

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.36.006

DHA 对 IFN- γ 诱导的 3T3L1 脂肪细胞 MHC II 及炎症分子表达的影响

喻日成, 罗建华, 范元硕, 刘 波

(贵州省人民医院内分泌科, 贵阳 550000)

[摘要] 目的 探讨二十二碳六烯酸(DHA)对 IFN- γ 诱导的 3T3L1 脂肪细胞组织相容性复合体 II (MHC II) 及炎症分子 MCP-1、IL-6、iNOS 表达的影响。方法 3T3L1 脂肪细胞诱导分化成成熟脂肪细胞, 加入 IFN- γ 诱导炎症反应, 再加入 DHA 处理, 通过 real time-PCR 及 Western blot 观察 DHA 对分化成熟的脂肪细胞 MHC II 及炎症分子 MCP-1、IL-6、iNOS 表达的影响。结果 分化成熟的脂肪细胞加入 IFN- γ 后, MHC II 的相关基因 Ciita 及 H2Ab1, 炎症分子 MCP-1、IL-6、iNOS 明显上升, 加入 DHA 后, Ciita、H2Ab1、iNOS、IL-6 表达明显下调, MCP-1 的变化比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 DHA 能明显下调 IFN- γ 诱导的 3T3L1 成熟脂肪细胞 MHC II 及炎症分子表达, DHA 通过下调 MHC II 基因改善脂肪细胞的炎症。

[关键词] 二十二碳六烯酸; 组织相容性复合体 II; 3T3L1 脂肪细胞**[中图分类号]** R589.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)36-5068-03DHA down-regulates IFN- γ induced MHC II and inflammatory cytokine in 3T3L1 adipocytes

Yu Richeng, Luo Jianhua, Fan Yuanshuo, Liu Bo

(Department of Endocrinology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of DHA on expression of IFN- γ -induced MHC II and inflammatory cytokine in 3T3L1 adipocytes. **Methods** Stimulating the fully differential 3T3L1 cells with IFN- γ , we compared the expression of MHC II genes and inflammatory cytokine in the presence or absence of DHA by real-time PCR and Western blot. **Results** IFN- γ -mediated induction increased the expressions of Ciita, H2Ab1, iNOS, MCP-1, IL-6 in 3T3L1 adipocytes. In the presence of DHA, the expressions of iNOS, IL-6 and Ciita, H2Ab1 were down-regulated. **Conclusion** These results demonstrate that exposure to DHA reduced the level of the expressions of MHC II and inflammatory cytokine in mature 3T3L1 adipocytes and led to a significant reduction in inflammation.

[Key words] docosahexaenoic acid; class II major histocompatibility complex; 3T3L1 adipocytes

肥胖已成为流行的健康问题, 与代谢性疾病, 例如胰岛素抵抗、2 型糖尿病、高血压、非酒精性脂肪肝以及多囊卵巢综合征紧密相关^[1]。肥胖相关的胰岛素抵抗的分子机制目前还不清楚, 但是, 最近的研究已经表明, 低度慢性炎症是发病的重要因素^[2-3]。脂肪细胞产生的脂肪细胞因子启动氧化应激和脂肪组织炎症反应, 分泌促炎性细胞因子, 包括肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、单核细胞趋化因子 (MCP-1), 导致胰岛素抵抗。MHC II 相关基因在脂肪细胞的炎症反应中起重要作用。有研究表明在高脂喂养 2 周的小鼠脂肪细胞中 MHC II 相关基因的表达上调, 并且与脂肪细胞中的 T 细胞促炎因子增加及抗炎因子减少相平行^[4]。二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 有抗炎作用, 但目前其作用机制不清楚, 有研究表明 DHA 可以通过抑制 TLR2/3/4 和 TNF- α 而产生抗炎作用^[5]。本研究主要是探讨 DHA 对 IFN- γ 诱导的 3T3L1 脂肪细胞 MHC II 及炎症分子 MCP-1、IL-6、iNOS 表达的影响, 进而从某方面阐明 DHA 的抗炎机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 3T3L1 脂肪细胞 (ATCC); 低糖 DMEM 培养基: Gibco; 胎牛血清: Gibco; RNA 提取试剂盒: QIAGEN; 逆转录试剂盒: Applied Biosystems; LightCycler® TaqMan® Master: Roche; MCP-1、IL-6、 β -actin 一抗: BD Biosciences; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗: Santa Cruz。

