

文章编号:1001-6880(2017)2-0294-06

# 褪黑素抑制 LPS 诱导的脂肪细胞炎症反应及机制

崔雁冰<sup>1,2</sup>, 陈绍红<sup>1</sup>, 刘 铊<sup>1</sup>, 刘艳芬<sup>2\*</sup>, 赵云涛<sup>1\*</sup><sup>1</sup>广东海洋大学食品科技学院现代生化中心; <sup>2</sup>广东海洋大学农学院, 湛江 524088

**摘要:**研究褪黑素对脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导的3T3-L1脂肪细胞炎症反应的抑制作用及机制。体外培养3T3-L1前脂肪细胞并诱导成为成熟的脂肪细胞,用不同浓度的褪黑素(50、100、200 μmol/L)处理2 h后,加入LPS(2 μg/mL)诱导炎症反应,于LPS处理后不同时间,取细胞,qRT-PCR测定肿瘤坏死因子α(Tumor Necrosis Factor Alpha, TNF-α)和白介素6(Interleukin-6, IL-6)的表达情况,Western blot法测定各组总蛋白p-IκBα的表达情况。取上清液,酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测TNF-α和IL-6的分泌情况。结果显示褪黑素显著抑制LPS诱导的3T3-L1脂肪细胞TNF-α和IL-6表达和分泌( $P < 0.05$ ),呈现剂量效果依赖性;Western blot结果表明褪黑素显著抑制LPS诱导的脂肪细胞IκBα磷酸化( $P < 0.05$ )。这表明褪黑素通过降低LPS诱导的脂肪细胞IκBα磷酸化信号通路抑制脂肪细胞炎症反应。

**关键词:**3T3-L1脂肪细胞;褪黑素;炎症反应;NF-κB

中图分类号:R963

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.2.020

## Effect and Mechanism of Melatonin on Inflammatory Response of 3T3-L1 Adipocyte Induced by LPS

CUI Yan-bing<sup>1,2</sup>, CHEN Shao-hong<sup>1</sup>, LIU You<sup>1</sup>, LIU Yan-fen<sup>2\*</sup>, ZHAO Yun-tao<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Modern Biochemistry Center, College of Food Science, Guangdong Ocean University;<sup>2</sup>College of Agriculture, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

**Abstract:** This study aimed to explore the effect and mechanism of melatonin on inflammatory response of 3T3-L1 adipocyte induced by lipopolysaccharide (LPS). 3T3-L1 preadipocytes were cultured and induced to become mature adipose cells. Pretreated with different concentrations of melatonin for 2h, adipocytes were challenged with LPS (2 μg/mL). After treatment with LPS for different time points, supernatant were harvested and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the concentration of TNF-α and IL-6. qRT-PCR were carried out to identify mRNA levels of TNF-α and IL-6. Western blot was used to assay p-IκBα. The results showed that 3T3-L1 adipocyte secreted TNF-α and IL-6 significantly after treatment with LPS. Melatonin significantly reduced TNF-α and IL-6 expression and secretion of 3T3-L1 adipocyte induced by LPS in a dose-dependent manner. Western blot demonstrated that melatonin inhibited IκBα phosphorylation induced by LPS significantly. With these results, it was concluded that melatonin alleviated inflammatory response of 3T3-L1 adipocyte induced by LPS through inhibition of NF-κB signal transduction.

