

TNF α 对人脂肪细胞 STEAP4 基因表达的调控

陈小慧¹, 赵亚萍², 朱春¹, 季晨博¹, 张春梅¹, 朱金改¹, 高春林³, 郭锡熔^{1,3}

(1. 南京医科大学附属南京妇幼保健院儿科, 南京 210004; 2. 中国人民解放军第82医院内分泌科, 淮安 223001; 3. 南京医科大学儿科医学研究所, 南京 210029)

[摘要] 目的 人 STEAP4 基因是一个参与胰岛素敏感性调节的肥胖相关差异表达基因, 本研究旨在探讨胰岛素抵抗相关脂源性细胞因子 TNF α 对人成熟脂肪细胞中 STEAP4 基因的调节作用。方法 体外培养人前体脂肪细胞, 在诱导人前体脂肪细胞分化成熟的基础上, 应用不同浓度(0、5、10、25、50 ng/mL)人重组 TNF α 干预成熟脂肪细胞 24 h, 采用实时荧光定量 RT-PCR 技术、Western blot 技术检测干预后人成熟脂肪细胞 STEAP4 基因在核酸和蛋白表达水平的变化。结果 不同浓度 TNF α (5、10、25、50 ng/mL) 干预 24 h 能显著上调人成熟脂肪细胞中 STEAP4 基因的 mRNA 表达, 与未干预对照组差异有显著性($P < 0.05$); 50 ng/mL TNF α 干预时 STEAP4 基因在人成熟脂肪细胞中的 mRNA 表达水平最高。与基因表达结果相一致, 不同浓度 TNF α (5、10、25、50 ng/mL) 干预 24 h 能显著上调人成熟脂肪细胞中 STEAP4 蛋白的表达, 与未干预对照组差异有显著性($P < 0.05$); 干预浓度提高到 25 ng/mL 时干预效果最为明显。结论 TNF α 能显著上调人成熟脂肪细胞中 STEAP4 基因核酸和蛋白的表达。

[中国当代儿科杂志, 2009, 11(12): 1008-1011]

[关键词] STEAP4 基因; 细胞分化; 肿瘤坏死因子; 人前体脂肪细胞

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)12-1008-04

Regulative role of TNF α on STEAP4 gene in matured human adipocytes

CHEN Xiao-Hui, ZHAO Ya-Ping, ZHU Chun, JI Chen-Bo, ZHANG Chun-Mei, ZHU Jin-Gai, GAO Chun-Lin, GUO Xi-Rong. Nanjing Maternal and Child Health Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210004, China (Guo X-R, Email: xrguo@njmu.edu.cn)

Abstract: Objective Human STEAP4, a novel obesity-related gene, is associated with insulin sensitivity regulation in human adipocytes. This study aimed to explore the regulative role of TNF α on STEAP4 gene in matured human adipocytes. **Methods** Human preadipocytes were cultured and differentiated into matured adipocytes *in vitro*. Fully differentiated adipocytes (Day 17) were treated with different concentrations of TNF α (0, 5, 10, 25 and 50 ng/mL) for 24 hrs. Total RNA and protein were extracted from the adipocytes. Levels of STEAP4 mRNA and protein expression were determined by real-time quantitative RT-PCR and Western blot respectively. **Results** Different concentrations (5, 10, 25 and 50 ng/mL) of TNF α treatment for 24 hrs resulted in a significant increase in the STEAP4 mRNA expression of human matured adipocytes. The maximal effect was seen in the 50 ng/mL of TNF α treatment group. In parallel, STEAP4 protein synthesis in matured adipocytes increased in response to TNF α treatment of different concentrations (5, 10, 25 and 50 ng/mL) for 24 hrs. The maximal up-regulated effect was seen in the 25 ng/mL of TNF α treatment group. **Conclusions** TNF α can up-regulate STEAP4 mRNA expression in human matured adipocytes.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(12): 1008-1011]

Key words: STEAP4 gene; Cell differentiation; TNF α ; Human preadipocyte

近年来, II型糖尿病在各国肥胖儿童中的发病率逐渐增高、呈现明显低龄化趋势的现象已经引起儿科学者的深切关注。随全球肥胖儿童人数持续升高其发病率逐渐增高的特征可能使这一疾病在未来演变成为全球性的公共卫生问题^[1,2]。由于胰岛素

