

TNF- α 对培养大鼠脂肪细胞凋亡的影响

林亚秋, 陈国柱, 卢建雄, 杨公社*

(西北农林科技大学动物脂肪沉积与肌肉发育实验室, 杨凌 712100)

摘要: 以 5、10、15 ng/mL 3 种剂量 TNF- α 作用体外培养的大鼠脂肪细胞 0、12、24、36 h 和 48 h, 采用荧光染色计数、流式细胞仪检测脂肪细胞凋亡率; 透射电镜观察脂肪细胞超微结构变化; 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 断裂情况。结果表明, TNF- α 对脂肪细胞具有诱导凋亡作用, 凋亡率在一定范围内具有剂量和时间依赖性, 以 10 ng/mL TNF- α 作用 36 h 为最佳; 电镜下观察可见脂肪细胞形态改变, 出现染色质凝聚、边集和凋亡小体形成等特征性变化; DNA 电泳检测可见处理 24 h 以后出现“梯状”条带, 作用 0 h 和 12 h 未见“梯状”条带。

关键词: TNF- α ; 脂肪细胞; 凋亡

中图分类号: S852.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)08-0823-05

1975 年 Carswell 等^[1]发现, 小鼠接种卡介苗 2~3 周后, 再用内毒素处理几小时, 在动物血清中出现一种因子可使动物肿瘤出现坏死, 称为肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)。1985 年 Shalaby 把巨噬细胞产生的 TNF 命名为 TNF- α , 而将 T 细胞产生的 TNF 命名为 TNF- β 。TNF- α 可由多种组织器官产生, 在脂肪组织中可由前体脂肪细胞和脂肪细胞分泌产生, 是脂肪组织重要的调节因子。TNF- α 在脂肪代谢中具有促进脂肪分解, 抑制脂肪合成, 抑制前体脂肪细胞分化, 诱导前体脂肪、脂肪细胞凋亡等作用^[2]。但由于脂肪细胞自身的特点(核浆比较小, 细胞内存在大量脂滴), 用现有方法很难检测到凋亡, 所以国外学者直到 20 世纪 90 年代才着手研究 TNF- α 对脂肪细胞凋亡的影响, 国内迄今未见报道。本研究采用荧光显微镜、透射电镜、琼脂糖凝胶电泳、流式细胞仪等技术探讨了 TNF- α 对体外培养大鼠脂肪细胞凋亡的影响, 以期对体脂过量沉积的调控提供新的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验动物 试验动物为 20 日龄二级 SD (Sprague-Dawley) 雄性大鼠, 购自第四军医大学实验动物中心(陕西西安)。

1.1.2 主要试剂和仪器 重组大鼠 TNF- α 购自 Pepro Tech 公司, M199 购自 Gibco 公司, 胎牛血清购自兰州民海, 吡啶橙、牛血清白蛋白购自华美生物工程公司; 荧光显微镜(Olympus IX71 型), 流式细胞仪(Elite ESP 型), 透射电子显微镜(TEM-2000EX)。

1.2 方 法

1.2.1 脂肪细胞原代培养 将 SD 大鼠断颈处死, 无菌状态下取腹股沟、附睾远端、肾脏周围的白色脂肪组织, 剪成 1 mm³ 小块, 加消化液(M199+20g/L 牛血清白蛋白, 临用时加入 1g/L 的胶原酶 I) 37℃ 消化 60~70 min(每 5 min 振荡 1 次), 然后依次过 600 目和 150 目的不锈钢细胞筛, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加红细胞裂解液(NH₄Cl 154 mmol/L + KHCO₃ 10 mmol/L + EDTA 0.1 mmol/L), 室温放置 10 min, 离心 5 min, M199 培养液洗后, 再以 5×10⁴/cm² 浓度接种到六孔细胞培养板, 再加适量培养液, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养, 1 d 后换液, 此后每 2 d 换 1 次, 直到 8~10 d 出现成熟脂肪细胞。

1.2.2 脂肪细胞鉴定 PBS 冲洗培养第 8 天爬满细胞的盖玻片, 在 10% 甲醛中固定 30 min, 油红 O 染色 9 min, 60% 异丙醇分色 20 s, 自来水冲洗后, 苏木精染液 1 min, 甘油明胶封片。

