

TLR4/HIF-1 α 信号通路介导糖化低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞损伤

邱军辉¹, 刘美志², 孙杜桑², 潘 婷³, 赵维维², 沙雯君², 鲁 郡², 雷 涛^{1,2}

摘要 目的 研究糖化低密度脂蛋白(Gly-LDL)对人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的炎症损伤及 Toll 样受体 4(TLR4)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)表达的影响,并探讨其可能的机制。方法 体外培养 HUVECs,实验分为对照组、阳性对照组[50 mg/L 普通低密度脂蛋白(n-LDL)]、Gly-LDL(50、75、100 mg/L)组。CCK-8 法测定细胞增殖情况;划痕实验测定细胞迁移能力;ELISA 法测定肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)分泌水平;qRT-PCR 测定 TLR4、HIF-1 α 、TNF- α 、IL-6 mRNA 水平;Western blot 测定 TLR4、HIF-1 α 、TNF- α 、IL-6 蛋白水平;分别用 TLR4、HIF-1 α 的 si-RNA 干预 Gly-LDL 对 HUVECs 的作用,实验分为对照组、模型组(Gly-LDL 100 mg/L)、si-TLR4 组(Gly-LDL 100 mg/L + si-TLR4)、TLR4 空载组(Gly-LDL 100 mg/L + si-NC1)、si-HIF-1 α 组(Gly-LDL 100 mg/L + si-HIF-1 α)和 HIF-1 α 空载组(Gly-LDL 100 mg/L + si-NC2)。Western blot 法检测 TLR4、HIF-1 α 蛋白表达水平,验证 TLR4、HIF-1 α 相互作用关系。结果 Gly-LDL(50、75、100 mg/L)组均可抑制 HUVECs 的增殖及迁移能力($P < 0.01$),刺激 HUVECs 中炎症细胞因子 TNF- α 、IL-6、ICAM-1、VCAM-1 分泌量增加($P < 0.001$),上调 TLR4、HIF-1 α 、TNF- α 、IL-6 mRNA 和蛋白水平($P < 0.05$),并呈浓度依赖性。敲除 TLR4 后,与模型组相比,TLR4、HIF-1 α 蛋白表达均下调($P < 0.001$)。敲除 HIF-1 α 后,与模型组相比,仅 HIF-1 α 蛋白表达下调($P < 0.001$),而 TLR4 蛋白在 Gly-LDL 作用下表达上调。结论 Gly-LDL 可能通过上调 TLR4/HIF-1 α 炎症信号通路抑制 HUVECs 的增殖与迁移,上调炎症细胞因子表达,导致血管内皮损伤。

关键词 糖化低密度脂蛋白;人脐静脉内皮细胞;Toll 样受体 4;缺氧诱导因子-1 α

中图分类号 R 589.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)10-1614-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.10.019

糖尿病是全球增长最快的疾病之一,预计到 2045 年将影响 6.93 亿成年人^[1]。近年来,我国糖尿病的发病率逐年升高,其主要危害在于糖尿病的慢性并发症,而糖尿病最主要的慢性并发症是血管病变^[2]。研究^[3]显示血管内皮功能损伤既是血管病变的重要病理基础,也是糖尿病预后的决定性因素。糖尿病患者体内多同时存在高血糖和脂代谢紊乱状态,低密度脂蛋白极易发生非酶促糖基化,形成糖化低密度脂蛋白(glycated low density lipoprotein, Gly-LDL)^[4]。Gly-LDL 能够影响内皮细胞形态和功能,但具体作用机制尚未阐明。该研究旨在探讨 Gly-LDL 诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)炎症反应的具体机制,为防治血管内皮损伤提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 HUVECs 购自上海中科院细胞研究所。

