

甲状腺相关眼病患者眼眶脂肪抵抗素的表达

刘红霞, 吴中耀, 杨华胜, 颜建华, 毛羽翔, 王莉菲, 林 征

(中山大学中山眼科中心, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】通过检测抵抗素在甲状腺相关眼病患者及对照组眼眶脂肪组织和脂肪细胞中的表达, 为进一步探讨抵抗素与甲状腺相关眼病的相关性打下基础。【方法】通过体外原代培养获得前脂肪细胞, 前脂肪细胞在分化液的作用下转化为成熟脂肪细胞。用 RT-PCR 法检测眼眶脂肪组织、前脂肪细胞及成熟脂肪细胞中抵抗素 mRNA 的表达, 并进行免疫组化检测抵抗素蛋白的表达。【结果】前脂肪细胞中无抵抗素 mRNA 及蛋白的表达。成熟脂肪细胞及眼眶脂肪组织中有抵抗素 mRNA 及蛋白的表达。免疫组化结果显示抵抗素蛋白位于成熟脂肪细胞胞浆中。【结论】甲状腺相关眼病患者眼眶脂肪中抵抗素 mRNA 及蛋白表达丰富, 说明甲状腺相关眼病患者眼眶脂肪增多是因成熟脂肪细胞所占比例增加、脂肪细胞分化增强所致。

关键词: 甲状腺相关眼病; 脂肪; 抵抗素; 前脂肪细胞

中图分类号: R749.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)03-0314-04

Expression of Resistin in Orbital Adipose Tissue and Adipocyte of Patients with Thyroid Associated Ophthalmopathy

LIU Hong-xia, WU Zhong-yao, YANG Hua-sheng, YAN Jian-hua, MAO Yu-xiang, WANG Li-fei, LIN Zheng

(Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the expression of resistin mRNA and protein in orbital adipose tissues and adipocytes in the patients with and without thyroid associated ophthalmopathy (TAO). 【Methods】The preadipocytes were cultured from the orbital adipose tissues. The preadipocytes stimulated by a differentiation media were differentiated into adipocytes in vitro. The expression of both resistin mRNA and resistin protein in preadipocytes, adipocytes, and adipose tissues were measured by RT-PCR and immunohistochemistry. 【Results】There was no expression of resistin mRNA and protein in preadipocytes, but they were expressed in mature adipocytes and adipose tissues. Immunohistochemistry of mature adipocytes and orbital adipose tissues showed that the resistin protein was abundant in adipocyte cytoplasm. 【Conclusion】The resistin is an adipocytokine secreted by mature adipocytes. In our results, the expression of resistin mRNA and resistin protein were abundant in the orbital adipose tissue of TAO patients, which implicated that the orbital adipose tissue of TAO patients was mostly consisted of mature adipocytes, the differentiation of preadipocytes was enhanced.

Key words: thyroid associated ophthalmopathy; adipose; resistin; preadipocyte

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(3):314-317]

甲状腺相关眼病 (thyroid associated ophthalmopathy, TAO) 是一种器官特异性自身免疫性疾病, 与甲状腺的功能密切相关。眶后脂肪组织增生是 TAO 发病机制之一^[1]。关于眼眶脂肪组织增生机制的研究意义深远, 眼眶前脂肪细胞培养及分化技术成熟^[2]为本研究打下好的基础。抵抗素是由

脂肪细胞分泌的一种脂肪细胞因子, 其在腹部、大腿等脂肪组织中的基因及蛋白表达早有研究^[3], 但在眼眶脂肪组织中的表达尚无研究报道。本课题旨在研究抵抗素在 TAO 患者眼眶脂肪组织及体外培养分化的脂肪细胞中的表达。

收稿日期: 2005-08-24

基金项目: "211 工程" 重点学科建设基金资助项目 (中山医科大学 98005)

作者简介: 刘红霞 (1977-), 女, 山东淄博人, 博士生; 吴中耀, 教授, 导师. E-mail: lhxru@163.com

1 材料与方 法

1.1 组织来源

收集的标本为眼眶脂肪组织,取自 TAO 患者开眶减压术,共 12 例,手术时患者甲状腺功能基本正常。对照组眼眶脂肪组织取自整形手术病人,共 6 例。组织标本于术中切除后一部分用于原代培养前脂肪细胞,一部分用甲醛固定用作石蜡切片,一部分液氮保存(1 h 内)。