**Key words:**3T3-L1 adipocyte; melatonin; inflammatory response; NF-κB

肥胖常伴有胰岛素抵抗、血脂异常及低度的系统性的炎症状态,是发生糖尿病和心血管疾病的一个重要危险因子。在炎症-胰岛素抵抗-糖尿病这一病理生理过程中,脂肪细胞扮演着重要角色。现已公认脂肪细胞不但是能量储存的场所,其也是一种内分泌细胞,是产生促炎细胞因子的重要场所。脂肪细胞分泌多种脂肪细胞因子如TNF-α、IL-6、瘦素、

抵抗素、脂联素等均参与炎症反应过程,在肥胖和糖尿病发生发展过程中具有重要的作用<sup>[1,2]</sup>。

褪黑素是一种主要由松果腺合成和分泌的有较强生物活性的内源性吲哚类激素,为5-羟色氨酸的衍生物。褪黑素广泛参与中枢神经系统、内分泌系统、生殖系统、免疫系统等多种生理过程,已用于催眠、抗癌、抗心脑血管疾病、抗衰老、抗代谢病等领域的探索性研究。动物实验表明慢性给予褪黑素能抑制体重增加,减少脂肪合成,改善肥胖相关的代谢紊乱<sup>[3-7]</sup>, Brydon<sup>[8]</sup>等研究表明人脂肪细胞上表达有

功能性的褪黑素受体褪黑素 2 受体,褪黑素能改善脂肪细胞分化、增殖和胰岛素抵抗,这表明褪黑素可能参与脂肪细胞生理功能的调控<sup>[9,10]</sup>。

脂肪细胞参与的炎症反应在肥胖和Ⅱ型糖尿病的病理机制中起到关键的作用。目前,褪黑素对脂肪细胞在外界刺激下产生的炎症反应的作用还不清楚,因此本研究探讨了褪黑素对 3T3-L1 脂肪细胞在炎症刺激物 LPS 作用下炎症反应的抑制作用及机理,以期深入探索褪黑素对肥胖和糖尿病相关疾病改善作用的分子机制。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验细胞

3T3-L1 前脂肪细胞购自中国科学院上海细胞库。

### 1.2 主要药品和试剂

褪黑素、胰岛素、3-异丁基-1-甲基-黄嘌呤 (IB-MX)、地塞米松和 LPS 购自 Sigma 公司,胎牛血清 (FBS)、DMEM 高糖培养基、双抗和胰蛋白酶购自 Gibco 公司,抗 actin 抗体、抗 p-IκBα 抗体和 HRP 标记抗兔二抗购自 cell signal technology 公司。PMSF、蛋白酶抑制剂 cocktail 购自 Calbiochem 公司。小鼠 TNF-α 和 IL-6 ELISA 试剂盒购自 eBioscience 公司。Trizol 购自 Life 公司。M-MLV RT 购 Promega 公司。SYBR 测定试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 主要仪器和设备

荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-rad Chromo 4 Four), 二氧化碳培养箱 (德国 ThermoHeracell 150i), 高速冷冻离心机 (日本 HITACHI CR22G III), 超净工作台 (中国苏净), 酶标仪 (美国 BIOTEX ELX808), 倒置荧光显微镜 (德国 Leica DMI 3000B), 高压蒸汽灭菌器 (日本 HIRAYAMA HVE-50)。

## 2 实验方法

### 2.1 3T3-L1 脂肪细胞的培养、诱导及处理

用 DMEM 高糖完全培养基 (10% FBS + 100 U/mL 青、链霉素) 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 3T3-L1 前细胞。取对数生长期的前脂肪细胞接种于 6 孔或 96 孔板中,待细胞生长至接触抑制后 2 d,换含 5 mg/L 胰岛素、0.25 μmol/L 地塞米松、0.5 mmol/L LIBMX 的完全培养基;2 d 后换只含 5 mg/L

胰岛素的完全培养基继续培养;2 d 后换 DMEM 高糖完全培养基,每两天换一次液,诱导分化到第 10 d,采用油红 O 染色鉴定,90% 以上 3T3-L1 前脂肪细胞分化为成熟脂肪细胞,可用于实验。

将成功诱导的脂肪细胞用含有不同浓度褪黑素的完全培养基处理 2 h 后,加入含 LPS 和不同浓度褪黑素的完全培养基 (LPS 终浓度 2 μg/mL) 处理,诱导其产生炎症反应,分别于处理不同时间收获细胞,提取总 RNA (用于荧光定量 PCR 测定) 或提取蛋白 (用于 Western blot 测定),取上清液用于 ELISA 测定。