抵抗是肥胖儿童 II型糖尿病的主要特征, 而肥胖是胰岛素抵抗发生的重要因素。因此探讨肥胖致胰岛素抵抗的机制也已经成为儿科研究领域的一个重要研究内容。

人 STEAP4 基因是本研究小组 2004 年应用抑

[收稿日期] 2009-04-12; [修回日期] 2009-05-21

[基金项目] 国家自然科学基金(30772364)、江苏省自然科学基金(BK2007230)、教育部基金(20070312001)等项目资助。

[作者简介] 陈小慧, 女, 主治医师, 本科, 硕士生。主攻方向: 儿童肥胖及其并发症。

[通讯作者] 郭锡熔, 男, 主任医师, 教授。南京医科大学儿科医学研究所, 邮编: 210029。

制性差减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)筛选肥胖与正常人网膜脂肪组织获得并克隆到的一条肥胖相关全长新基因。前期研究发现^[3]:*STEAP4*定位于细胞膜,肥胖者脂肪组织中该基因表达显著下调,人脂肪细胞中该基因过表达能显著提高成熟脂肪细胞胰岛素刺激下的葡萄糖摄取率,提示*STEAP4*基因与肥胖及胰岛素敏感性的调节可能相关。深入了解*STEAP4*基因的生物特征将有助于揭示其在肥胖及胰岛素抵抗中的可能功能。由于目前对该基因的调节规律尚无文献报道,而肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)是体内重要的脂源性细胞因子,不但与肥胖密切相关,而且参与胰岛素敏感性调节^[4]。因此本研究选择TNF α 为干预因子,体外干预分化成熟的人脂肪细胞,分析了TNF α 对成熟脂肪细胞*STEAP4*基因的调控作用,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

人前体脂肪细胞株(human preadipocytes-visceral, HPA-v)购自美国 Sciencell 公司,DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 GIBCO 公司,胰岛素、地塞米松、1-甲基-3-异丁基黄嘌呤(MIX)、罗格列酮、人重组 TNF α 购自美国 Sigma 公司,油红 O 染料购自上海化学试剂厂,逆转录试剂购自美国 Promega 公司,实时荧光定量 PCR 中 Master Mix 购自美国 ABI 公司,PCR 引物及探针由上海生工生物工程技术服务有限公司合成、标记,兔抗人 *STEAP4* 抗体购自武汉三鹰公司,兔抗人 β -ACTIN 及鼠抗兔二抗抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 人前体脂肪细胞培养与诱导分化 用完全培养液(DMEM + 10% 胎牛血清 + 青霉素、链霉素 100 U/mL)在 37 $^{\circ}$ C 孵箱(5% CO₂、95% 空气)中培养人前体脂肪细胞,每两天换液一次。细胞生长至完全融合时开始诱导分化,培养液换用含 0.5 mM MIX、1 μ M 地塞米松和 5 μ g/mL 胰岛素的无血清 DMEM 培养液。48 h 后,换液并加用 1 μ M 罗格列酮;于第 4 天起撤去 MIX、地塞米松、罗格列酮,使培养液中只含有 5 μ g/mL 胰岛素。每两天换液一次,至第 14 ~ 17 天约 80% 以上细胞已分化为成熟的脂肪细胞,应用油红 O 染色法验证。

1.2.2 人重组 TNF α 干预 在人前体脂肪细胞诱导分化的第 17 天,将细胞培养液换成分别含重组

TNF α 0、5、10、25、50 ng/mL 的培养液,培养 24 h 后收集细胞,分别观察不同浓度重组 TNF α 干预对人成熟脂肪细胞中 *STEAP4* 基因核酸和蛋白表达的影响。