1.2 人前脂肪细胞的体外培养及分化

将获取的眼眶脂肪组织立即放于含 150 mL/L 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液中,4 ℃ 放置 2~3 h 后采取组织块法接种于 25 cm² 培养瓶中,当细胞增殖至融合状态时,按 1:2 传代,其中一部分继续接种在培养瓶中培养,一部分接种于放置盖玻片的培养皿中,第 3 代细胞常规用于分化。分化液的配制:A 液,DMEM/F12 原液中加入终浓度为 1 μmol/L 胰岛素、17 μmol/L 泛酸、33 μmol/L 生物素、10 μg/mL 转铁白蛋白、0.2 nmol/L T3、1 μmol/L 地塞米松、0.1 mmol/L IBMX;B 液,A 液中撤除地塞米松、IBMX。细胞生长至 80% 融合,加入分化液 A,隔天换液,4 d 后换为 B 液,以后 3~4 d 换液 1 次,16 d 结束分化。油红染色鉴定脂肪细胞分化。

1.3 抵抗素 mRNA 的检测

Trizol Reagent(Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(Fermentas 公司),引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。

采用二步法 RT-PCR 法检测前脂肪细胞、分化脂肪细胞及脂肪组织中抵抗素 mRNA 的表达。抵抗素引物设计:上游引物,5'-AGC CAT CAA TGA GAG GAT CCA-3';下游引物,5'-TCC AGG CCA ATG CTG CTT A-3'。反应条件:94 ℃ 3 min 93 ℃ 30 s 55 ℃ 50 s 72 ℃ 50 s,共 35 个循环,最后 72 ℃ 充分延伸 7 min,4 ℃ 保温;扩增片段长度 500 bp。

1.4 抵抗素蛋白的检测

体外培养细胞采用爬片方法;脂肪组织为石蜡切片,厚度 5 μm。使用免疫组化试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司)进行抵抗素蛋白检测;兔抗人抵抗素抗体(Santa Cruze 公司)1:200 稀释,37 ℃ 2 h 或 4 ℃ 过夜;DAB 显色(试剂盒购自武

汉博士德)时间 5~10 min,显微镜下观察;自然干燥后中性树脂封片^[4]。

2 结 果

2.1 前脂肪细胞分化油红染色结果

来自 TAO 患者及对照组眶脂肪的前脂肪细胞,暴露于体外适当的条件(分化液)均可分化为成熟脂肪细胞。分化第 1 天,前脂肪细胞呈梭形(图 1);第 2 天,细胞收缩呈类圆形;随着分化时间的延长,脂肪细胞中积聚的脂滴越来越多;16 d 分化结束。已分化细胞油红染色观察细胞中的脂滴,脂滴呈红色(图 2)。

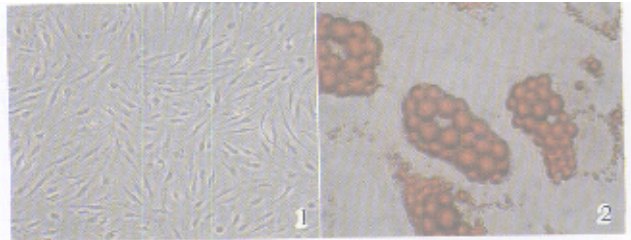


图 1 前脂肪细胞

图 2 脂肪细胞油红染色

Fig.1 Preadipocytes (10×)

Fig.2 Oil red staining of adipocytes (40×)

2.2 RT-PCR 法检测抵抗素 mRNA

前脂肪细胞中无抵抗素 mRNA 表达,脂肪组织和已分化脂肪细胞中扩增出抵抗素 mRNA 片段,约 500 bp(图 3)。

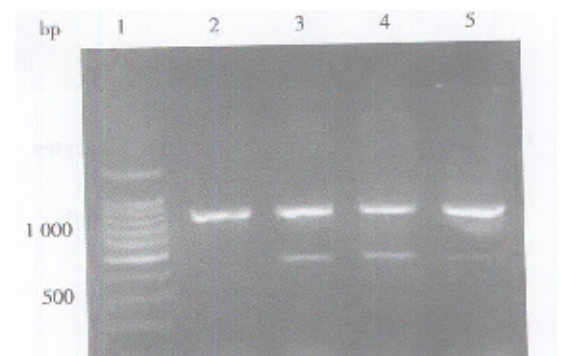


图 3 PCR 产物电泳结果

Fig.3 The results of electrophoresis

1: DNA Marker; 2: preadipocytes; 3: mature adipocytes; 4: adipose tissue of TAO patients; 5: adipose tissue of control samples