### 2.2 MTT 法测定细胞活力

将细胞以  $5.0 \times 10^4$  个/mL 的浓度接种于 96 孔板,分别用不同浓度的褪黑素处理,每组四个重复。接种 24 h 后,吸净培养基,用 PBS 漂洗 3 次至无培养基残留,每孔加入 100 μL 含 MTT (5 mg/mL) 的培养基继续培养 2 h,吸掉含 MTT 液,PBS 清洗 3 次,加入 150 μL 的 DMSO 溶解,水平摇床缓慢摇晃 5 min 后于 570 nm 下测定 OD 值。细胞活性按以下公式计算:细胞活性 = OD 值<sub>实验组</sub> / OD 值<sub>对照组</sub> × 100%。

### 2.3 实时荧光定量 PCR 法检测 TNF-α 和 IL-6 表达

于 LPS 处理 3T3-L1 脂肪细胞 12 h 时,PBS 洗涤细胞,Trizol 法提取总 RNA。测定总 RNA 含量与 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值,1.6 < OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> < 2.0 的样品用于后续实验。取 2 μg 总 RNA 以 Oligo(dt) 为引物进行逆转录反应,然后进行荧光定量 PCR 扩增。引物采用 Primer 5.0 软件设计,由上海英潍创津公司合成。引物序列如下:β-actin 上游引物 5'-TTCGTTGCCGGTCCACA-3',下游引物 5'-ACCAGCG-CAGCGATATCG-3'; TNF-α 上游引物 5'-GACCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3',下游引物 5'-CCACT-TGGTGTTTGCTACGA-3'; IL-6 上游引物 5'-AAC-GATGATGCACTTGCAGA-3',下游引物 5'-GAGCAT-TGGAAATTGGGGTA-3'。实时荧光定量 PCR 总反应体系为 25 μL。反应条件为:94 °C 预变性 40 s,94 °C 变性 15 s,62 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 15 s,循环 40 次,每个循环结束检测荧光信号。检测结果采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  相对定量的方法计算<sup>[11]</sup>。

### 2.4 ELISA 法测定 TNF-α 和 IL-6 含量

于 LPS 处理脂肪细胞 24 h 时,取上清,4 °C 离心,上清液采用 ELISA 法对 TNF-α 和 IL-6 含量进行

测定,具体过程按照 eBioscience 公司提供的说明书进行。

## 2.5 Western blot 法检测胞内蛋白 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 表达

待 LPS 处理脂肪细胞 3 h 时,用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次,加入 150  $\mu$ L 混合裂解液,吹打并转移入离心管中,4 ℃剧烈震荡并摇动 15 min,4 ℃离心后取上清,BCA 法测总蛋白浓度;等量蛋白上样,经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后转移至 PVDF 膜上,加入含 5% BSA 的 TBST 封闭 2 h;封闭后加入一抗(抗 actin 抗体 1:2000,抗 p-I $\kappa$ B $\alpha$  抗体 1:1000),4 ℃过夜;弃一抗,洗膜后加入 HRP 标记二抗(1:1000),室温 2 h;洗膜后加入 ECL 化学发光液,化学发光成像仪上成像,采用 Image J 分析软件分析结果。

## 2.6 统计学处理

结果以平均值  $\pm$  标准差表示,利用 SPSS13.0 分析软件对实验数据进行 One-Way ANOVA 分析, $P < 0.05$  表示为差异有统计学意义。

## 3 实验结果

### 3.1 3T3-L1 前脂肪细胞的培养及诱导

3T3-L1 前脂肪细胞为成纤维细胞,呈菱形或梭型且细胞内未见有脂肪滴。诱导分化过程中,渐呈类圆形,胞内出现脂滴并逐渐增多、增大。经过 10 d 的诱导分化处理,3T3-L1 前脂肪细胞出现明显的透亮戒环状的脂滴(图 1A)。油红 O 染色显示,90% 以上细胞含有亮红色颗粒,部分小脂滴融合成大脂滴(图 1B)。