1.2.3 脂肪细胞处理 取培养第 8 天的脂肪细胞随机分为试验组和对照组。试验组中分别加入 TNF- α , 终浓度分别为 5、10、15 ng/mL, 在 37℃、5% CO₂ 条件下共培养 12、24、36、48 h, 以未加处理的相应时间段的脂肪细胞作为对照组。

收稿日期: 2004-06-14

基金项目: 国家教委博士点基金资助项目(1998071232)

作者简介: 林亚秋(1976-), 女, 内蒙古阿荣旗人, 博士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究

* 通讯作者: 杨公社, E-mail: gsyang999@sohu.com

1.2.4 脂肪细胞凋亡检测

1.2.4.1 荧光染色观察脂肪细胞凋亡: 收集对照组和试验组的脂肪细胞, 制备活细胞悬液 ($1 \times 10^7/\text{mL}$), 与吖啶橙以 10:1 混合后滴加于 0.8 mm 载玻片上, 加上 0.17 mm 盖玻片封片, 随后在荧光显微镜下观察形态学变化并计数, 每个视野观察 500 个细胞, 重复 3~5 次, 计算凋亡细胞百分比。

1.2.4.2 流式细胞仪检测脂肪细胞凋亡率: 收集对照组和试验组的脂肪细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 经 Annexin V/PI 双染色, Elite 流式细胞仪采集数据, 并用 Cell Quest 专用软件分析, 通过计数凋亡区细胞数量得出凋亡率。

1.2.4.3 透射电镜观察脂肪细胞超微结构变化: 用 0.25% 胰酶消化 10 ng/mL TNF- α 处理 0、12、24、36、48 h 的脂肪细胞, 收集细胞到尖底离心管中, 2 000 r/min 离心 10 min, 2% 戊二醛固定 4 h, 备用。1% 锇酸固定 2 h, 梯度丙酮脱水, 将样品浸入包埋剂 EPON-812 中。超薄切片后, 用乙酸铀染色, 透射电镜观察并照相。

1.2.4.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测脂肪细胞凋亡^[3]: 分别收集 10 ng/mL TNF- α 作用 0、12、24、36、48 h 的脂肪细胞 ($1 \times 10^6/\text{mL}$), 常规方法提取 DNA, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射仪观察并照相。

1.2.5 统计学分析 试验数据以均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示。采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析与显著性检验。

2 结果

2.1 油红 O 染色结果

在光学显微镜下观察经过油红 O 染色苏木精复染后的玻片, 可见脂滴被亲脂的油红 O 着色而呈橘红色, 细胞核因苏木精着色呈蓝色, 细胞液无色。脂滴大小不一, 胞核位于细胞一侧, 核/浆比例变小 (图 1)。

2.2 吖啶橙染色结果

吖啶橙染色后可见正常脂肪细胞核呈均匀黄色或黄绿色荧光, 细胞质呈均匀的橘红色或橘黄色荧光, 细胞大小基本一致; 处理组细胞核呈绿色或暗绿色荧光, 细胞体积缩小, 可见核凝集或碎裂 (图 2)。计数结果见表 1。由表 1 可见经 TNF- α 作用的脂肪细胞凋亡率与对照组相比明显增加 ($P < 0.01$), 但 10、15 ng/mL 两 TNF- α 处理组之间凋亡

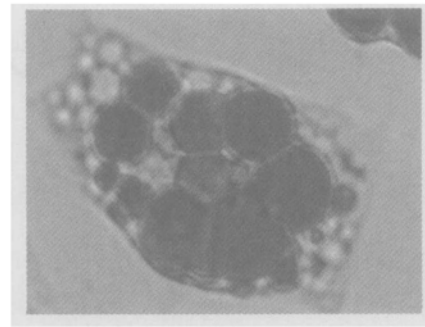


图 1 脂肪细胞油红 O 染色

Fig. 1 Adipocytes stained by oil-red O, 815 \times

率差异不显著 ($P > 0.05$), 以 10 ng/mL 为最佳诱导浓度; 10 ng/mL TNF- α 作用 36 h 和 48 h 无显著差异 ($P > 0.05$), 以 36 h 为最佳诱导时间; 对照组凋亡率在相应时间段没有显著变化。