1.1.2 主要试剂 LDL Human 购自广州奕元生物科技有限公司;葡萄糖购自上海生工生物工程股份有限公司;CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所;ECM 购自美国 ScienCell 公司;0.25% 胰酶消化液购自美国 Gibco 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5 $\times$)购自上海碧云天生物科技有限公司;ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;TRIzol 购自 Invitrogen 公司;PrimeScriptTM RT Master Mix Kit 和 SYBR[®] Primix Ex TagTM Kit 购自美国 TaKaRa 公司;Toll 样受体 4(toll like receptor 4, TLR4)、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、 β -actin 抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗、HRP 标记的兔抗小鼠 IgG 二抗购自美国 Abcam

2022-06-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81774083);上海市医学重点专科建设项目(编号:ZK2019B16);上海市普陀区卫生健康系统临床特色专科建设项目(编号:2020tszk01)

作者单位:¹ 安徽医科大学上海普陀中心临床学院,上海 200062

² 上海中医药大学附属普陀医院内分泌科,上海 200062

³ 成都中医药大学医学与生命科学学院,成都 610000

作者简介:邱军辉,男,硕士研究生;

雷 涛,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: leitao5899@126.com

公司。

1.1.3 主要仪器 细胞超净工作台购自 ESCO 公司;全波长酶标仪购自 Bio-Rad 公司;荧光显微镜购自美国莱卡公司;电泳系统购自美国 Bio-Rad 公司;离心机购自 Eppendorf 公司;实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 Gly-LDL 的制备 参考文献^[5]报道,在无菌条件下,将 0.2 mol/L 葡萄糖与 2 g/L LDL Human 在 37 ℃ 培养箱中避光孵育 4 周,同时加入 1 g/L EDTA 和 10 μmol/L 二丁基羟基甲苯。第 1、7、14、21、28 天提取 100 μl 样品保存于 -80 ℃,检测 Gly-LDL 水平。孵育完成后在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中透析 48 h 备用。

1.2.2 细胞培养 从液氮中取出冻存细胞,在 37 ℃ 水浴锅中解冻并离心,用完全培养基复苏细胞,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖活力 将处于对数生长期的 HUVECs 制备细胞悬液,按照 1 × 10⁴ 个细胞/孔的密度将细胞悬液接种至 96 孔板中,每孔 100 μl,每组设立 5 个重复孔。待细胞完全贴壁后,按照不同干预措施将细胞分为对照组、阳性对照组 [50 mg/L 普通低密度脂蛋白 (normal low density lipoprotein, n-LDL)、Gly-LDL (50、75、100 mg/L) 组,干预 24 h 后用含 10% CCK-8 的培养基进行换液,避光孵育,每隔 30 min 使用酶标仪测定每组在 450 nm 处的吸光度,取各组实验的平均值,重复 3 次实验。

1.2.4 划痕实验检测细胞迁移能力 在 6 孔板中以 2 × 10⁵ 个细胞/孔的密度培养细胞,待细胞长至 80% ~ 90% 时,用枪头于板底划线,PBS 洗去漂浮细胞,更换含 1% FBS 低血清培养基后加入不同浓度 Gly-LDL 继续培养,于显微镜下拍摄 0 h 细胞划痕图片,12 h 后在同一位置拍摄图片,计算划痕区域面积,求得愈合率。

1.2.5 ELISA 法检测细胞上清液中 TNF-α、IL-6、细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 含量 取 24 h 后各组细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书检测上清液中 TNF-α、IL-6、VCAM-1、ICAM-1 含量。

1.2.6 qRT-PCR 检测 HUVECs 中 TLR4、HIF-1α、TNF-α、IL-6 mRNA 水平 在 6 孔板中培养内皮细胞,干预 24 h 后收集各组内皮细胞,按说明书提取

内皮细胞中总 RNA,采用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,实时荧光定量 PCR 进行目的基因扩增。PCR 扩增体系:2 × TB Green 10.0 μl,引物各 0.4 μl,引物序列见表 1,50 × ROX ReferenceDye II 0.4 μl,cDNA 2 μl,ddH₂O 6.8 μl,总体积 20 μl。反应条件:95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 退火 5 s,60 ℃ 延伸 34 s,共 40 个循环,95 ℃ 延伸 15 s。以 β-actin 为内参,2^{-ΔΔCt} 计算。