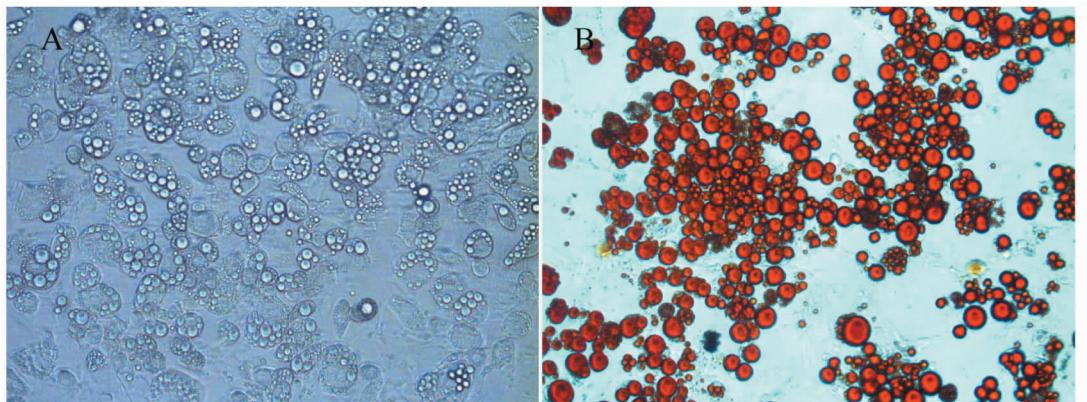


图 1 3T3-L1 脂肪细胞形态学观察(200  $\times$ )

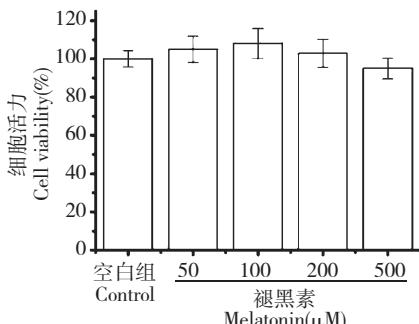
Fig. 1 Morphology of 3T3-L1 adipose cell (200  $\times$ )

A. 诱导第 10d 的脂肪细胞;B. 诱导第 10d 脂肪细胞油红 O 染色

A. 10th day after differentiation; B. Oil Red O staining after differentiation for 10th day.

## 3.2 褪黑素对 3T3-L1 脂肪细胞活性的影响

本实验采用 MTT 法检测褪黑素(50、100、200、500  $\mu$ mol/L)对脂肪细胞活性的影响。结果如图 2



所示,褪黑素处理 24 h 后,与空白对照组相比较,500  $\mu$ mol/L 褪黑素处理组活性略有下降,但统计学差异不显著( $P > 0.05$ ),这说明 500  $\mu$ mol/L 以下浓度的褪黑素对脂肪细胞活性影响不显著。

## 3.3 褪黑素对 3T3-L1 脂肪细胞 TNF- $\alpha$ 和 IL-6 表达的影响

qRT-PCR 分析显示(图 3),与空白组相比,LPS 处理组 TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 的表达显著增加( $P < 0.01$ );与 LPS 处理组相比,褪黑素 50  $\mu$ mol 处理可降低细胞内 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达水平,但对 IL-6 mRNA 的表达水平下降无统计学差异;而较高浓度褪黑素(100、200  $\mu$ mol)干预后能显著降低 LPS 诱导的 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达上调。

图 2 褪黑素对脂肪细胞活性的影响( $n = 4, \bar{x} \pm S$ )

Fig. 2 Effect of melatonin on 3T3-L1 adipocyte viability ( $n = 4, \bar{x} \pm S$ )