1.2.3 实时荧光定量 RT-PCR 检测 *STEAP4* 基因 mRNA 表达水平 用 Trizol 一步法提取人脂肪细胞总 RNA。应用实时荧光定量 RT-PCR 法(ABI PRISM 7300 荧光定量 PCR 仪,美国 PE 公司)检测脂肪细胞中 *STEAP4* 基因 mRNA 的表达水平。*STEAP4* 基因上游引物序列:5'-CTCGCCAGCGTCTCCTCT-3',下游引物序列:5'-CGGTTTCTGCCTTGATCTTCAC-3',探针序列:5'-CTTCTCTGTGCCGCTTCTGTGTCTGC-3',产物 133 bp;内参照 18S 基因上游引物序列:5'-CGGGTCCGGAGTGGTAAT-3',下游引物序列:5'-AGTCGCCGTGCCTACCAT-3',探针序列:5'-CGCCTGCTGCCTTCCTTGATGTG-3',产物 129 bp。探针 5'端标记荧光报告基团 FAM (6-Carboxy-fluorescein),3'端标记荧光淬灭基团 TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamine)。PCR 扩增反应条件为:50 $^{\circ}$ C 2 min、95 $^{\circ}$ C 10 min 后,以 95 $^{\circ}$ C 15 s、66 $^{\circ}$ C 1 min 循环 40 次。采用参照基因的 Δ CT 法计算 *STEAP4* mRNA 的相对表达量: $STEAP4$ mRNA 相对表达量 = $2^{(CT(18S) - CT(STEAP4))}$ 。

1.2.4 Western blot 法检测 *STEAP4* 蛋白表达水平

RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,将蛋白变性后于 10% SDS-PAGE 上凝胶蛋白电泳,每泳道 20 μ g 蛋白。然后将蛋白电泳条带转移至经甲醇活化处理过的 PVDF 膜上,室温下用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 2 h,弃去封闭液后,加入 1:1 000 兔抗人 *STEAP4* 多克隆抗体或 1:1 000 兔抗人 β -ACTIN 抗体,4 $^{\circ}$ C 摇匀过夜,洗涤后加入二抗,室温度孵育 1 h 后再次洗膜,最后按 ECL 试剂说明书要求显影,图像分析系统扫描灰度值。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.5 软件进行统计学分析,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间均数比较采用方差分析 *F* 检验后,进一步采用 *q* 检验进行组间两两比较。*P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 人重组 TNF α 对人成熟脂肪细胞 *STEAP4* 基因核酸表达水平的调控

由表 1 可见,不同浓度 TNF α 干预 24 h 均能显著上调人成熟脂肪细胞中 *STEAP4* 基因的 mRNA 表达。5 ng/mL 干预 24 h 即能显著上调 *STEAP4*

mRNA的表达($P < 0.05$)。随 $TNF\alpha$ 干预浓度增高,人成熟脂肪细胞中 *STEAP4* 基因的 mRNA 表达水平逐渐升高,在 0 ~ 50 ng/mL 浓度范围内呈现浓度依赖性,50 ng/mL $TNF\alpha$ 干预时 *STEAP4* 基因在人成熟脂肪细胞中的 mRNA 表达水平最高,较 0 ng/mL 浓度组上调约 2.4 倍。除 10 ng/mL 组与 25 ng/mL 组,25 ng/mL 组与 50 ng/mL 组之间无差异显著性外,其余任意浓度组之间差异均有显著性($P < 0.05$)。

3 讨论

人 *STEAP4* 基因是本研究小组筛选并克隆到的一条肥胖相关全长新基因,定位于染色体 7q21.12, mRNA 全长 4 454 bp,开放阅读框 106 ~ 1 485 bp,编码 459 个氨基酸,预测分子量 52 kDa, GenBank ID NM_024636。生物信息学分析结果发现其编码蛋白有 6 个跨膜区,可能是个膜蛋白。本课题组前期研究已揭示,*STEAP4* 基因具有以下特征^[3]:1)肥胖者脂肪组织中该基因核酸与蛋白的表达均显著下调,与 SSH 结果相一致;2) *STEAP4* 基因具有在脂肪组织高度表达的多组织表达特征;3) *STEAP4* 蛋白亚细胞定位于脂肪细胞膜;4)通过构建 *STEAP4* 基因表达载体,转染人前体脂肪细胞株,发现 *STEAP4* 基因在人脂肪细胞中过表达能显著提高成熟脂肪细胞的胰岛素刺激下葡萄糖摄取率。由此可初步判定 *STEAP4* 是一个参与胰岛素敏感性调节的肥胖相关差异表达基因,有望成为胰岛素抵抗治疗的潜在靶标。

