

· 论著 ·

3,5-二碘-L-甲状腺素对白色脂肪棕色化的作用

柯孟婷 孙家忠 李扬

【摘要】 目的 探究 3,5-二碘-L-甲状腺素(T_2)诱导白色脂肪棕色化的作用。**方法** 3T3-L1 脂肪前体细胞诱导分化并用油红 O 染色进行鉴定;细胞分化过程中予不同浓度梯度(1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L)的 T_2 处理,待细胞分化成熟后,分别用实时荧光定量 PCR、Western 印迹检测解耦联蛋白-1(UCP-1)表达水平的变化;仅予高浓度(100 nmol/L) T_2 处理, Western 印迹法检测其他棕色脂肪功能性基因,包括诱导细胞死亡 DNA 片段化因子 α 样效应因子 A(CIDEA)、过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 协同刺激因子-1 α (PGC-1 α)蛋白表达变化。**结果** 3T3-L1 脂肪前体细胞呈成纤维细胞样形态,胞浆中无脂滴;诱导分化成熟后光镜下油红 O 染色可见细胞内大量环状脂滴。在细胞分化过程中予不同浓度 T_2 干预后,分化成熟的脂肪细胞上 UCP-1 mRNA 水平均有升高($t=3.97$ 、 11.77 、 17.7 , P 均 <0.05),蛋白表达水平也均有改变($t=13.31$ 、 14.55 、 23.62 , P 均 <0.05),且在高浓度(100 nmol/L)下最明显。在高浓度 T_2 (100 nmol/L)干预下,成熟脂肪细胞的棕色脂肪其他功能性基因蛋白 CIDEA、PGC-1 α 水平表达增加($t=15.92$ 、 17.36 , P 均 <0.05)。**结论** T_2 可诱导由 3T3-L1 脂肪前体细胞分化而来的成熟白色脂肪细胞表达棕色脂肪功能性基因。

【关键词】 3T3-L1 脂肪前体细胞;白色脂肪棕色化;3,5-二碘-L-甲状腺素;肥胖症

基金项目:湖北省科技厅项目(2014CFB204)

Effects of 3,5-diiodo-L-thyronine on browning of white adipose tissue Ke Mengting*, Sun Jiazhong, Li Yang. * Department of Endocrinology, Wuhan Red Cross Hospital, Wuhan 430071, China
Corresponding author: Sun Jiazhong, Email: sjz300@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of 3,5-diiodo-L-thyronine(T_2) on browning of white adipose tissue. **Methods** Differentiation of 3T3-L1 adipose precursor cells were induced and identified by oil red O staining. During the differentiation process, 3T3-L1 were treated by different concentrations of T_2 (1 nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L). After the maturation of 3T3-L1, the level of uncoupling protein-1 (UCP-1) mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western blotting, respectively. Specific proteins of brown adipose tissue including cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha like effector A (CIDEA) and peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) were detected by Western blotting only in cells treated by 100 nmol/L T_2 . **Results** 3T3-L1 adipose precursor cells were fibroblast-like without liquid droplets in the cytoplasm, but after maturation, a large number of annular lipid drops were observed under light microscope by oil red O staining. The level of UCP-1 mRNA in mature fat cells were increased ($t=3.97$, 11.77 , 17.7 ; all $P<0.05$) and the level of protein were also changed ($t=13.31$, 14.55 , 23.62 ; all $P<0.05$), especially in cells treated by 100 nmol/L T_2 . The brown adipose tissue specific proteins CIDEA and PGC-1 α were also increased in cells treated by 100 nmol/L T_2 ($t=15.92$, 17.36 ; all $P<0.05$). **Conclusion** T_2 induces the expression of specific genes of brown adipose tissue in mature fat cells which are differentiated from 3T3-L1 adipose precursor cells.

【Key words】 3T3-L1 adipose precursor cells; Browning of white adipose; 3,5-Diiodo-L-thyronine; Obesity

Fund program: The Project of Science Department of Hubei Province(2014CFB204)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2016.06.03

作者单位:430000 武汉红十字会医院内分泌科(柯孟婷);430071 武汉大学中南医院内分泌科(孙家忠,李扬)