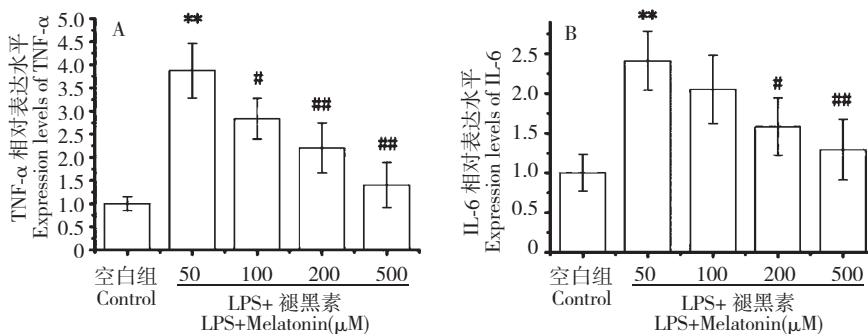


图 3 褪黑素对 LPS 诱导的 3T3-L1 TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达的影响 ( $n = 3, \bar{x} \pm S$ )

Fig. 3 Effect of melatonin on TNF- $\alpha$  and IL-6 expression of 3T3-L1 adipocyte induced by LPS ( $n = 3, \bar{x} \pm S$ )

注:与空白组比较差异极显著, \*\*  $P < 0.01$ ;与 LPS 处理组比较差异显著, #  $P < 0.05$ ;与 LPS 处理组比较差异极显著, ##  $P < 0.01$

Note: Compared with control, \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with LPS treatment group, #  $P < 0.05$ ; Compared with LPS treatment group, ##  $P < 0.01$

### 3.4 褪黑素对 3T3-L1 脂肪细胞 TNF- $\alpha$ 和 IL-6 分泌的影响

ELISA 结果显示, LPS 显著诱导 3T3-L1 脂肪细胞产生炎症反应, 分泌大量 TNF- $\alpha$  和 IL-6。用不同浓度的褪黑素处理明显降低 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的分泌

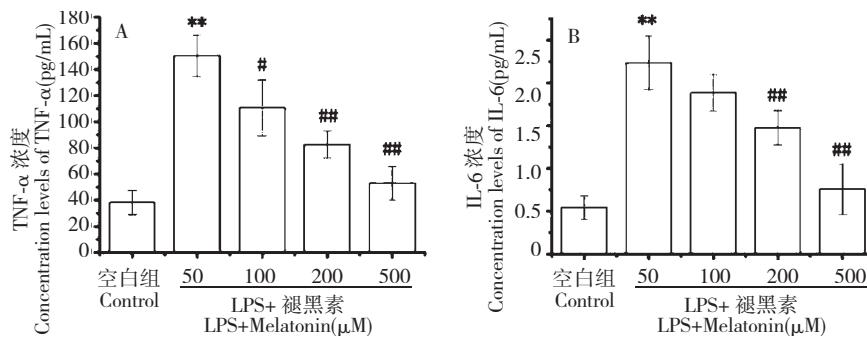


图 4 褪黑素对 LPS 诱导的 3T3-L1 TNF- $\alpha$  和 IL-6 分泌的影响 ( $n = 3, \bar{x} \pm S$ )

Fig. 4 Effect of melatonin on TNF- $\alpha$  and IL-6 secretion of 3T3-L1 adipocyte induced by LPS ( $n = 3, \bar{x} \pm S$ )

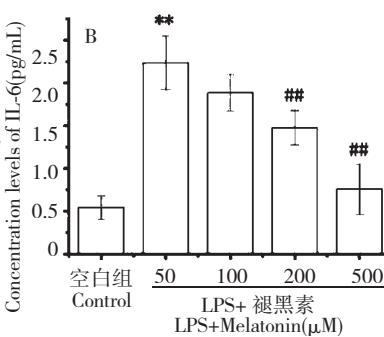
注:与空白组比较差异极显著, \*\*  $P < 0.01$ ;与 LPS 处理组比较差异显著, #  $P < 0.05$ ;与 LPS 处理组比较差异极显著, ##  $P < 0.01$