$TNF\alpha$ 是重要的脂源性细胞因子之一,不但与肥胖关系密切,而且还参与肥胖致 II 型糖尿病的发病机制。具体表现为:1)肥胖儿童血液循环中的 $TNF\alpha$ 水平明显增高^[5];2)给予外源性 $TNF\alpha$ 能够诱发胰岛素抵抗的发生^[6];3)在肥胖患者的脂肪组织中, $TNF\alpha$ 的分泌与胰岛素调节的葡萄糖代谢存在高度负相关关系^[7];4)用抗体中和肥胖大鼠体内的 $TNF\alpha$ 可显著改善其胰岛素敏感性,而减肥则可以降低血浆 $TNF\alpha$ 水平并增加胰岛素的敏感性^[8]。因此,本研究采用人重组 $TNF\alpha$ 为干预因子开展肥胖及胰岛素相关基因的调控研究。

本研究发现, $TNF\alpha$ 可上调脂肪细胞中 *STEAP4* 核酸和蛋白的表达,且随 $TNF\alpha$ 干预浓度的增高 *STEAP4* 表达水平逐渐上调,5 ng/mL $TNF\alpha$ 干预人成熟脂肪细胞 24 h 即显著上调 *STEAP4* 核酸和蛋白的表达,提示脂肪细胞中 *STEAP4* 基因的表达受 $TNF\alpha$ 的调节。从 $TNF\alpha$ 与胰岛素敏感性之间的关系理解本研究结果,不难发现 $TNF\alpha$ 、*STEAP4*、胰岛素敏感性三者关系存在相互矛盾。研究报道, $TNF\alpha$ 能干扰胰岛素信号途径而诱导脂肪细胞产生胰岛素抵抗^[9,10],本研究发现 $TNF\alpha$ 具有上调 *STEAP4* 表达的作用,以此推论 *STEAP4* 的功能应与降低胰岛素敏感性有关,与本研究小组前期研究发现不一致。然而,人 *STEAP4* 基因的鼠同源基因为 TIARP(tumor necrosis factor-alpha induced adipose related protein),

表 1 不同浓度 $TNF\alpha$ 干预 24 h 对人成熟脂肪细胞中 *STEAP4* 基因 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

干预浓度 (ng/mL)	样本数	<i>STEAP4</i> mRNA 相对表达量
0	6	0.001573 ± 0.000145
5	6	0.002094 ± 0.000400 ^a
10	6	0.003028 ± 0.000480 ^{a,b}
25	6	0.003383 ± 0.000538 ^{a,b}
50	6	0.003697 ± 0.000440 ^{a,b,c}
F 值		27.25
P 值		< 0.05

a: 与无 $TNF\alpha$ (0 ng/mL) 干预组比较, $P < 0.05$; b: 与 5 ng/mL 组比较, $P < 0.05$; c: 与 10 ng/mL 组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 人重组 $TNF\alpha$ 对人成熟脂肪细胞 *STEAP4* 蛋白表达的影响

由图 1 可见,与基因表达结果相一致,不同浓度 $TNF\alpha$ 干预 24 h 均能显著上调人成熟脂肪细胞中 *STEAP4* 蛋白的表达。5 ng/mL $TNF\alpha$ 干预组与未干预对照组(0 ng/mL)相比差异有显著性($P < 0.05$)。干预浓度提高到 25 ng/mL 时干预效果最为明显,在 0 ~ 25 ng/mL 范围内 *STEAP4* 蛋白表达水平的升高呈现浓度依赖性。除 25 ng/mL 组与 50 ng/mL 组之间差异无显著性外,其余任意浓度组之间差异均有显著性($P < 0.05$)。其中 50 ng/mL $TNF\alpha$ 干预后 *STEAP4* 蛋白表达较 25 ng/mL 组有下降趋势,但差异无显著性。