通信作者:孙家忠,Email: sjz300@163.com

棕色脂肪组织是哺乳动物体内非颤抖产热的主要来源,对于维持动物的体温和能量平衡起重要作用,如今成人亦具有有功能的棕色脂肪组织的观点已逐渐被接受,棕色脂肪组织燃烧脂肪产生热量的能力成为人类对抗肥胖以及相关代谢紊乱疾病的新希望^[1]。甲状腺激素可以通过控制能量储存与消耗的平衡来调节代谢过程^[2]。近年发现,除目前众所周知的 T_3 以外,3,5-二碘-L-甲状腺素(T_2)亦具有生物活性,它是一种 T_3 脱碘形成的天然代谢产物^[3]。 T_2 作为生物活性甲状腺激素衍生物能够影响能量代谢,减轻体重以及高脂饮食诱导的相关代谢疾病^[4-5]。其机制可能与其激动棕色脂肪组织,诱导白色脂肪棕色化,增加产热有关。 T_2 可以激动棕色脂肪组织已得到研究证明,但是诱导白色脂肪棕色化研究较少^[6]。所以本实验致力于研究 T_2 是否可以诱导白色脂肪棕色化。

1 材料与方法

1.1 实验材料 3T3-L1 脂肪前体细胞购自北京协和细胞库,胎牛血清购自美国 Gibco 公司,DMEM 高糖培养基购自 Hyclone 公司, T_2 、地塞米松、异丁基-甲基-黄嘌呤(IBMx)、油红 O 购自美国 Sigma 公司,胰岛素购自北京天威公司,RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒购自上海生工试剂有限公司。羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗、蛋白抽提试剂盒、喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒生产商 Aspen,目录号 AS-1107、AS1001、AS1086;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)内参抗体生产商 abcam,目录号 ab37168;Aspen,化学发光显色试剂盒生产商 Millipore,目录号 WBKLS0500;解耦联蛋白(UCP)-1 引物序列由上海生工试剂有限公司设计和合成。

1.2 实验方法

1.2.1 脂肪细胞的诱导分化及油红 O 染色 将 3T3-L1 脂肪前体细胞接种在 6 孔板中,用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基在 37℃、5% CO_2 条件下的细胞培养箱中培养。待细胞生长至完全融合 2 d 后开始诱导分化:含有 0.5 mmol/L IBMx、1 μ mol/L 地塞米松、10 mg/L 胰岛素、10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中培养 48 h,之后用含有 10 mg/L 胰岛素、10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养 48 h,以后每 48 h 换液 1 次。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测不同浓度药物处理后,成熟脂肪细胞 UCP-1 mRNA 表达变化 按上述诱导方法诱导 3T3-L1 脂肪前体细胞分化成熟。其中在诱导 3T3-L1 细胞分化过程中的第 3 天予不同浓度 T_2 (1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L) 处理 96 h。细胞分化成熟后用 Trizol 提取各孔细胞总 RNA,逆转录为 cDNA。实时荧光定量 PCR:引物由上海生工试剂有限公司设计并合成,序列如表 1。

PCR 反应条件:95℃ 15 s;58℃ 20 s;72℃ 20 s,反应 40 个循环。对 PCR 反应过程中每一循环的系统荧光强度进行实时检测和测定各孔样品的循环阈值(Ct),以肌动蛋白(actin)为内参照,并采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对目的基因进行相对定量。

表 1 实时定量 PCR 基因引物序列

基因	引物序列(5'→3')	扩增片段长度(bp)
UCP-1	上游引物:GCTTACAGAGTTATAGCCACCACAG	285
	下游引物:ACAGCTTGCTACGCTTGGGT	
Actin	上游引物:CCGTGAAAAGATGACCCAG	249
	下游引物:TAGCCACGCTCGGTCAGG	

注:UCP-1:解耦联蛋白-1;Actin:肌动蛋白

1.2.3 Western 印迹法检测不同药物处理后,成熟脂肪细胞 UCP-1 蛋白水平变化 细胞准备同上,吸出每孔细胞培养液后用磷酸盐缓冲液洗涤细胞两次,再加入含苯甲基磺酰氟的细胞裂解液冰上裂解 30 min,提取细胞总蛋白;BCA 法检测蛋白浓度,取样品 40 μ g 以 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,300 mA 恒流电转膜 60 min,将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上;经洗涤缓冲液配置的 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,加入 1:500 稀释的兔抗人一抗 4℃ 孵育过夜;TBST 洗涤后用 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:10 000 稀释)室温摇床反应 1 h;洗膜后发光显像,并以 GAPDH 作为内参,用 AlphaEaseFC 软件分析发光条带灰度值,目的蛋白和内参蛋白 GAPDH 条带的灰度值比值代表目的蛋白的相对表达量。