2.3 免疫组化检测抵抗素蛋白

12 例 TAO 患者眼眶脂肪组织石蜡切片免疫

组化均显示抵抗素蛋白位于脂肪细胞胞浆,且丰富(图 4A);6 例对照组眼眶脂肪组织石蜡切片免疫组化亦可见抵抗素蛋白表达,但较 TAO 组少。12 例 TAO 患者及 6 例对照组爬片前脂肪细胞免疫组化均未见阳性着色(图 5A),已分化脂肪细胞胞浆阳性着色,抵抗素蛋白位于胞浆(图 5B)。

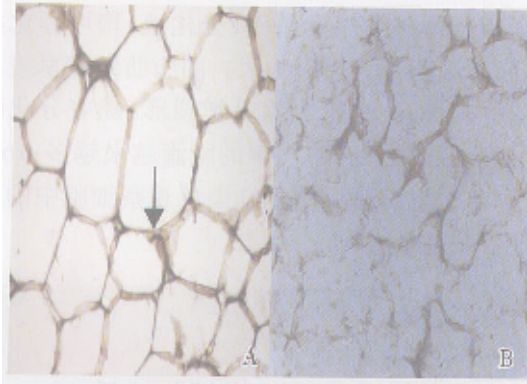


图 4 眼眶脂肪组织免疫组化染色

Fig.4 Immunohistochemistry of orbital adipose tissue

A: immunohistochemistry of orbital adipose tissue with TAO (40 ×); B: immunohistochemistry of orbital adipose tissue without TAO(40 ×)

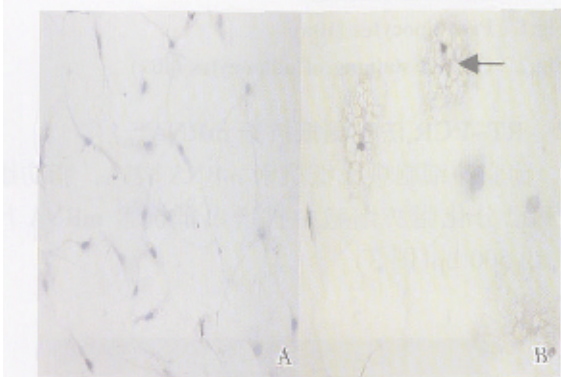


图 5 脂肪细胞免疫组化染色

Fig.5 The immunohistochemistry of adipocytes

A: immunohistochemistry of preadipocytes (20 ×);
B: immunohistochemistry of mature adipocytes(40 ×)

3 讨论

3.1 抵抗素是一种脂肪细胞因子

抵抗素(resistin)是近来确认的一种脂肪细胞因子,由脂肪组织分泌的大约 12 ku 的多肽^[6]。我们的研究证明体外培养的 TAO 患者及对照组眼眶前脂肪细胞中未检测到抵抗素 mRNA 及蛋白表达;但两组前脂肪细胞在体外分化液作用下,分化

为成熟脂肪细胞后即可检测到抵抗素 mRNA 及蛋白的表达,且两组之间无差别。RT-PCR 产物电泳结果显示从成熟脂肪细胞中提取 RNA,经逆转录及 PCR 后扩增出 500 bp 长的抵抗素片段。免疫组化检测到抵抗素蛋白位于成熟脂肪细胞胞浆中,脂滴之间。由此可知抵抗素是由脂肪细胞分泌的一种细胞因子,在前脂肪细胞中检测不到,但是前脂肪细胞分化为脂肪细胞后即可检测到。根据这一特点,我们可在体外研究一些影响因素对抵抗素表达的影响。

3.2 TAO 患者眼眶脂肪组织以成熟脂肪细胞为主

Sorisky 等^[8]研究显示前脂肪细胞纤维母细胞,眶纤维母细胞的一个亚群,暴露于适当的旁分泌刺激能够分化成脂肪细胞。虽然导致这个效应的激素、细胞因子仍不能详细描述,但已清楚 TAO 患者眼眶脂肪组织更细胞化,能够分化成脂肪细胞的前脂肪细胞占更高比例。本研究亦证实由 TAO 患者眼眶脂肪组织培养出来的前脂肪细胞,在体外分化液的作用下可分化为成熟的脂肪细胞,富含脂滴。TAO 患者眼眶脂肪组织石蜡切片免疫组化结果显示:脂肪细胞胞浆中存在丰富的抵抗素蛋白,由上文已知抵抗素是一种由成熟脂肪细胞分泌的细胞因子,说明 TAO 患者眼眶脂肪组织以成熟脂肪细胞为主,即前脂肪细胞在体内某些因素影响下向脂肪细胞分化增加。而对照组眼眶脂肪组织中抵抗素 mRNA 及蛋白的表达均较 TAO 患者弱,说明对照组眼眶脂肪组织中成熟脂肪细胞较 TAO 患者少,进一步说明 TAO 患者眼眶脂肪组织以成熟脂肪细胞为主。