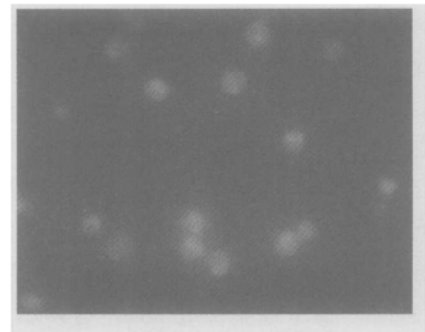


图 2 脂肪细胞吖啶橙染色

Fig. 2 Adipocytes stained by AO method, 163 \times

表 1 荧光染色检测 TNF- α 对大鼠脂肪细胞凋亡率的影响
Table 1 Effects of TNF- α on rat adipocytes apoptotic rate by means of fluorescence staining %

TNF- α 浓度/ (ng/mL) TNF- α Conce- ntration	凋亡率 Apoptotic rate			
	12 h	24 h	36 h	48 h
0 (control)	3.62 \pm 0.07 ^a	3.63 \pm 0.10 ^a	3.64 \pm 0.08 ^a	3.65 \pm 0.06 ^a
5	4.91 \pm 0.02 ^b	7.73 \pm 0.05 ^b	9.02 \pm 0.03 ^b	12.11 \pm 0.08 ^b
10	7.60 \pm 0.05 ^c	17.76 \pm 0.09 ^c	32.72 \pm 0.03 ^c	33.52 \pm 0.06 ^c
15	7.67 \pm 0.09 ^c	17.89 \pm 0.07 ^c	33.41 \pm 0.02 ^c	34.03 \pm 0.09 ^c

同列数值肩标字母不同者之间表示差异显著 ($P < 0.01$), 字母相同者表示差异不显著 ($P > 0.05$), 下表同

Different letters in the same column show significant differences ($P < 0.01$), same letters show no significant differences ($P > 0.05$), the same below

2.3 流式细胞仪检测结果

流式细胞仪检测结果见表 2, 由表 2 可以看出对照组凋亡率在相应时间段没有显著变化; 各处理组脂肪细胞凋亡率与对照组相比显著增加 ($P < 0.01$), 以 10 ng/mL TNF- α 处理组为最佳; 10 ng/mL TNF- α 作用 36 h 和 48 h 凋亡率没有显著差异 ($P > 0.05$), 以 36 h 为最佳诱导时间。

表 2 流式细胞仪检测 TNF- α 对大鼠脂肪细胞凋亡率的影响

TNF- α 浓度/ (ng/mL) TNF- α Conce- ntration	凋亡率 Apoptotic rate			
	12 h	24 h	36 h	48 h
0 (control)	3.627 \pm 0.07 ^a	3.636 \pm 0.10 ^a	3.643 \pm 0.08 ^a	3.655 \pm 0.06 ^a
5	5.03 \pm 0.04 ^b	7.89 \pm 0.02 ^b	9.47 \pm 0.05 ^b	12.50 \pm 0.09 ^b
10	7.79 \pm 0.05 ^c	17.57 \pm 0.07 ^c	33.51 \pm 0.09 ^c	34.11 \pm 0.03 ^c
15	7.83 \pm 0.06 ^c	17.71 \pm 0.04 ^c	34.68 \pm 0.05 ^c	35.02 \pm 0.07 ^c

2.4 透射电镜观察 TNF- α 对大鼠脂肪细胞超微结构的影响

透射电镜观察结果显示, 正常脂肪细胞呈圆形或椭圆形, 表面有微绒毛, 胞质内细胞器丰富, 核不规则位于一侧, 细胞内可见脂滴 (图 3)。经 TNF- α 处理可见不同时期的凋亡细胞, 处理 12-24 h 可见凋亡早期细胞, 即细胞膜完整, 微绒毛消失, 细胞表面光滑, 胞质密度增加, 线粒体聚集成团, 核膜清晰, 染色质凝集成块状, 聚积在核膜边缘 (图 4)。处理 36 h 凋亡细胞增多, 可见早中晚 3 个时期的凋亡细胞, 凋亡中期胞体缩小, 胞膜完整, 核仁完全消失。染色质更加致密, 分布于核膜内侧 (图 5)。处理 48 h 后, 多以晚期凋亡为主, 其变化为细胞核裂解成多个凋亡小体并从细胞表面出芽脱落, 散在细胞间, 最后被巨噬细胞或邻近细胞所吞噬 (图 6)。