1.2.4 Western 印迹法检测高浓度药物处理后,成熟脂肪细胞其他棕色脂肪功能性基因蛋白水平变化

同样方法诱导 3T3-L1 脂肪前体细胞分化,在诱导 3T3-L1 细胞分化过程中的第 3 天予高浓度 T_2 (100 nmol/L) 处理 96 h。细胞分化成熟后用 Western 印迹法检测细胞其他棕色脂肪功能性基因如诱导细胞死亡 DNA 片段化因子 α 样效应因子 A(CIDEA)、过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 协同刺激因子-1 α (PGC-1 α)蛋白水平变化,Western 印迹法操作大致同上。

1.3 统计学处理 所有正态分布的计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用 t 检验;多组之间比较采用单因素方差分析(ANOVA),如果方差不齐可采用非参数检验;数据均用 SPSS 17.0 软件分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 光镜结果 3T3-L1 脂肪前体细胞呈成纤维细胞样形态,细胞呈梭形,胞浆中无脂滴(图 1,封 3)。应用 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 + 地塞米松 + 胰岛素诱导分化后,细胞进入分化阶段,细胞体积增大,变圆,胞浆内逐渐出现脂滴,脂滴颗粒在细胞核周围出现,逐渐增多、增大,直至遍布细胞内,细胞核可被脂滴挤到周围。诱导分化后 6~9 d,80%~90% 的细胞

已分化产生脂滴,脂肪细胞分化成熟后脂滴富集于核周围,油红 O 染色后成熟脂肪细胞内出现红染颗粒(图 2,封 3),证明镜下所见细胞内颗粒为脂滴。

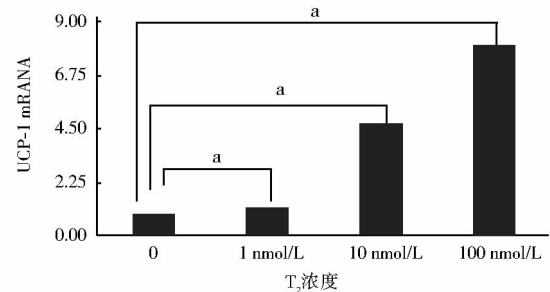
2.2 实时荧光定量 PCR 结果 UCP-1 mRNA 水平在 3T3-L1 脂肪前体细胞表达较低,在其分化过程中予不同浓度 T_2 (1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L) 干预后,分化成熟的脂肪细胞 UCP-1 mRNA 表达增加,在 100 nmol/L 浓度 T_2 作用条件下效应最显著,如图 3。干预组(1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L)同对照组相比(0 nmol/L) 差异有统计学意义($t=3.97、11.77、17.70, P$ 均 <0.05)。多组之间采用单因素方差分析,因方差不齐,所以采用非参数检验($\chi^2=10.39, P<0.05$),表明各组间差异有统计学意义(图 3)。

2.3 Western 结果 UCP-1 蛋白水平在 3T3-L1 脂肪前体细胞表达较低,在其分化过程中予不同浓度 T_2 (1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L) 干预后,分化成熟的脂肪细胞 UCP-1 蛋白表达水平有所改变($t=13.31、14.55、23.62, P$ 均 <0.05),在 1 nmol/L 条件下与对照组相比略下降,在 10 nmol/L、100 nmol/L 条件下与对照组相比蛋白表达量升高,其中在 100 nmol/L 条件下蛋白表达水平增加最显

著,由于 T_2 用甲醇和氨水共同溶解配置,所以设置了未加药物溶剂空白对照组,结果显示差异不明显,差异无统计学意义($t=1.725, P>0.05$)。同时,在 100 nmol/L 条件下,棕色脂肪其他功能性基因如 CIDEA、PGC-1 α 蛋白水平表达增加($t=15.92、17.36, P$ 均 <0.05),见图 4,5。

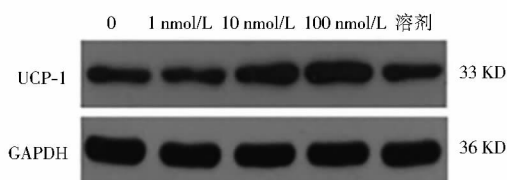
3 讨论

米色脂肪组织是近年发现的除白色脂肪组织和棕色脂肪组织外的第三类脂肪组织,它具有较低的



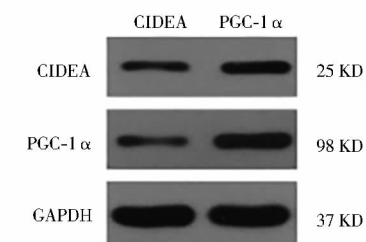
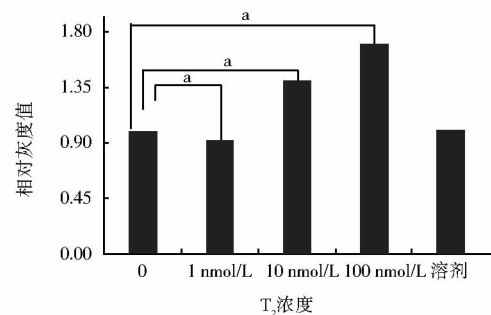
注:不同浓度药物干预组与对照组相比, $^aP<0.05$; UCP-1: 解耦联蛋白-1; T_2 : 3,5-二碘-L-甲状腺素