3.3 抵抗素可能参与 TAO 的发生发展

Kim 等^[7]研究发现抵抗素可抑制 3T3-L1 前脂肪细胞向脂肪细胞分化,但 Gong 等^[8]近来研究显示抵抗素促进 3T3-L1 前脂肪细胞分化。抵抗素可能通过脂肪细胞分化这条途径参与 TAO 发生、发展,但关于抵抗素究竟是抑制还是促进前脂肪细胞分化,尤其是人前脂肪细胞,尚需更多的实验研究来探讨。抵抗素与炎症过程中涉及的蛋白有类似的结构,其表达方式和生理功能与其它已知促炎症细胞因子,例如 IL-6 和 TNF- α 类似, Fantuzzi^[9] 研究显示在人体中,抵抗素似乎是炎症状态的关键媒介。本研究显示 TAO 患者眼眶脂肪组织中抵抗素表达较对照组丰富,因此我们推测抵抗素,作为一种具有促炎症特性的脂肪因子,可能通过上调 IL-6

和 TNF- α 水平参与 TAO 患者眼眶炎症的发展, 但具体途径需进一步研究探讨。

本研究证实抵抗素在 TAO 患者眼眶脂肪组织中广泛表达, 在前脂肪细胞中检测不到, 但在前脂肪细胞向脂肪细胞分化时很快出现。抵抗素的促炎症特性可能在 TAO 患者眼眶炎症发展中起一定作用。抵抗素对 TAO 患者眼眶前脂肪细胞分化的影响及在眼眶炎症发展中的作用值得进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] HEUFELDER A E. Pathogenesis of ophthalmopathy in autoimmune thyroid disease [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2000, 1(1-2):87-95.
 - [2] 王莉菲, 吴中耀, 杨华胜, 等. 甲状腺相关眼病患者眼眶前脂肪细胞的培养及分化[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(3): 351-353.
 - [3] MCTERMAN P G, MCTERMAN C L, CHETTY R, et al. Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(5):2407-2410.
 - [4] STEPPAN C M, BAILEY S T, BHAT S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes [J]. Nature, 2001, 409(6818): 307-312.
 - [5] BANERJEE R R, LAZAR M A. Resistin: molecular history and progenesis [J]. J Mol Med, 2003, 81(4):218-226.
 - [6] SORISKY A, PARDASANI D, GAGNON A, et al. Evidence of adipocyte differentiation in human orbital fibroblasts in primary culture [J]. J Clin Endocrinol Metab, 1996, 81(9):3428-3431.
 - [7] KIM K H, LEE K, MOON Y S, et al. A cystein-rich adipose tissue specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation [J]. J Biol Chem, 2001, 276(14): 11252-11256.
 - [8] GONG H, NI Y, GUO X, et al. Resistin promotes 3T3-L1 preadipocyte differentiation [J]. Eur J Endocrinol, 2004, 150(6):885-892.
 - [9] FANTUZZI G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation [J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 115(5): 911-919.
- (编辑 刘清海)
-
- (上接第 253 页 from page 253)
- Immune responses in adult rhesus monkeys vaccinated with A₁₋₁₅ vaccine[J]. Chin Med J, 2005, 118(8): 660-664.
- [8] 胡金家, 汪华侨, 李国营, 等. 铝佐剂 A₄₂ 及其亚单位疫苗可有效诱导大鼠产生特异性抗体[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(1):39-44.
 - [9] 李国营, 胡金家, 林贤, 等. A₄₂ 不同片段肽疫苗免疫鼠后血清对 A₄₂ 诱导细胞毒性作用的影响[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(2):102-104.
 - [10] 林贤, 胡金家, 汪华侨, 等. A₄₂ 及其亚单位疫苗接种正常成年大鼠的行为学观察[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(3):208-211.
 - [11] WYCHOWSKI C, BENICHO D, GIRARD M. A domain of SV40 capsid polypeptide VP1 that specifies migration into the cell nucleus[J]. EMBO J, 1986, 5(10): 2569-2576.
- (编辑 张恩健)