

# 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 诱导 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗模型的建立

章常华<sup>1,3</sup>, 胡宪红<sup>1</sup>, 张忠伟<sup>2</sup>, 刘玉晖<sup>1</sup>, 余日跃<sup>1</sup>, 徐国良<sup>2\*</sup>

(1. 江西中医学院药学院, 南昌 330004; 2. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004; 3. 中山大学中山医学院药理学教研室, 广州 510080)

**[摘要]** 目的:应用肿瘤坏死因子 $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )诱导 3T3-L1 脂肪细胞,探讨建立可靠胰岛素抵抗(IR)细胞模型的方法。方法:3T3-L1 前脂肪细胞经 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、地塞米松、胰岛素诱导分化成 3T3-L1 脂肪细胞,将其与 20, 10, 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TNF- $\alpha$  共孵育,100  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 胰岛素作用 30 min 刺激脂肪细胞糖转运。以葡萄糖氧化酶法测定培养基上清液葡萄糖含量,观察 TNF- $\alpha$  对脂肪细胞糖摄取的影响,鉴定 IR 模型。结果:TNF- $\alpha$  抑制胰岛素诱导前、后的脂肪细胞糖转运,抑制作用呈剂量依赖性,其中 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TNF- $\alpha$  的抑制率分别为 79.2% 和 81.4% ( $P < 0.05$ )。结论:肿瘤坏死因子 $\alpha$  可诱导 3T3-L1 脂肪细胞产生 IR,这种细胞模型简便、可靠。

**[关键词]** 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; 胰岛素抵抗; 胰岛素; 3T3-L1 细胞

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0171-04

## TNF- $\alpha$ Induced Insulin Resistance Model in 3T3-L1 Adipocyte

ZHANG Chang-hua<sup>1,3</sup>, HU Xian-hong<sup>1</sup>, ZHANG Zhong-wei<sup>2</sup>, LIU Yu-hui<sup>1</sup>, YU Ri-yue<sup>1</sup>, XU Guo-liang<sup>2\*</sup>

(1. Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China; 2. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China; 3. Department of Pharmacology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) on glucose consumption in 3T3-L1 adipocyte and find the method of establishing a cell insulin resistance model. **Method:** The 3T3-L1 preadipocytes were differentiated to 3T3-L1 adipocytes with 1-methyl-3-isobutylxanthine, dexamethasone and insulin. 3T3-L1 adipocytes were exposed to 20, 10, 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TNF- $\alpha$  for 96 h, then added 100  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  insulin for 30 min. The amount of glucose consumption was determined by detecting the glucose content in cell culture supernatants with glucose oxidase (GOD) assay. **Result:** TNF- $\alpha$  markedly decreased both basal and insulin-stimulated glucose uptake. This effect was concentration-dependent, and 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TNF- $\alpha$  decreased glucose uptake of 79.2% and 81.4% ( $P < 0.05$ ) in the basal and 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  insulin-stimulated conditions, respectively. **Conclusion:** 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TNF- $\alpha$  can induce insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. A novel and reliable cell model of insulin resistance is successfully established.