图 3 不同浓度 T_2 对脂肪细胞分化成熟后 UCP-1 mRNA 表达的影响



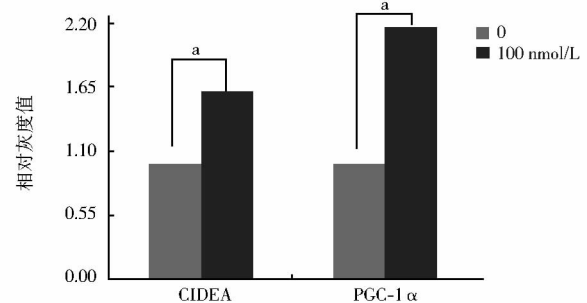
注:不同浓度药物干预组与对照组相比, $^aP<0.05$; UCP-1: 解耦联蛋白-1; T_2 : 3,5-二碘-L-甲状腺素

图 4 不同浓度 T_2 对细胞分化成熟后 UCP-1 蛋白表达的影响



注:不同浓度药物干预组与对照组相比, $^aP<0.05$; T_2 : 3,5-二碘-L-甲状腺素; UCP-1: 解耦联蛋白-1; PGC-1 α : 过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 协同刺激因子-1 α ; CIDEA: 诱导细胞死亡 DNA 片段化因子 α 样效应因子 A

图 5 100 nmol/L T_2 对细胞分化成熟后 CIDEA、PGC-1 α 蛋白表达的影响



产热能力和少量的线粒体,一旦受到刺激,可以呈现更多的类似棕色脂肪的生理学和形态学上的特征,UCP-1 表达增多,产热能力增强^[7-8]。目前许多研究已经证明,人类和啮齿类动物都具有棕色和米色脂肪组织。如何促进更多白色脂肪向米色脂肪及棕色脂肪的转化成为通过增加能量消耗而治疗肥胖的一种新方法。动物和细胞研究已经证明,一些转录子及其调节因子、非转录调节因子、激素均可以影响白色脂肪棕色化的过程^[9]。甲状腺激素可通过与棕色脂肪细胞上的甲状腺激素受体 (TR) $\alpha 1$ 结合而激动棕色脂肪组织产热,还可以通过与棕色脂肪组织上的 TR $\beta 1$ 结合而诱导 UCP-1 基因的表达增加。在人类脂肪源性的多能干细胞分化成成熟白色脂肪细胞的过程中, T_3 通过与 TR β 结合,在不增加白色脂肪细胞特异分子表达的情况下可以诱导 UCP-1、PGC-1 α 表达,并且这种作用呈 T_3 剂量依赖性^[10]。 T_2 是一种 T_3 脱碘形成的具有生物活性的天然代谢产物,所以推测 T_2 亦可以诱导白色脂肪棕色化^[3]。

由于 3T3-L1 脂肪前体细胞可较好地模拟脂肪细胞分化和活体脂肪组织的功能,因此目前已成为肥胖及体外脂肪细胞分化研究的一个常用工具。本实验结果显示,光镜下,3T3-L1 脂肪前体细胞呈成纤维细胞样形态,细胞呈梭形,胞浆中无脂滴;诱导分化后,细胞体积增大,变圆,予油红 O 染色可见细胞内有大量区域被染色,部分成环状,这是 3T3-L1 脂肪前体细胞分化成熟后油红染色的典型改变。