2.5 DNA 电泳结果

电泳结果可见, 10 ng/mL TNF- α 处理 24-36-48 h 后, 出现特征性“梯状”条带; 对照组和处理 12 h 未见“梯状”条带 (图 7)。

3 讨论

细胞凋亡 (Apoptosis) 是有机体为保持自身组织稳

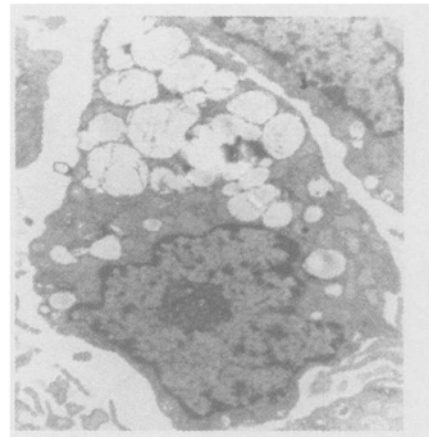


图 3 正常脂肪细胞

Fig. 3 Normal adipocyte, 5 000 \times

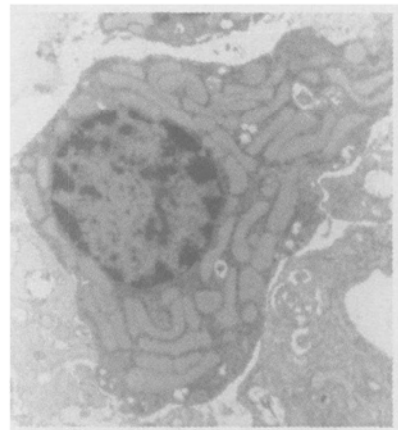


图 4 凋亡早期的脂肪细胞

Fig. 4 Early apoptosis adipocyte, 7 500 \times

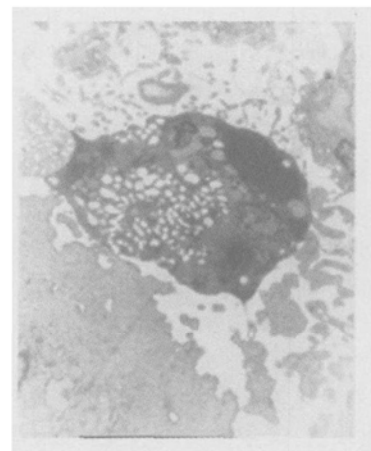


图 5 凋亡中期的脂肪细胞

Fig. 5 Medium term apoptosis adipocyte, 7 500 \times

定, 调控自身细胞增殖和死亡之间的平衡, 由基因控制

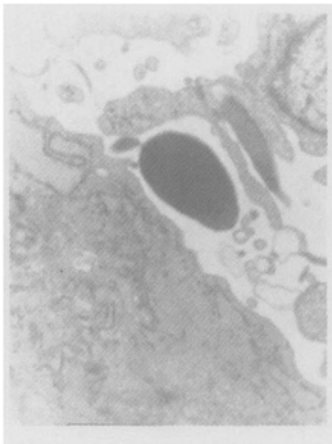
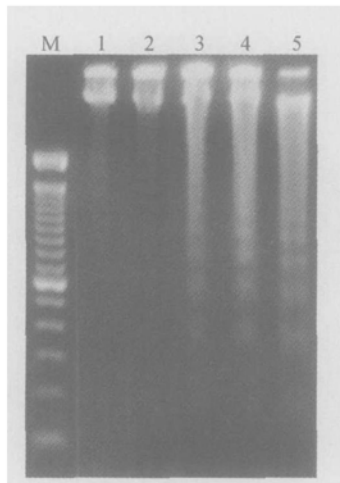