表 1 引物序列

基因名	序列
TLR4	F:5'-TCCCCTGAGGCATTTAGGCA-3' R:5'-GAAAAGGCTCCAGGGCTAA-3'
HIF-1α	F:5'-CACCACAGACAGTACAGGAT-3' R:5'-CGTGCTGAATAATACCACTCACA-3'
TNF-α	F:5'-GGAAAGGACACCATGAGC-3' R:5'-CCACGATCAGGAAGGAGA-3'
IL-6	F:5'-CAATAACCACCCCTGACC-3' R:5'-GCGCAGAATGAGATGAGTT-3'
β-actin	F:5'-AGCACAGAGCCTCGCCTTTG-3' R:5'-CTTCTGACCCATGCCCAACA-3'

1.2.7 Western blot 检测 TLR4、HIF-1α、TNF-α、IL-6 蛋白水平 将 3 ~ 4 代 HUVECs 细胞接种于 6 孔板中,每孔 2 × 10⁵ 个细胞,待细胞长至 80% 时,将完全培养基更换成低血清培养基进行饥饿处理 8 h,对细胞进行干预处理 24 h 后,吸弃 6 孔板中培养基,预冷 PBS 洗涤 2 次,每孔加入 120 μl RIPA 裂解液置于冰上充分裂解 30 min,4 ℃、14 000 r/min 离心 15 min,取上清液至预冷离心管中,按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书步骤对每组样品进行定量检测,加入适量蛋白上样缓冲液后 100 ℃ 加热 5 min 变性。取 20 μg 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,再将蛋白转移到 PVDF 膜,用 5% BSA 室温封闭 1 h,洗膜后分别加入 TLR4 一抗 (1 : 1 000)、HIF-1α 一抗 (1 : 1 000)、TNF-α 一抗 (1 : 1 000)、IL-6 一抗 (1 : 1 000)、β-actin 一抗 (1 : 5 000) 4 ℃ 孵育过夜,次日 TBST 漂洗 PVDF 膜 3 次,5 min/次,加入二抗 (1 : 20 000) 室温摇床孵育 2 h,TBST 漂洗 3 次,5 min/次。暗室 ECL 显影获取图片,用 ImageJ 软件分析出各组蛋白与内参的灰度值,得出各组蛋白与内参的灰度比值,反映出各组蛋白的相对表达水平。

1.2.8 Gly-LDL 干预下沉默 TLR4、HIF-1α 后 TLR4、HIF-1α 蛋白表达水平 在 6 孔板中接种 3 ~ 5 代细胞,每孔细胞数约为 2 × 10⁵ 个,在恒温培养箱中培养细胞生长至 80% 左右开始后续实验。转

染前将培养基换成不含血清和双抗的培养基,以免影 响转染效率。分别设为对照组、模型组(Gly-LDL 100 mg/L)、si-TLR4 组(Gly-LDL 100 mg/L + si-TLR4)、TLR4 空载组(Gly-LDL 100 mg/L + si-NC1)、si-HIF-1 α 组(Gly-LDL 100 mg/L + si-HIF-1 α)和 HIF-1 α 空载组(Gly-LDL 100 mg/L + si-NC2)。提前将 si-TLR4、si-NC1、si-HIF-1 α 、si-NC2 冻干粉用原装 DEPC 水进行溶解,取 siRNA,用 opti-MEM 培养基稀释 siRNA,终浓度为 10 μ mol/L,总体积为 250 μ l,静置 5 min;同时取 2 μ l Lipofectamine 2000 与 248 μ l opti-MEM 培养基混匀,静置 5 min。将上述两种液体混合,静置 20 min。每孔先加入 1 500 μ l opti-MEM 培养基,20 min 之后将 500 μ l 混合液加入 6 孔板中。6 h 后将 opti-MEM 更换为完全培养基,继续培养 48 h,后续根据实验需要进行下一步操作。实验重复 3 次。小干扰序列列表 2。