Note: Compared with control, \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with LPS treatment group, #  $P < 0.05$ ; Compared with LPS treatment group, ##  $P < 0.01$

### 3.5 褪黑素对 3T3-L1 脂肪细胞 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 含量的影响

已知转录因子 NF- $\kappa$ B 激活的信号通路广泛参与了 LPS 诱导的炎症反应。本研究探索了褪黑素对 LPS 激活的 NF- $\kappa$ B 信号通路的抑制作用。结果显示, 经 LPS 处理后, 3T3-L1 脂肪细胞 p-I $\kappa$ B $\alpha$  含量明显增强, 不同浓度的褪黑素处理后显著抑制 3T3-L1 脂肪细胞 p-I $\kappa$ B $\alpha$  含量升高(图 5A)。与 LPS 处理组相比较, 随着褪黑素浓度的逐渐增加, p-I $\kappa$ B $\alpha$  含量明显下降, 差异显著(图 5B)。这说明褪黑素明显降低了 LPS 激活的 3T3-L1 脂肪细胞 NF- $\kappa$ B 信号通路。

量。与 LPS 组相比较, 随着褪黑素浓度的逐渐升高, TNF- $\alpha$  和 IL-6 的分泌量均以一定的剂量依赖方式下降, 差异显著(图 4), 这说明褪黑素明显降低了 LPS 诱导的 3T3-L1 脂肪细胞炎症反应。



## 4 讨论与结论

脂肪组织不但是脂肪储存蓄积的场地, 而且还是一个重要内分泌器官, 在维持机体能量平衡、内环境稳态、免疫应答、内分泌调节等生理过程中具有重要功能。肥胖时脂肪组织过度表达的 TNF- $\alpha$  及瘦素可能诱导 IL-6、CRP 及其他急性反应物的产生, 从而导致长期的慢性炎症状态, 而这种慢性炎症状态可能与肥胖、Ⅱ型糖尿病及其相关疾病的进展有关<sup>[12,13]</sup>。抑制脂肪组织炎症反应是改善肥胖及其相关疾病发展的重要途径。

大量的研究表明褪黑素能明显改善肥胖和Ⅱ型

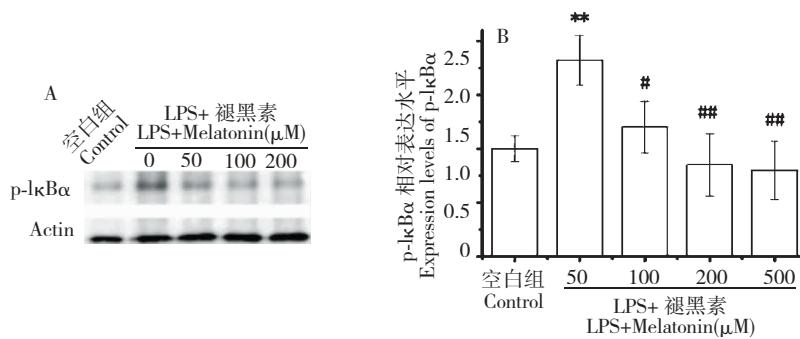


图 5 褪黑素对 3T3-L1 脂肪细胞 p-I<sub>κ</sub>B<sub>α</sub> 含量的影响 ( $n = 3, \bar{x} \pm S$ )

Fig. 5 Effect of melatonin on p-I<sub>κ</sub>B<sub>α</sub> levels of 3T3-L1 adipocyte induced by LPS ( $n = 3, \bar{x} \pm S$ )

注:与空白组比较差异极显著, \*\*  $P < 0.01$ ;与 LPS 处理组比较差异显著, #  $P < 0.05$ ;与 LPS 处理组比较差异极显著, ##  $P < 0.01$

Note: Compared with control, \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with LPS treatment group, #  $P < 0.05$ ; Compared with LPS treatment group, ##  $P < 0.01$