1.2 3T3L1 脂肪细胞分化 10% 小牛血清的 DMEM 高糖培

养液 37℃、5% CO₂ 培养 3T3L1 脂肪细胞, 待细胞生长至 70% 左右, 胰蛋白酶消化, 分别种植在 6 孔板及 24 孔板, 2 d 后细胞生长至 100%, 去除培养液, 加入含 10% FBS, 1 μ M 地塞米松, 0.5 mM 的 IBMX, 10 μ g/mL 胰岛素的高糖 DMEM 培养基中分化 2 d。2 d 后换成含 10% FBS、10 μ g/L 胰岛素的 DMEM 继续分化。6 d 后倒置相差显微镜下观察发现细胞含有较多脂滴, 油红染色证实细胞分化成熟。

1.3 分化成熟的 3T3L1 脂肪细胞处理 分化成熟的 3T3L1 脂肪细胞加入 2 ng/mL 的 IFN- γ , 1 h 后加入 200 μ M 的 DHA, 24 孔板细胞 4 h 后吸干培养液, 加入 RLT 及 β 巯基乙醇裂解细胞, -80℃ 冻存以备提取 RNA。6 孔板细胞加入 200 μ M DHA 培养过夜, 吸干培养液, 用冰 PBS 液洗 3 次, 加入细胞裂解液, 提取总蛋白。

1.4 real time-PCR 检测 MHC II 的相关基因及炎症分子 mRNA 表达

1.4.1 总 RNA 制备 按 QIAGEN 试剂盒说明书介绍的方法提取总 RNA, 采用 Nanodrop ND1000 测量 RNA 的浓度。

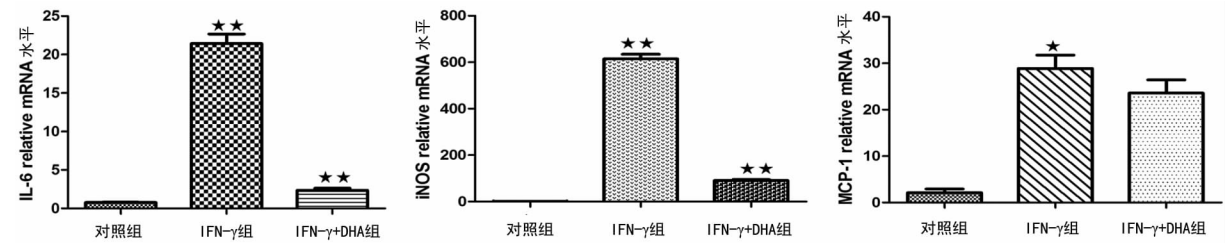
1.4.2 cDNA 合成 按逆转录试剂盒 (Biosystems) 说明合成 cDNA, 总反应体系 20 μ L, 反应条件: 25℃ 10 min, 37℃ 120 min, 85℃ 5 min, 4℃ 后取出样品 -20℃ 保存。

1.4.3 PCR 扩增 PCR 总反应体系为 10 μ L, 含 cDNA 模板 2 μ L, TaqMan® Master 5 μ L, ddH₂O 2.5 μ L, 引物 0.5 μ L。PCR 反应条件: 50℃ 2 min, 95℃ 10 min (1 个循环); 95℃ 5 s, 65℃ 1 min, 72℃ 20 s (45 个循环); 72℃ 5 min (1 个循

环)。每个 real-time PCR 重复 3 次,以 36B4 为管家基因,目的基因的相对表达量通过公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

1.5 Western blot 测量 MCP-1、IL-6、iNOS 蛋白的表达水平

(1)收集处理的细胞,用冰 PBS 液洗 3 次,加入细胞裂解液,提取总蛋白,通过 BCA 方法测量蛋白浓度。(2)将 30 μ g 的蛋白样品加入 10% SDS-PAGE 点样孔,100 v 电压电泳 1 h。(3)电泳完的凝胶转 PVDF 膜,5%的脱脂牛奶封闭,加 MCP-1、IL-6、iNOS 及 β -actin 一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗 3 次,加辣根过氧化物酶标记的二抗常温下 30 min,TBST 洗 3 次。(4)化学发光法显影、定影,将胶片进行扫描拍照,用凝胶图像处理系统分析目标带的相对分子质量和净光密度值。



IFN- γ 组与对照组比较,IL-6、iNOS、MCP-1 mRNA 表达均明显升高,加入 DHA 后,IL-6、iNOS 的表达明显下降,而 MCP-1 的下降比较差异无统计学意义。

图 1 DHA 对 IFN- γ 诱导的 3T3L1 脂肪细胞炎症因子 IL-6、iNOS、MCP-1 mRNA 相对表达量的影响



IFN- γ 组与对照组比较,IL-6、iNOS、MCP-1 mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$),加入 DHA 后,IL-6、iNOS 的表达明显下降 ($P < 0.05$),而 MCP-1 的下降无明显统计学意义 ($P > 0.05$)。