表 2 小干扰序列

siRNA	序列
si-TLR4	上游:5'-GGACCUCUCUCAGUGUCAATT-3'
	下游:5'-UUGACACUGAGAGAGGUCCAG-3'
si-HIF-1 α	上游:5'-GGAAAUGAGAGAAAUGCUUTT-3'
	下游:5'-AAGCAUUUCUCUCAUUUCCTC-3'

1.3 统计学处理 实验数据采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验各组变量的正态性,非正态分布资料经过对数转换后分析,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验,组间多重比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Gly-LDL 对 HUVECs 增殖活力的影响

不同浓度 Gly-LDL 处理内皮细胞,在 24 h 检测细胞增殖活力的改变,CCK-8 法检测结果显示:细胞活力差异有统计学意义($F = 69.96, P < 0.001$),与对照组 OD 值(1.09 ± 0.10)相比,n-LDL 组 OD 值(0.96 ± 0.03)显示对 HUVECs 增殖活力无影响,差异无统计学意义($P > 0.05$);而 Gly-LDL(50、75、100 mg/L)组 OD 值分别为(0.70 ± 0.03)、(0.59 ± 0.02)、(0.53 ± 0.03),与对照组相比,细胞存活率分别下降 36.16%、45.77%、51.24%,呈剂量依赖性($P < 0.01$);与 n-LDL 组相比,Gly-LDL 50 mg/L 组细胞存活率下降 27.08% ($P < 0.001$)。

2.2 Gly-LDL 对 HUVECs 迁移能力的影响 不同浓度 Gly-LDL 处理 HUVECs,在 12 h 检测细胞迁移能力的改变,细胞划痕实验结果(图 1)显示:细胞迁移能力差异有统计学意义($F = 139.85, P < 0.001$),与对照组愈合率(52.03 ± 1.79)相比,n-LDL 组愈合率(48.55 ± 1.93)显示对细胞迁移能力无影响,差异无统计学意义($P > 0.05$);而 Gly-LDL(50、75、100 mg/L)组愈合率分别为(35.88 ± 2.40)、(22.68 ± 3.10)、(17.65 ± 1.59),与对照组相比,细胞迁移率分别下降 31.04%、56.40%、66.08%,呈剂量依赖性($P < 0.001$);与 n-LDL 组相比,Gly-LDL 50 mg/L 组细胞迁移率下降 26.10% ($P < 0.01$)。

2.3 Gly-LDL 对 HUVECs 细胞因子表达的影响

ELISA 法检测 TNF- α 、IL-6、ICAM-1、VCAM-1 分泌水平,结果(表 3)显示:各组 TNF- α 、IL-6、ICAM-1、VCAM-1 分泌量差异有统计学意义($F = 333.80$ 、 68.91 、 127.07 、 $79.56, P < 0.001$),与对照组相比,n-LDL 组 TNF- α 、IL-6、ICAM-1、VCAM-1 分泌水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与对照组相比,Gly-LDL(50、75、100 mg/L)组 TNF- α 、IL-6、ICAM-1、

