghrelin 活性形式的抗脂肪细胞炎作用及其能否改善炎症因子介导的促、抗炎因子分泌损伤。

本研究显示,与 TNF- $\alpha$  处理组比较,酰基化 Gh-

relin 预干预脂肪细胞 4 h 后再加入 TNF- $\alpha$  干预组随着酰基化 Ghrelin 浓度的增加,细胞 TLR-4 mRNA 和蛋白表达,以及 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化蛋白表达明显下降,提示酰基化 Ghrelin 可以抑制脂肪细胞 TLR-4 及 NF- $\kappa$ B 的活化,发挥抗炎作用。但是与 TNF- $\alpha$  处理组比较,各浓度的酰基化 Ghrelin 干预脂肪细胞 4 h 后再加入 TNF- $\alpha$  干预脂肪细胞,脂肪细胞促炎因子 MCP-1 及抗炎因子脂联素的分泌紊乱差异无显著性;结合本实验中单一酰基化 Ghrelin 处理的结果,即与对照组相比,单一酰基化 Ghrelin 处理组随着酰基化 Ghrelin 浓度的增加,脂联素蛋白水平呈下降趋势,且在 15 pmol/L 浓度开始下降明显,差异有统计学意义,以及已有的文献报道<sup>[16]</sup>,我们推测:3T3-L1 脂肪细胞上存在 Ghrelin 受体的表达<sup>[17]</sup>,酰基化 Ghrelin 可部分直接作用于其受体,引起剂量依赖性脂联素分泌抑制。另外,与对照组相比,单一酰基化 Ghrelin 处理组 MCP-1 的蛋白水平有下降趋势,但差异不显著;究其原因,我们推测 TNF- $\alpha$  除了能作用于 TLR-4 受体发挥作用外,尚可与 TNF- $\alpha$  受体结合而直接作用于脂肪细胞,且 TNF- $\alpha$  诱发炎症而上调 MCP-1 的通路除了有 NF- $\kappa$ B 外,尚有 JNK 等多条通路。另外,1.5 pmol/L、15 pmol/L、150 pmol/L 酰基化 Ghrelin 可使 3T3-L1 脂肪细胞 TLR-4 mRNA 以及 TLR-4、NF- $\kappa$ Bp65 磷酸化蛋白的表达下降,而 1500 pmol/L 不降反升,提示酰基化 Ghrelin 对脂肪细胞上 TLR-4/NF- $\kappa$ B 炎症通路的抑制呈现剂量效应性,且该效应在 150 pmol/L 处达到最大。当然,上述推测均需要进一步的研究来证实。

综上,酰基化 Ghrelin 可剂量依赖性削弱炎症因子所致的脂肪细胞炎症通路的活化,虽然不能完全逆转脂肪细胞促炎因子与抗炎因子的分泌紊乱,但却可以为脂肪组织炎症的预防、Ghrelin 生物学作用的认识提供新启示。

#### [参考文献]

- [1] Wu H, Ghosh S, Perrard XD, et al. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity[J]. *Circulation*, 2007, 115: 1 029-038.
- [2] Vazquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity[J]. *Arch Med Res*, 2008, 39: 715-728.
- [3] Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome [J]. *Mol Cell Endocrinol*,

2010, 314: 1-16.

- [4] Iantorno M, Chen H, Kim JA, et al. Ghrelin has novel vascular actions that mimic PI3-kinase-dependent actions of insulin to stimulate production of NO from endothelial cells[J]. *Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(3): E756-764.
- [5] Wang L, Chen Q, Li G, et al. Ghrelin stimulates angiogenesis via GHSR1 $\alpha$ -dependent MEK/ERK and PI3K/Akt signal pathways in rat cardiac microvascular endothelial cells[J]. *Peptides*, 2012, 33(1): 92-100.
- [6] Moazed B, Quest D, Gopalakrishnan V. Des-acyl ghrelin fragments evoke endothelium-dependent vasodilatation of rat mesenteric vascular bed via activation of potassium channels[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 604(1-3): 79-86.
- [7] Hu CZ, Cao YL, Huo HY, et al. Inhibitory effect of ghrelin on nicotine-induced VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 2009, 53(3): 241-245.
- [8] 李新颖, 刘石平, 姚 岚, 等. Ghrelin 对棕榈酸诱导的 THP-1 巨噬细胞上 Toll 样受体 4/转录因子- $\kappa$ B 信号通路活化的作用[J]. *中国糖尿病杂志*, 2012, 20: 692-696.
- [9] Farb MG, Bigornia S, Mott M, et al. Reduced adipose tissue inflammation represents an intermediate cardiometabolic phenotype in obesity[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2011, 58(3): 232-237.
- [10] Wu Y, Wu T, Wu J, et al. Chronic inflammation exacerbates glucose metabolism disorders in C57BL/6J mice fed with high-fat diet [J]. *J Endocrinol*, 2013, 219(3): 195-204.
- [11] Mei M, Zhao L, Li Q, et al. Inflammatory stress exacerbates ectopic lipid deposition in C57BL/6J mice[J]. *Lipids Health Dis*, 2011, 10: 110.
- [12] Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(10): 2 062-068.
- [13] Wang W, Bansal S, Falk S, et al. Ghrelin protects mice against endotoxemia-induced acute kidney injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 297(4): F1 032-037.
- [14] Imazu Y, Yanagi S, Miyoshi K, et al. Ghrelin ameliorates bleomycin-induced acute lung injury by protecting alveolar epithelial cells and suppressing lung inflammation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 672: 153-158.
- [15] Granado M, Priego T, Martín AI, et al. Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2005, 288(3): E486-492.
- [16] Ott V, Fasshauer M, Dalski A, et al. Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression[J]. *Horm Metab Res*, 2002, 34(11-12): 640-645.
- [17] Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(6): 2 988.

(此文编辑 许雪梅)