图 2 DHA 对 IFN- γ 诱导的 3T3L1 脂肪细胞炎症因子 IL-6、iNOS、MCP-1 蛋白相对表达量的影响

2.2 DHA 对 IFN- γ 诱导的 3T3L1 脂肪细胞 MHC II 相关基因表达的影响 3T3L1 脂肪细胞加 IFN- γ 诱导后 MHC II 相关基因 Ciita、H2Ab1 表达明显升高 ($P < 0.01$),加入 200 μ M 的 DHA 后,Ciita、H2Ab1 的基因表达明显下降 ($P < 0.05$),见图 3。IFN- γ 可诱导脂肪细胞 MHC II 相关基因的表达,而 DHA 对这种诱导有抑制作用。

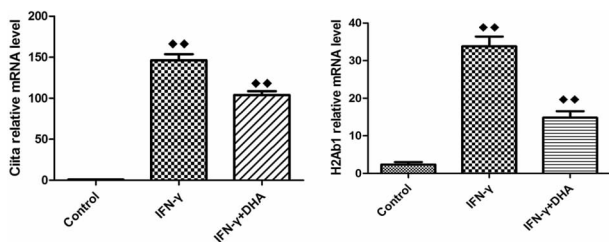


图 3 DHA 对 3T3L1 脂肪细胞 IFN- γ 诱导后 MHC II 相关基因 Ciita、H2Ab1 表达影响

1.6 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数的比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DHA 对 IFN- γ 诱导的 3T3L1 脂肪细胞炎症因子表达的影响 3T3L1 脂肪细胞加 IFN- γ 诱导后 IL-6、iNOS、MCP-1 表达均明显升高 ($P < 0.05$),表明 IFN- γ 可诱导脂肪细胞的炎症反应。IFN- γ 诱导后加入 200 μ M 的 DHA 后,IL-6、iNOS 表达出现明显的下降 ($P < 0.05$),有而 MCP-1 表达虽然有下降,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 1~2。这些结果表明 DHA 对 IFN- γ 诱导的炎症反应有抑制作用。

3 讨 论

脂肪组织不仅是一种储能器官,而且还可以作为一种内分泌器官分泌多种生物活性物质^[6-7]。由脂肪组织分泌的细胞因子有促炎和抗炎作用,促炎性因子分泌增加可导致胰岛素抵抗及多种代谢性疾病如糖尿病、冠心病、高血压。Visser 等^[8]研究表明肥胖患者血液中的炎症标记物 CRP 明显升高。研究结果表明,分化成熟的 3T3L1 细胞加入 IFN- γ 诱导后,炎症分子 IL-6、iNOS、MCP-1 明显升高。IL-6 在脂肪组织中高表达,与肥胖及胰岛素抵抗密切相关,IL-6 可通过增加肝细胞 SOCS3 的表达介导胰岛素抵抗^[9]。MCP-1(CCL2)在脂肪炎症及胰岛素抵抗中的作用尚不清楚,Kanda 等^[10]研究发现在肥胖状态 MCP-1 与巨噬细胞浸润入脂肪组织,胰岛素抵抗及非酒精性肝硬化有关。MCP-1 诱导蛋白导致 3T3L1 细胞活性氧/氮自由基(ROS/RNS)、内质网应激(ER)及 iNOS 的增加。

DHA 具有抗炎的作用,但其作用机制不清楚。DHA 通过抑制多不饱和脂肪酸代谢限速酶基因 FADS1,减少非酒精性脂肪肝的炎症、纤维化及氧化应激^[11-12]。Oh 等^[5]研究证实 DHA 可以通过抑制巨噬细胞的 G 蛋白耦联受体-120 减小炎症及胰岛素抵抗。本研究发现 DHA 可以抑制 IFN- γ 诱导的脂肪细胞炎症因子 IL-6、iNOS 的表达,脂肪细胞炎症因子表达的减少有利于改善外周的胰岛素抵抗。本研究中 DHA 对脂肪细胞 MCP-1 的表达无明显影响。亦有研究表明 MCP-1 基因缺陷的小鼠中脂肪细胞的炎症反应无明显改变^[13]。

IFN- γ 诱导脂肪细胞 MHC II 表达上调,脂肪细胞可作为一种抗原提呈细胞活化 T 细胞,T 细胞活化后可促使巨噬细胞 M1 化,分泌多种促炎因子,导致胰岛素抵抗^[14]。CIITA 作为转录激活因子调控 MHC II 的表达。Gyllenberg 等^[14]研究发现与年龄相关的 CIITA 等位基因频率变化与 1 型糖尿病相关。本研究表明 DHA 能降低 IFN- γ 诱导的 MHC II 相关基因 Ciita、H2Ab1 的表达。MHC II 相关基因表达的下调可以减少脂肪炎症反应,因此,作者推测 DHA 是否通过抑制 IFN- γ 诱