本研究结果显示 3T3-L1 脂肪前体细胞 UCP-1 在 mRNA 水平和蛋白质水平均表达较低,在其分化过程中予不同浓度 T_2 (1 nmol/L, 10 nmol/L, 100 nmol/L) 干预后,虽然在浓度 1 nmol/L 条件下的蛋白水平略降低,但由于蛋白表达可以受转录调控,也可以受翻译水平的调控,所以在翻译水平的调控可以导致蛋白表达和 mRNA 水平不成比例;在其他浓度条件下,分化成熟后的脂肪细胞 UCP-1 表达增加。相同条件下棕色脂肪其他功能基因 CIDEA、PGC-1 α 蛋白水平在 T_2 高浓度刺激后也表达增加。表明在细胞水平上, T_2 可以增强脂肪前体细胞在向白色脂肪细胞分化过程中棕色脂肪组织功能基因的表达,使分化成熟的白色脂肪细胞具有棕色脂肪特征。还有研究表明,在 3T3-L1 脂肪前体细胞分化成熟后给予 T_3 处理,UCP-1 表达水平在 T_3 浓度为 5 nmol/L 时开始升高,50 nmol/L 开始下降,在 5 nmol/L 达到顶峰,可以推测甲状腺激素所起作用与剂量密切相关^[11]。但是 T_2 作用于细胞的机制到底如何并不明确。

以往研究表明 AMP 活化蛋白激酶 (AMPK) 参与 UCP-1 的诱导形成过程^[12]。AMPK 激动剂如二甲双胍已经被证明可以减轻体重和降低血糖^[13]。有研究表明, T_3 增强脂肪细胞产热的作用与 TR 分布有关,AMPK 参与其中,其可能是 T_3 调节能量代

谢的下游信号通路, T_2 可能通过类似途径起作用^[11]。还有研究表明 T_2 不通过 TR 起作用,但可以增强肝脏核 SIRT1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1) 活性。离体实验证明, T_2 可直接作用于 SIRT1, 导致固醇调节元件结合蛋白-1c 被脱去乙酰基,从而使棕色脂肪组织功能基因上调^[4]。

综上所述, T_2 可以增强 3T3-L1 脂肪前体细胞向成熟白色脂肪细胞分化过程中 UCP-1 的表达,从而证实了 T_2 诱导白色脂肪棕色化的可能性。但其相关机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, et al. Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men [J]. *Obesity* (Silver Spring), 2011, 19 (1): 13-16. DOI: 10.1038/oby.2010.105.
- [2] Mullur R, Liu YY, Brent GA. Thyroid hormone regulation of metabolism [J]. *Physiol Rev*, 2014, 94 (2): 355-382. DOI: 10.1152/physrev.00030.2013.
- [3] Orozco A, Navarrete-Ramírez P, Olvera A, et al. 3,5-Diiodothyronine (T_2) is on a role. A new hormone in search of recognition [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2014, 203: 174-180. DOI: 10.1016/j.ygcen.2014.02.014.
- [4] de Lange P, Cioffi F, Senese R, et al. Nonthyrototoxic prevention of diet-induced insulin resistance by 3,5-diiodo-L-thyronine in rats [J]. *Diabetes*, 2011, 60 (11): 2730-2739. DOI: 10.2337/db11-0207.
- [5] Antonelli A, Fallahi P, Ferrari SM, et al. 3,5-Diiodo-L-thyronine increases resting metabolic rate and reduces body weight without undesirable side effects [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2011, 25 (4): 655-660.
- [6] Lombardi A, Senese R, De Matteis R, et al. 3,5-Diiodo-L-thyronine activates brown adipose tissue thermogenesis in hypothyroid rats [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (2): e0116498. DOI: 10.1371/journal.pone.0116498.
- [7] Wu J, Boström P, Sparks LM, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human [J]. *Cell*, 2012, 150 (2): 366-376. DOI: 10.1016/j.cell.2012.05.016.
- [8] Rosenwald M, Perdikari A, Rülcke T, et al. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15 (6): 659-667. DOI: 10.1038/ncb2740.
- [9] Pyrzak B, Demkow U, Kucharska AM. Tissue and browning agents: irisin and FGF21 in the development of obesity in children and adolescents [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 866: 25-34. DOI: 10.1007/5584_2015_149.
- [10] Lee JY, Takahashi N, Yasubuchi M, et al. Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 302 (2): C463-C472. DOI: 10.1152/ajpcell.00010.2011.
- [11] Wang CZ, Wei D, Guan MP, et al. Triiodothyronine regulates distribution of thyroid hormone receptors by activating AMP-activated protein kinase in 3T3-L1 adipocytes and induces uncoupling protein-1 expression [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 393 (1-2): 247-254. DOI: 10.1007/s11010-014-2067-6.
- [12] López M, Varela L, Vázquez MJ, et al. Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance [J]. *Nat Med*, 2010, 16 (9): 1001-1008. DOI: 10.1038/nm.2207.
- [13] Zhang Y, Guan M, Zheng Z, et al. Effects of metformin on CD133⁺ colorectal cancer cells in diabetic patients [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (11): e81264. DOI: 10.1371/journal.pone.0081264.

(收稿日期: 2015-10-12)