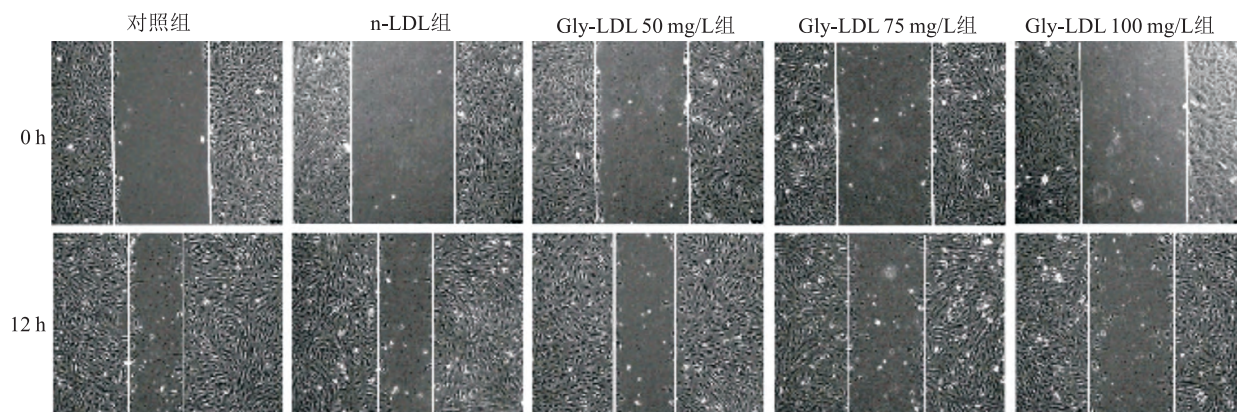
图 1 细胞划痕实验检测不同浓度 Gly-LDL 对 HUVECs 迁移能力的影响 $\times 100$

表3 Gly-LDL对HUVECs细胞因子表达的影响(ng/L , $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	TNF- α	IL-6	ICAM-1	VCAM-1
对照	25.64 $\pm$ 0.54	100.87 $\pm$ 5.82	43.39 $\pm$ 1.72	14.05 $\pm$ 0.43
n-LDL	28.88 $\pm$ 0.43 **	130.44 $\pm$ 4.38 **	51.28 $\pm$ 2.15 *	18.76 $\pm$ 0.72 **
Gly-LDL 50 mg/L	34.18 $\pm$ 0.75 ***###	145.27 $\pm$ 4.95 ***	77.30 $\pm$ 3.18 ***###	19.70 $\pm$ 0.63 ***
Gly-LDL 75 mg/L	38.79 $\pm$ 0.63 ***	159.29 $\pm$ 5.24 ***	101.35 $\pm$ 3.65 ***	21.31 $\pm$ 0.56 ***
Gly-LDL 100 mg/L	44.11 $\pm$ 0.47 ***	176.19 $\pm$ 3.85 ***	114.64 $\pm$ 6.62 ***	25.43 $\pm$ 0.85 ***
F 值	333.80	68.91	127.07	79.56

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 n-LDL 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

VCAM-1 分泌水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 n-LDL 组相比, Gly-LDL 50 mg/L 组中 TNF- α 、IL-6、ICAM-1、VCAM-1 分泌水平增高, 其中 TNF- α 、IL-6、ICAM-1 分泌水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 Gly-LDL 对 HUVECs 中 TLR4、HIF-1 α 、TNF- α 、IL-6 mRNA 表达的影响 不同浓度 Gly-LDL 处理细胞 24 h 后, qRT-PCR 结果 (图 2) 显示: 各组 TLR4、HIF-1 α 、TNF- α 、IL-6 mRNA 表达量差异有统计学意义 ($F = 174.35, 275.06, 126.54, 109.70$, $P < 0.05$), 与对照组相比, n-LDL 组和 Gly-LDL (50、75、100 mg/L) 组诱导的 HUVECs 中 TLR4、HIF-1 α 、TNF- α 、IL-6 mRNA 表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 n-LDL 组相比, Gly-LDL (75、100 mg/L) 组中 TLR4、TNF- α 、IL-6 mRNA 水平增高, 差异有统计学意义, 并呈剂量依赖性 ($P < 0.05$)。