糖尿病症状<sup>[7]</sup>。数据显示褪黑素对肥胖、Ⅱ型糖尿病等的改善作用可能与其抗炎、抗氧化效应有关<sup>[14-16]</sup>。已有的研究表明脂肪细胞存在功能性的褪黑素受体,褪黑素可改善脂肪细胞的胰岛素抵抗,而脂肪组织局部 TNF- $\alpha$  高表达可改变胰岛素受体和胰岛素受体底物-1 结合,从而干扰胰岛素信号转导,引起胰岛素抵抗和糖代谢紊乱,是Ⅱ型糖尿病发病关系密切的原因之一。TNF- $\alpha$  可由多种炎症细胞合成和分泌,脂肪细胞是其重要来源之一。本研究探索了褪黑素对 LPS 诱导的脂肪细胞炎症因子分泌的作用,结果表明褪黑素显著抑制 LPS 诱导的 3T3-L1 脂肪细胞 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的分泌,随着褪黑素浓度的逐渐增大,TNF- $\alpha$ 、IL-6 分泌量呈现明显下降趋势,呈现浓度-效果依赖性。

褪黑素抑制脂肪细胞分泌炎症因子的确切分子机制目前仍不清楚。已知 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎症因子的合成与转录因子 NF- $\kappa$ B 的激活具有重要关系。NF- $\kappa$ B 通过调控许多重要的细胞因子、黏附分子和趋化因子的基因表达参与体内众多炎症反应的发生与发展<sup>[17]</sup>。大量的研究数据证实褪黑素可通过抑制 NF- $\kappa$ B 的活化来减轻炎症反应<sup>[18]</sup>。褪黑素是否通过抑制脂肪细胞 LPS-TLR4-NF- $\kappa$ B 介导的信号具有抑制作用还清楚。我们的研究发现褪黑素能明显降低 LPS 诱导的脂肪细胞 I<sub>κ</sub>B<sub>α</sub> 的磷酸化,从而抑制 NF- $\kappa$ B 介导的信号通路。

综上所述,本研究结果表明褪黑素可通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路改善脂肪细胞炎症反应,这为褪黑素防治肥胖和Ⅱ型糖尿病等代谢性疾病提供了重要的理论依据。

## 参考文献

- Klöting N, Blüher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord*, 2014, 15: 277-287.
- Kohlgruber A, Lynch L. Adipose tissue inflammation in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*, 2015, 15: 92.
- Rasmussen DD, Boldt BM, Wilkinson CW, et al. Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology*, 1999, 140: 1009-1012.
- Puchalski SS1, Green JN, Rasmussen DD. Melatonin effect on rat body weight regulation in response to high-fat diet at middle age. *Endocrine*, 2003, 21: 163-167.
- Nduhirabandi F1, Du Toit EF, Blackhurst D, et al. Chronic melatonin consumption prevents obesity-related metabolic abnormalities and protects the heart against myocardial ischemia and reperfusion injury in a prediabetic model of diet-induced obesity. *J Pineal Res*, 2011, 50: 171-182.
- She M, Deng X, Guo Z, et al. NEU-P11, a novel melatonin agonist, inhibits weight gain and improves insulin sensitivity in high-fat/high-sucrose-fed rats. *Pharmacol Res*, 2009, 59: 248-253.
- Cardinali DP, Hardeland R. Inflammaging, metabolic syndrome and melatonin: A call for treatment studies. *Neuroendocrinology*, 2016, DOI: 10.1159/000446543.
- Brydon L, Petit L, Delagrange P, et al. Functional expression of MT2 (Mel1b) Melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. *Endocrinology*, 2001, 142: 4264-4271.
- She MH(余美华), Hou HJ(侯洪杰), Hu XB(胡小波), et al. Melatonin improving the glucose uptake of 3T3-L1 adipocytes incubated with free fatty acids. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2011, 32: 281-283.