**[Key words]** TNF- $\alpha$ ; insulin resistance; insulin; 3T3-L1 cells

2 型糖尿病(T2DM)、肥胖等疾病正在迅速发展 成为流行性疾病,到 2030 年,全球 2 型糖尿病患者

**[收稿日期]** 20111204(006)

**[基金项目]** 国家科技部 973 计划项目(2010CB530603);江西中医学院重点学科青年教师培养项目(095031)

**[第一作者]** 章常华,在读博士,讲师,从事药理学教学科研工作,E-mail:shengjunqin@163.com

**[通讯作者]** \* 徐国良,博士,教授,从事中药药理学研究,E-mail:xuguoiliang6606@126.com

将达 3.5 亿<sup>[1-2]</sup>, 胰岛素抵抗 (IR) 是它们的共同的发病基础。研究表明, 胰岛素抵抗的发生与慢性炎症有关, 多种炎症因子如白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的表达水平在胰岛素抵抗时明显升高, 参与促进其进展<sup>[3]</sup>。肿瘤坏死因子  $\alpha$  是一种具有多种功能的细胞因子, 能调节许多细胞及生物进程如免疫功能、细胞增殖及能量代谢等, 可导致脂肪细胞产生胰岛素抵抗<sup>[4]</sup>。本文以 3T3-L1 脂肪细胞为研究对象, 肿瘤坏死因子- $\alpha$  与 3T3-L1 脂肪细胞共孵育, 观察处理前后 3T3-L1 脂肪细胞对胰岛素短时刺激的葡萄糖摄取量的变化, 探讨利用肿瘤坏死因子  $\alpha$  建立 3T3-L1 脂肪细胞 IR 模型的可靠性。

## 1 材料

**1.1 细胞** 3T3-L1 前脂肪细胞株由中科院昆明动物所细胞库 (昆明细胞库编号: KCB92010YJ) 提供。

**1.2 试剂** 胎牛血清 (Hyclone, 批号 NVM0344); 高糖/低糖 DMEM (Gibco 公司, 批号 8110102); 青链霉素混合液 (Gibco 公司, 批号 877195); 0.25% 胰蛋白酶消化液 (Gibco 公司, 25200); 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (批号 1416650V), 胰岛素 (批号 I5500), 地塞米松 (D1756), 油红 O 染料 (O0625), 均为 Sigma 公司产品; 鼠肿瘤坏死因子  $\alpha$  (peprotech 公司, 批号 041054); GOD-PAP 法血糖测定试剂盒 (批号 1110131, 中生北控生物科技股份有限公司)。

**1.3 仪器** 二氧化碳培养箱 (MCO-175, 日本 Sanyo 公司), 倒置显微镜 (德国 Leica 公司), 全自动酶标检测仪 (北京中诺远东科技有限公司), VICTOR3 Multilable Plate Counter (Perkin Elmer)。

## 2 方法

**2.1 3T3-L1 前脂肪细胞的培养和诱导分化<sup>[5]</sup>** 在 37 °C 5% 的 CO<sub>2</sub> 的条件下, 用含 10% 胎牛血清、100 kU·L<sup>-1</sup> 青霉素和 100 mg·L<sup>-1</sup> 链霉素的高糖 DMEM 培养 3T3-L1 前脂肪细胞, 待细胞生长至完全融合后 2 d (第 0 天) 时开始诱导分化。将培养液换成含 10% 胎牛血清, 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX), 10 mg·L<sup>-1</sup> 胰岛素, 1.0  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 地塞米松的高糖 DMEM 刺激, 2 d 后撤去 IBMX 和地塞米松等诱导剂, 换用只含 10 mg·L<sup>-1</sup> 胰岛素, 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养 2 d, 之后每 2 d 换用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM, 诱导分化 10 d 左右的 3T3-L1 细胞 90% 呈脂肪细胞表型, 细胞内可见明显脂滴。

**2.2 油红 O 染色法鉴定脂肪细胞<sup>[6]</sup>** 移去诱导分化结束细胞的培养基, 用 PBS 洗 3 次, 用 10% 甲醛

室温下固定细胞 30 min, 弃去固定液, PBS 洗 3 次, 然后将细胞晾干 15 ~ 20 min; 加入油红 O 溶液, 室温下染色 2 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、照相。

**2.3 分组** 将 3T3-L1 脂肪细胞分为非胰岛素刺激组和胰岛素刺激组, 每组再分为对照组, 20, 10, 5  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> TNF- $\alpha$  组; 另设基础 (只加培养基和 TNF- $\alpha$ ) 组。换上含 0.2% 胎牛血清的 DMEM 无血清培养液培养 12 h, 使细胞同步化, 每孔加入含 TNF- $\alpha$  的培养液, 终质量浓度分别为 20, 10, 5  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> TNF- $\alpha$ ; 对照组加入等体积培养液。温育 96 h 后, 诱导组中 4 个实验组均加入 100 nmol·L<sup>-1</sup> 胰岛素继续温育刺激 30 min。