图6 凋亡晚期的脂肪细胞

Fig. 6 Terminal apoptosis adipocyte, 15 000 ×



M. marker; 1. TNF- α treatment after 0 hour;
2. 12 hours treatment; 3. 24 hours treatment;
4. 36 hours treatment; 5. 48 hours treatment

图7 10 ng/mL TNF- α 处理脂肪细胞的 DNA 电泳

Fig. 7 DNA ladder formation after treatment with TNF- α (10 ng/mL) on adipocyte

的细胞主动性死亡过程,具有特殊的形态学和生化特征,不导致明显的炎症反应^[4]。在各种组织中如果细胞凋亡和增殖之间失去平衡,就可引发相应疾病,脂肪组织也不例外。本研究运用荧光显微镜和透射电镜观察 TNF- α 对大鼠脂肪细胞形态的影响,得到凋亡的证据,其形态学变化为:凋亡脂肪细胞的细胞核固缩,染色质凝集成块状,聚积在核膜边缘,细胞体积缩小,胞膜完整,进一步出现膜的气泡化,细胞核裂解为膜包裹的凋亡小体,最后被邻近细胞所吞噬。这与国内外学者对其他种类细胞凋亡变化的描述相一致。脂肪细胞凋亡的形态学检测方法中以透射电镜检测最为可靠,因为它可以观察到细胞结构在凋亡不同时期的变化,

Saafi 研究表明,电镜用于研究早期凋亡比经典的生化指标更具敏感性并且有助于分子机制的研究^[5]。细胞凋亡最明显的生化特征改变是 Ca²⁺ Mg²⁺ 依赖的内源性核酸酶的激活,将细胞核染色体从核小体间断裂,形成由大约 180~200 bp 或其多聚体组成的寡核苷酸片段^[6],DNA 琼脂糖凝胶电泳时出现特征性的梯状条带,本试验采用 10 ng/mL TNF- α 不同时间处理脂肪细胞,经 DNA 电泳可见处理 24 36 48 h 出现梯状条带,处理 12 h 未见梯状条带原因可能是凋亡细胞太少, DNA 片段化所占比例太小所致。

TNF- α 作为一种多效细胞因子,可诱导不同种类的细胞凋亡^[7]。其他研究者已报道了 TNF- α 能够诱导大鼠棕色脂肪细胞和鼠的 3T3-L1 前体脂肪细胞凋亡^[7,8]。本试验运用荧光染色计数与流式细胞仪来检测 TNF- α 对培养大鼠脂肪细胞凋亡的影响,二者结果接近,变化趋势一致,使结果的准确性大大提高。用这样的步骤,笔者筛选出 TNF- α 诱导脂肪细胞凋亡的最佳浓度为 10 ng/mL,而且在 12 h 观察到凋亡,且凋亡率在 12~48 h 之间随处理时间延长而呈上升趋势,但作用 36 h 与 48 h 之间差异不显著,说明 36 h 为最佳诱导时间。这与 Qian 等^[9] 利用浓度为 15 ng/mL 的 TNF- α 处理在 6 h 观察到脂肪细胞凋亡研究结果不一致,原因可能是本试验所用 TNF- α 浓度(10 ng/mL)较低,或者是取样部位不完全相同所致。另外,本试验还运用流式细胞仪检测 10 ng/mL TNF- α 对大鼠前体脂肪细胞凋亡的影响,发现与人类前体脂肪细胞和鼠 3T3-L1 前体脂肪细胞相比^[10,8],凋亡率没有显著提高,这可能是不同细胞培养条件和细胞种类之间的差异造成的。由于脂肪细胞凋亡研究起步较晚,迄今其机制并不十分清楚,笔者推测 TNF- α 诱导脂肪细胞凋亡的机制可能是通过以下途径来实现的, TNF- α 首先与其受体 TNFR1 结合使 TNFR1 胞内三聚化,后者与 TRADD(TNF-receptor associated death domain) 相连接。TRADD 的死亡结构域同时与 FADD(fas associated death domain) 下游的连接分子相连接(caspase8), caspase8 以级联的形式激活 ICE 家族其他成员,裂解它们的死亡底物,引起 DNA 断裂和凋亡细胞的形态学改变^[11]。确切机制有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Carswell E A, Old L J, Kassel R L, et al. An endotoxin-induced serum factor that cause necrosis of tumors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1975, 72: 3 666~ 3 670.
- [2] 雷帆,邢东明,孙虹,等.肥胖相关生物因子的研究[J].中国药理学杂志,2002,37(1):5~8.
- [3] 胡野,凌志强,单小云.细胞凋亡的分子医学[M].北京:北京军事医学科学出版社,2002.480.