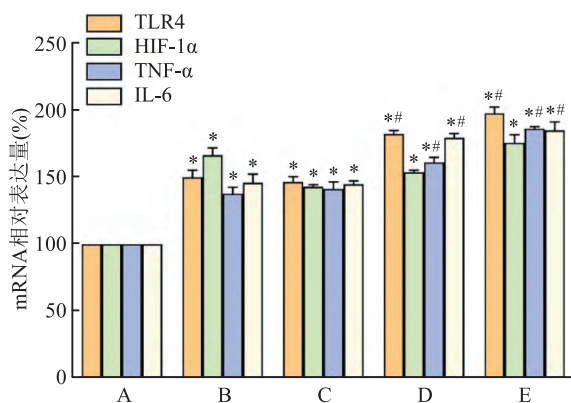


图2 Gly-LDL对HUVECs中TLR4、HIF-1 α 、TNF- α 、IL-6 mRNA表达的影响

A: 对照组; B: n-LDL 组; C: Gly-LDL 50 mg/L 组; D: Gly-LDL 75 mg/L 组; E: Gly-LDL 100 mg/L 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 n-LDL 组比较: # $P < 0.05$

2.5 Gly-LDL 对 HUVECs 中 TLR4、HIF-1 α 、TNF- α 、IL-6 蛋白表达的影响 不同浓度 Gly-LDL 处理细胞 24 h 后, Western blot 检测炎症蛋白 TLR4、HIF-1 α 、IL-6、TNF- α 水平, 结果 (图 3) 显示: 各组

TLR4、HIF-1 α 、TNF- α 、IL-6 蛋白表达量差异有统计学意义 ($F = 47.63, 42.80, 78.25, 21.13$, $P < 0.001$), 与对照组相比, n-LDL 组中 TLR4、TNF- α 蛋白水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与对照组相比, Gly-LDL 50 mg/L 组中 HIF-1 α 、TNF- α 蛋白水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), Gly-LDL 75、100 mg/L 组中 TLR4、HIF-1 α 、TNF- α 、IL-6 蛋白水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

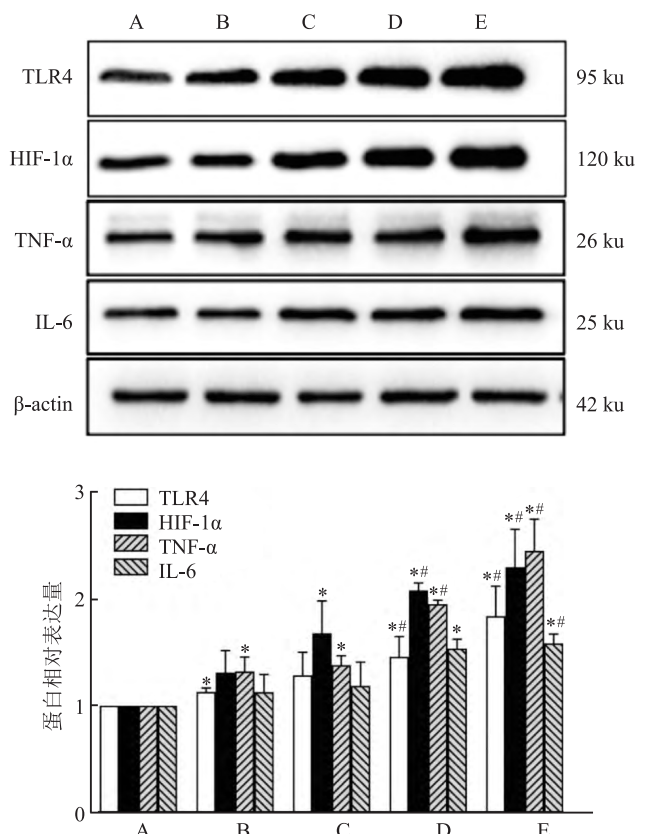


图3 Gly-LDL对TLR4/HIF-1 α 信号通路相关蛋白的影响

A: 对照组; B: n-LDL 组; C: Gly-LDL 50 mg/L 组; D: Gly-LDL 75 mg/L 组; E: Gly-LDL 100 mg/L 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 n-LDL 组比较: # $P < 0.05$

2.6 检测 HUVECs 中沉默 TLR4、HIF-1 α 蛋白效率 分别用 si-TLR4、si-HIF-1 α 转染 HUVECs, Western blot 结果 (图 4) 显示: 与 si-NC 组相比, si-TLR4