**2.4 测定 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量** 取细胞上清液, 以葡萄糖氧化酶法检测每孔培养液中葡萄糖的含量, 与未接种细胞的空白孔的糖含量均值相减, 计算及比较各组葡萄糖的消耗量。酶标仪测吸光度 (A)。

葡萄糖的浓度 = (待测液 A / 标准液 A)  $\times$  5.5 mmol·L<sup>-1</sup>

**2.5 统计学方法** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 统计分析采用 SPSS 11.5 软件, 组间数据的比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 有统计意义。

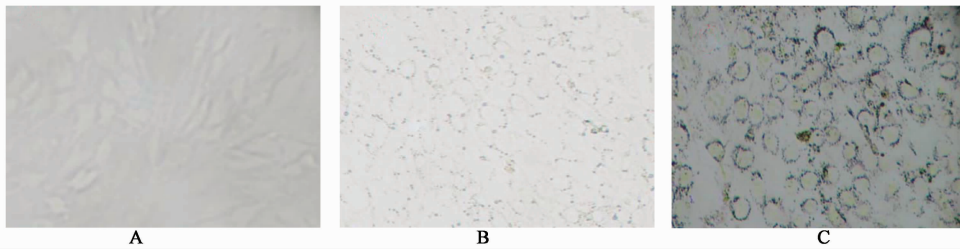
## 3 结果

**3.1 3T3-L1 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。当细胞完全汇合后, 处于生长停滞, 诱导分化第 4 天时, 细胞变大、变圆, 细胞中有脂滴出现, 用油红 O 染色后脂滴着红色。诱导分化第 8 天时, 有较多的细胞出现双核; 诱导分化第 12 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, 油红染色后脂滴着红色 (图 1)。

**3.2 TNF- $\alpha$  对 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量的影响**

**3.2.1 胰岛素非刺激组** 20, 10, 5  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> TNF- $\alpha$  处理 96 h 后, 葡萄糖消耗量较之对照组均有明显下降 (*P* < 0.05), 提示 TNF- $\alpha$  抑制 3T3-L1 脂肪细胞的基础状态葡萄糖消耗量 (表 1), 这种抑制作用呈剂量依赖关系。

**3.2.2 胰岛素刺激组** 对照组中, 100 nmol·L<sup>-1</sup> 胰岛素温育刺激 30 min 后可明显增加脂肪细胞的葡萄糖消耗量 (*P* < 0.05), 说明脂肪细胞对胰岛素敏



A. 3T3-L1 前脂肪细胞; B. 3T3-L1 脂肪细胞; C. 鉴定 3T3-L1 脂肪细胞(油红 O 染色)

图 1 3T3-L1 前脂肪细胞的诱导分化及鉴定 ( $\times 100$ )

感,胰岛素短时刺激可促进 3T3-L1 脂肪细胞糖转运。10, 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TNF- $\alpha$  处理 96 h 后,胰岛素的诱导作用减弱,葡萄糖消耗量较之对照组均有明显下降 ( $P < 0.05$ ),表明在 3T3-L1 脂肪细胞中, TNF- $\alpha$  降低了脂肪细胞对胰岛素的敏感性,抑制胰岛素依赖的葡萄糖转运,这种抑制作用呈剂量依赖性, 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  TNF- $\alpha$  可使胰岛素诱导的糖转运降低 79.2% (胰岛素非刺激组) 和 81.4% (胰岛素刺激组)。见表 1。

表 1 TNF- $\alpha$  对 3T3-L1 脂肪细胞葡萄糖消耗量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