导脂肪细胞 MHC II 表达的下调从而减少脂肪细胞的炎症反应。

DHA 具有明显的抗氧化及抗炎作用,它对脂肪细胞的炎症及 MHC II 相关基因的表达有明显的作用,通过减少脂肪细胞的炎症从而改善胰岛素抵抗,在与肥胖相关的代谢性疾病中有积极的作用,但未来需进一步阐明其作用机制。

参考文献

- [1] Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance[J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(4): 473-481.
- [2] Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, et al. Obesity and severe obesity forecasts through 2030[J]. *Am J Prev Med*, 2012, 42(6): 563-570.
- [3] Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(2): 85-97.
- [4] Deng T, Lyon CJ, Minze LJ, et al. Class II major histocompatibility complex plays an essential role in obesity-induced adipose inflammation[J]. *Cell Metab*, 2013, 17(3): 411-422.
- [5] Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, et al. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects[J]. *Cell*, 2010, 142(5): 687-698.
- [6] Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, et al. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2003, 14(6): 561-566.
- [7] Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease[J]. *Circ Res*, 2005, 96(9): 939-949.
- [8] Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, et al. Elevated C-

reactive protein levels in overweight and obese adults[J]. *JAMA*, 2009, 282(22): 2131-2135.

- [9] Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(16): 13740-13746.
- [10] Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(6): 1494-1505.
- [11] Younce C, Kolattukudy P. MCP-1 induced protein promotes adipogenesis via oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and autophagy[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(2): 307-320.
- [12] Depner CM, Philbrick KA, Jump DB. Docosahexaenoic acid attenuates hepatic inflammation, oxidative stress, and fibrosis without decreasing hepatosteatosis in a Ldlr (-/-) mouse model of western diet-induced nonalcoholic steatohepatitis[J]. *J Nutr*, 2013, 143(3): 315-323.
- [13] Kirk EA, Sagawa ZK, McDonald TO, et al. Monocyte chemoattractant protein deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue[J]. *Diabetes*, 2008, 57(5): 1254-1261.
- [14] Gyllenberg A, Asad S, Piehl F, et al. Age-dependent variation of genotypes in MHC II transactivator gene (CII TA) in controls and association to type 1 diabetes[J]. *Genes Immun*, 2012, 13(8): 632-640.

(收稿日期: 2015-06-15 修回日期: 2015-08-28)

(上接第 5067 页)

- [5] Yin A, Qiu Y, Jia B, et al. Retracted: the developmental pattern of the RAS/RAF/Erk1/2 pathway in the BTBR autism mouse model[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2014, 39: 2-8.
- [6] Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2005, 30(1): 80-89.
- [7] Banerjee S, Riordan M, Bhat MA. Genetic aspects of autism spectrum disorders: insights from animal models[J]. *Front Cell Neurosci*, 2014, 8: 58.
- [8] Shah CR, Forsberg CG, Kang JQ, et al. Letting a typical mouse judge whether mouse social interactions are atypical[J]. *Autism Res*, 2013, 6(3): 212-220.
- [9] Tanimura SI, Nomura K, Ozaki K, et al. Prolonged nuclear retention of activated extracellular signal-regulated kinase 1/2 is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(31): 28256-28264.
- [10] Kalkman HO. Potential opposite roles of the extracellular

signal-regulated kinase (ERK) pathway in autism spectrum and bipolar disorders[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2012, 36(10): 2206-2213.

- [11] Duan W, Wong WS. Targeting mitogen-activated protein kinases for asthma[J]. *Curr Drug Targets*, 2006, 7(6): 691-698.
- [12] Lu KT, Cheng NC, Wu CY, et al. NKCC1-mediated traumatic brain injury-induced brain edema and neuron death via Raf/MEK/MAPK cascade[J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(3): 917-922.
- [13] de Bernardo S, Canals S, Casarejos MJ, et al. Role of extracellular signal-regulated protein kinase in neuronal cell death induced by glutathione depletion in neuron/glia mesencephalic cultures[J]. *J Neurochem*, 2004, 91(3): 667-682.
- [14] Chen J, Rusnak M, Lombroso PJ, et al. Dopamine promotes striatal neuronal apoptotic death via ERK signaling cascades[J]. *Eur J Neurosci*, 2009, 29(2): 287-306.

(收稿日期: 2015-06-16 修回日期: 2015-08-21)