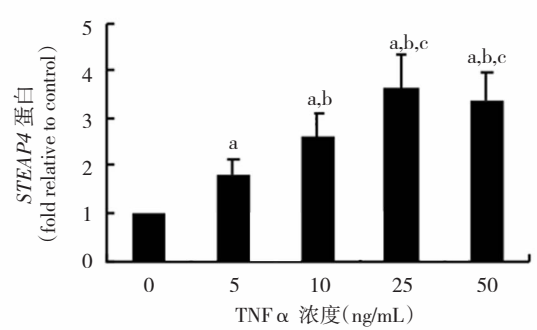


图 1 $TNF\alpha$ 干预 24 h 对人成熟脂肪细胞中 *STEAP4* 蛋白表达的影响 a: 与无 $TNF\alpha$ 干预组比较, $P < 0.05$; b: 与 5 ng/mL 组比较, $P < 0.05$; c: 与 10 ng/mL 组比较, $P < 0.05$ 。

中文译名 TNF α 诱导的脂肪相关蛋白, 先前已报道 TIARP 受 TNF α 调控^[11], 且与人 STEAP4 具有高度的相似性, 因此本研究 TNF α 显著上调人 STEAP4 表达的结论与其相符, 有关 TNF α 致胰岛素抵抗、上调 STEAP4 表达, 而 STEAP4 能改善胰岛素敏感性的合理解释应存在另外一种可能, 即 STEAP4 表达的上调可能属于 TNF α 的负反馈机制, 该观点正确与否将有待做更加深入的研究来加以论证。

至于研究中发现, 50 ng/mL TNF α 干预 24 h STEAP4 mRNA 表达量最高而在蛋白表达水平却有所下降的原因目前尚不明了。推测可能与 50 ng/mL 干预体外培养的人脂肪细胞, 浓度过高, 引起细胞内反馈系统的激活, 在翻译水平上抑制了 STEAP4 蛋白的表达有关。进一步开展更高剂量研究可能有助于分析其中的原因。

[参 考 文 献]

[1] Cali AM, Caprio S. Prediabetes and type 2 diabetes in youth: an emerging epidemic disease? [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2008, 15(2):123-127.
[2] 李秀珍, 刘丽. 儿童 II 型糖尿病流行病学与发病机制的研究进展[J]. *国外医学儿科学分册*, 2005, 32(1):37-39.
[3] Zhang CM, Chi X, Wang B, Zhang M, Ni YH, Chen RH, et al. Downregulation of STEAP4, a highly-expressed TNF-alpha-inducible gene in adipose tissue, is associated with obesity in humans [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(5):587-592.
[4] Nieto-Vazquez I, Fernández-Veledo S, Krämer DK, Vila-Bedmar

R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2008, 114(3):183-194.
[5] 颜伟健, 吴静, 莫娟, 黄超文, 彭烈武, 徐丽, 等. 肥胖儿童血浆脂联素与肿瘤坏死因子- α 的变化及意义[J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(1):47-50.
[6] Rachdaoui N, Nagy LE. Endothelin-1-stimulated glucose uptake is desensitized by tumor necrosis factor-alpha in 3T3-L1 adipocytes [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 285(3):545-551.
[7] Winkler G, Kiss S, Keszthelyi L, Sápi Z, Ory I, Salamon F, et al. Expression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha protein in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF-alpha, soluble serum TNF-receptor-2 concentrations and C-peptide level [J]. *Eur J Endocrinol*, 2003, 149(2):129-135.
[8] Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, 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(11):3176-3188.
[9] Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2000, 11(6):212-217.
[10] Lorenzo M, Fernández-Veledo S, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, De Alvaro C, Nieto-Vazquez I. Insulin resistance induced by tumor necrosis factor-alpha in myocytes and brown adipocytes [J]. *J Anim Sci*, 2008, 86(14 Suppl):94-104.
[11] Moldes M, Lasnier F, Gauthereau X, Klein C, Pairault J, Fève B, et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced adipose-related protein (TIARP), a cell-surface protein that is highly induced by tumor necrosis factor-alpha and adipose conversion [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(36):33938-33946.

(本文编辑:王庆红)