- [4] Hansson M. Induction of apoptosis in NK cell by monocyte derived reactive oxygen metabolites [J]. *J Immunology*, 1996, 156(1): 42.
- [5] Saafi E L, Konarkowska B, Zhang S, et al. Ultrastructural evidence that apoptosis is the mechanism by which human amylin evokes death in RINm5F pancreatic islet beta cells [J]. *Cell Biol Int*, 2001, 25(4): 339~ 350.
- [6] Wyllie A H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation[J]. *Nature*, 1980, 284: 555~ 556.
- [7] Almudena P, Alberto M, Ampara V, et al. TNF- α induces apoptosis in rat fetal brown adipocyte in primary culture [M]. *FEBS*, 1997, 416 (3): 324~ 328.
- [8] Niesler C U, Urso B, Prins J B, et al. IGF-I inhibits apoptosis induced by serum withdrawal, but potentiates TNF- α induced apoptosis, in 3T3-L1 preadipocytes [J]. *Endocrinol*, 2000, 167(1): 165~ 174.
- [9] Qian H, Hausman D B, Compton M M, et al. TNF α induces and insulin inhibits caspase3-dependent adipocyte apoptosis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 284(5): 1 176~ 1 183.
- [10] Prins J B, Niesler C U, Winterford C M, et al. Tumor necrosis factor alpha induces apoptosis of human adipose cells[J]. *Diabetes*, 1997, 46: 1 939~ 1 944.
- [11] 姜泊. 细胞凋亡基础与临床[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999. 69~ 71.

Effects of TNF- α on Rat Adipocyte Apoptosis

LIN Ya-qiu, CHEN Guo-zhu, LU Ji-an-xiong, YANG Gong-she*

(Laboratory of Animal Fat Deposition and Muscle Development, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract: The rat adipocytes were treated with 5, 10, 15 ng/mL tumor necrosis factor α (TNF- α) for 0, 12, 24, 36 and 48 hours respectively. The apoptotic rates were determined by means of fluorescent staining and flow cytometry. Ultrastructure of adipocytes was observed by transmission electronic microscopy (TEM) and the DNA fragments were analyzed through agarose gel electrophoresis. The results showed that TNF- α induced the apoptosis of adipocytes and the apoptotic indexes were dependent on the concentration and time. Thus the optimum concentration and time for TNF- α inducing apoptosis was determined at the level of 10 ng/mL and 36 hours. Under the electronic microscope, the characteristics of apoptosis, such as the chromatin condensed and margined, and apoptotic bodies were observed in adipocytes. DNA ladders appeared in 24 hours after treatment, whereas, the ladders did not appear in 0 and 12 hours treatment groups.

Key words: TNF- α ; adipocyte; apoptosis

* Corresponding author

会 讯

4. 第 10 届猪消化生理学研讨会(由欧洲畜牧业协会主办的每 3 年一届的猪生产会议)将于 2006 年 5 月在丹麦召开。

联系人: J. A. Fernández;

E-mail: josea.fernandez@agrsci.dk;

Http://www.dpp2006.dk

5. 第 6 届欧洲农业和食品伦理协会会议将于 2006 年 6 月 21~ 24 日在挪威奥斯陆召开, 详情参见网站(www.eursafe.org)。

6. 诺丁汉大学“猪科学示范”会议将于 2006 年 6 月召开。

E-mail: julian.wiseman@nottingham.ac.uk

7. 第 57 届欧洲畜牧业协会年会将于 2006 年 9 月 17~ 20 日在土耳其安那托利亚召开。大会主席为 S. Metin Yener 教授。

Saltur 旅行社联系方式:

Tel: + 90-312-418-83-00; Fax: + 90-312-425-71-37; E-mail: saltur@eaap2006.gen.tr.