组中 TLR4 蛋白表达下调 44.18%, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); 与 si-NC 组相比, si-HIF-1 α 组中 HIF-1 α 蛋白表达下调 69.10%, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。

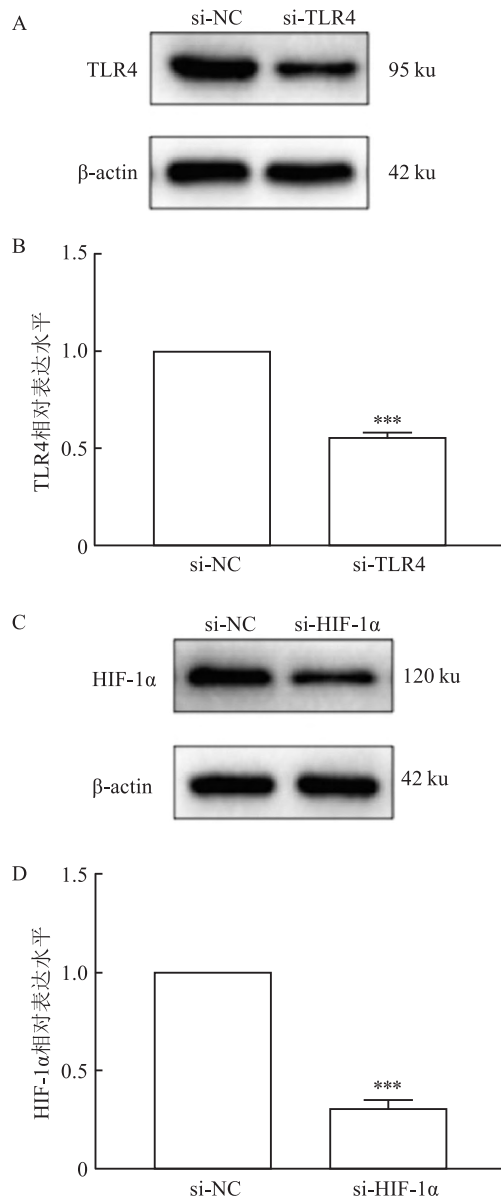


图4 si-TLR4 和 si-HIF-1 α 对 HUVECs 中 TLR4、HIF-1 α 蛋白沉默的影响

A: 沉默 TLR4 效率检验; B: TLR4 蛋白统计分析图; C: 沉默 HIF-1 α 效率检验; D: HIF-1 α 蛋白统计分析图; 与 si-NC 组比较: *** $P < 0.001$

2.7 Gly-LDL 干预下沉默 TLR4、HIF-1 α 后对 HUVECs 中 TLR4、HIF-1 α 蛋白表达的影响 分别用 si-TLR4、si-HIF-1 α 转染 HUVECs 后, 按照实验分组加入 100 mg/L Gly-LDL 干预 24 h, 结果(图 5)显示: 与对照组相比, 模型组中 TLR4、HIF-1 α 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, si-TLR4 组中

TLR4、HIF-1 α 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, si-HIF-1 α 组中 HIF-1 α 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), TLR4 蛋白表达差异无统计学意义; 与对照组相比, si-HIF-1 α 组中 TLR4 蛋白升高 ($P < 0.05$)。