分组	剂量 $/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	葡萄糖消耗量/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	
		非刺激	胰岛素刺激
对照组	-	5.19 $\pm$ 0.45	6.63 $\pm$ 0.32 <sup>1)</sup>
TNF- $\alpha$ 组	5	4.98 $\pm$ 0.23	6.39 $\pm$ 0.36
	10	2.79 $\pm$ 0.52 <sup>1)</sup>	3.34 $\pm$ 0.51 <sup>2)</sup>
	20	1.08 $\pm$ 0.32 <sup>1)</sup>	1.23 $\pm$ 0.67 <sup>2)</sup>

注:与非刺激的对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与刺激的对照组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

#### 4 讨论

胰岛素具有包括调节糖、脂肪、蛋白质代谢等广泛生物学效应,可促进葡萄糖代谢。胰岛素抵抗是一个慢性非特异性炎症过程,炎症物质长期低水平刺激导致了胰岛素抵抗,最终发生 2 型糖尿病。TNF- $\alpha$  是一种具有多种生物功能的细胞因子,研究表明, TNF- $\alpha$  可引起胰岛素抵抗,可能与它能抑制脂肪细胞胰岛素刺激葡萄糖吸收所需多种蛋白有关,如胰岛素受体底物 1 (IRS-1) 和葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4)<sup>[7-9]</sup>,同时, TNF- $\alpha$  能在转录水平上改变它们的表达,特别是 TNF- $\alpha$  能抑制脂肪形成主要调节因子 PPAR $\gamma$  信使 RNA 表达量<sup>[10-12]</sup>。建立 TNF- $\alpha$  诱导 IR 模型,有助于抗胰岛素抵抗新药开发及其分子机制研究。

3T3-L1 脂肪细胞是源于 American type culture collection(美国 ATCC)细胞库,从 Swiss3T3 小鼠胚胎中分离的 3T3-L1 前脂肪细株分化而成,由于 3T3-L1 前脂肪细株生存能力强、细胞纯度高,分化成脂肪细胞的方法、步骤成熟等优点,该细胞已广泛应用于体外 IR 模型及脂肪细胞分泌功能的研究。笔者以 3T3-L1 脂肪细胞为研究对象,将 TNF- $\alpha$  与 3T3-L1 脂肪细胞共孵育诱导 IR。利用葡萄糖氧化酶法比较葡萄糖消耗量的变化,鉴定模型。

实验中我们观察到,对照组脂肪细胞在胰岛素刺激后,葡萄糖消耗量有显著增加 ( $P < 0.05$ ),这可能因为胰岛素促进了脂肪细胞对葡萄糖的吸收。本研究还观察到,10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  剂量组和 20  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  剂量组在胰岛素刺激后,葡萄糖消耗量没有显著增加(各剂量组胰岛素刺激前后比较),表明已成功建立胰岛素抵抗模型。本研究还观察到,不同浓度的 TNF- $\alpha$  与 3T3-L1 脂肪细胞共同孵育 96 h 均使细胞对葡萄糖的摄取能力显著下降,表明 TNF- $\alpha$  能导致 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素抵抗,并影响 3T3-L1 脂肪细胞对葡萄糖的摄取。TNF- $\alpha$  诱导脂肪细胞抵抗模型的方法简便、重复性好,为此类课题研究提供了一个好的技术手段。

#### [参考文献]

- [1] Adilson Guilherme, Joseph V Virbasius, Vishwajeet Puri, et al. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes [J]. Nature, 2008, 9:367.
- [2] Hogan P, Dall T, Nikolov P. Economic costs of diabetes in the US in 2002 [J]. Diabetes Care, 2003, 26:917.
- [3] Victoria Rotter, Ivan Nagaev, Ulf Smith. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- $\alpha$ , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects [J]. J Biol Chem, 2003, 278(46):45777.

## 葛根汤对缩宫素复合寒冷刺激诱导的 寒湿凝滞型原发性痛经小鼠模型的影响

乐心逸, 柴程芝, 寇俊萍, 余伯阳\*

(中国药科大学中药复方研究室, 南京 211198)

**[摘要]** 目的:探讨葛根汤对寒湿凝滞型原发性痛经小鼠模型的影响和可能的作用机制。方法:将 70 只雌性 ICR 小鼠随机分为空白组、模型组、布洛芬组、桂枝茯苓胶囊组和葛根汤低、中、高剂量组,每组 10 只。连续 3 d ip 雌激素使小鼠子宫同步化并进行寒冷刺激,第 4 天 ip 缩宫素注射液造模,观察 30 min 内小鼠扭体次数,并测定子宫匀浆液内钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )和一氧化氮(NO)的水平。造模的同时,布洛芬、桂枝茯苓胶囊、葛根汤低、中、高组分别按 0.12, 1.12, 3.5, 7.0, 14.0  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  的剂量 ig 给药。结果:葛根汤低、中、高剂量均能够有效地抑制缩宫素复合寒冷刺激诱导的扭体反应,抑制率分别为 81.03%, 84.14%, 90.15%;能够提高子宫匀浆液中 NO 水平、降低  $\text{Ca}^{2+}$  水平( $P < 0.001$ ),与目前治疗原发性痛经的一线药物布洛芬和桂枝茯苓胶囊的药效相当。结论:葛根汤能有效缓解缩宫素复合寒冷刺激诱导的子宫平滑肌痉挛,其作用机制可能与影响子宫组织中  $\text{Ca}^{2+}$  和 NO 水平有关。

**[关键词]** 葛根汤; 原发性痛经; 寒湿凝滞

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0174-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120711.1158.007.html>

**[网络出版时间]** 2012-7-11 11:58

**[收稿日期]** 20120311(003)

**[基金项目]** 教育部博士点新教师基金(20110096120011)

**[第一作者]** 乐心逸, 硕士研究生, 从事中药复方作用机制研究, Tel:13813895456, E-mail:eyeeye88@163.com

**[通讯作者]** \*余伯阳, 教授, 博士生导师, 主要从事中西医结合药理学研究, Tel: 025-83271321, E-mail: boyangyu59@163.com

- [4] William P, Cawthorn, Jaswinder K Sethi. TNF- $\alpha$  and adipocyte biology [J]. FEBS Letters, 2008, 582:117.
- [5] Engelman J A, Lisanti M P, Scherer P E. Specific inhibitors of p38 MAP kinase block 3T3-L1 adipogenesis [J]. J Biol Chem, 1998, 273:32111.
- [6] Kasturi R, Joshi V C. Hormonal regulation of stearoyl coenzyme A desaturase activity and lipogenesis during adipose conversion of 3T3-L1 cells [J]. J Biol Chem, 1982, 257:12224.
- [7] Stephens J M, Lee J, Pileh P F. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction [J]. J Biol Chem, 1997, 272:971.
- [8] Ruan H, Miles P D, Ladd C M, et al. Profiling gene transcription *in vivo* reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor- $\alpha$ : implications for insulin resistance [J]. Diabetes, 2002, 51:3176.
- [9] Ruan H, Hacoen N, Golub T R, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor- $\kappa$ B activation by TNF- $\alpha$  is obligatory [J]. Diabetes, 2002, 51:1319.
- [10] Miles P D, Romeo O M, Higo K, et al. TNF- $\alpha$ -induced insulin resistance *in vivo* and its prevention by troglitazone [J]. Diabetes, 1997, 46:1678.
- [11] Peraldi P, Xu M, Spiegelman B M. Thiazolidin-ediones block tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inhibition of insulin signaling [J]. J Clin Invest, 1997, 100:1863.
- [12] Ruan H, Pownall H J, Lodish H F. Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF- $\kappa$ B [J]. J Biol Chem, 2003, 278:28181.

[责任编辑 聂淑琴]