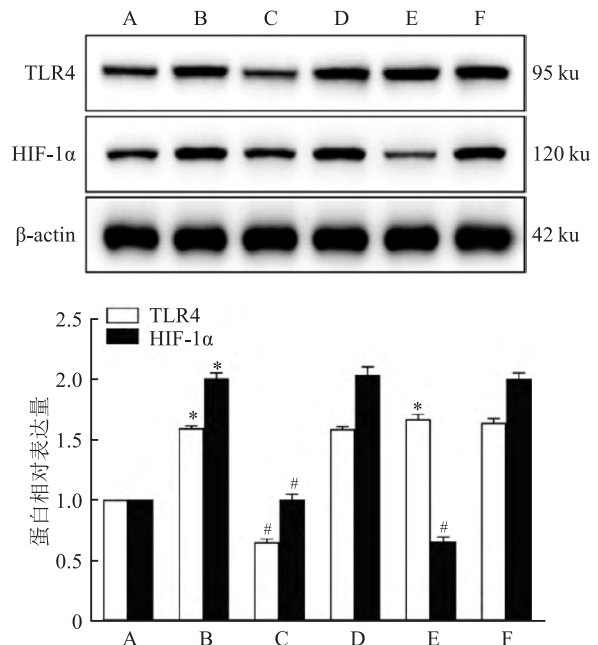


图5 沉默 TLR4、HIF-1 α 对 HUVECs 中 TLR4、HIF-1 α 蛋白表达的影响

A: 对照组; B: 模型组; C: si-TLR4 组; D: TLR4 空载组; E: si-HIF-1 α 组; F: HIF-1 α 空载组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

糖尿病是一种以糖代谢紊乱为主的临床综合征, 糖尿病大血管并发症是糖尿病患者致残致死主要原因^[6], 血管内皮损伤是导致糖尿病大血管并发症的关键因素^[7-8]。因此, 血管内皮损伤是防治糖尿病大血管病变的重要关注点。目前认为, 血管内皮损伤的出现, 在于糖尿病高血糖时, 体内各种蛋白非酶促糖基化反应增强。而晚期糖基化蛋白终末产物 (advanced glycated end products, AGEs) 可损害内皮细胞的形态及其功能, 从而诱发糖尿病血管病变^[9-10]。Gly-LDL 是 AGEs 中最主要成分之一, 但目前 Gly-LDL 与糖尿病血管内皮损伤的关系仅停留在相关性研究中。本研究用 Gly-LDL (50、75、100 mg/L) 处理 HUVECs 24 h, 存活率降低 36.16%、45.77% 和 51.24%; 迁移率降低 31.04%、56.40% 和 66.08%; 并促进 TNF- α 、IL-6、ICAM-1、VCAM-1 细胞因子分泌, 表明 Gly-LDL 能够降低细胞生存率和迁移能力, 促进炎症因子释放, 并呈浓度依赖性。

大量研究^[11-12]显示糖尿病血管内皮损伤与TLR4信号激活有关。在血管内皮病变患者外周血中,巨噬细胞表现为TLR4信号过度激活,使机体处于高度促炎状态^[13]。TLR4参与糖尿病病理生理过程,TLR4能够调节NADPH氧化酶活性,导致体内活性氧增加,加速糖尿病大血管并发症发展^[14];在糖尿病血管内皮损伤中,树突状细胞通过RAGE-TLR4-PKC β 1信号通路介导慢性炎症反应^[15];高迁移率蛋白B1(high mobility group protein B1, HMGB1)在糖尿病发生过程中通过TLR4/eNOS通路参与内皮依赖性舒张功能损伤^[16]。为了验证Gly-LDL是否通过TLR4信号通路介导血管内皮炎症反应,本研究选用HUVECs作为研究对象,结果显示Gly-LDL能提高HUVECs中TLR4、HIF-1 α 、TNF- α 和IL-6 mRNA和蛋白水平,表明Gly-LDL能够激活TLR4信号通路,促进炎症因子TNF- α 和IL-6的表达,介导血管内皮细胞损伤。但是Gly-LDL通过TLR4信号如何调控炎症反应,是目前尚未解决的科学问题。研究^[17]表明TLR4信号能够调控HIF-1 α 影响TNF- α 、IL-1 β 分泌,HIF-1 α 是人和哺乳动物中关键核转录因子,常氧状态下HIF-1 α 的脯氨酸基和门冬氨酸基发生羟基化,与E3泛素化连接酶结合,VHL蛋白能募集泛素连接酶,与泛素化连接酶结合的HIF-1 α 被蛋白酶体降解;低氧状态下,HIF-1 α 羟基化被抑制,与HIF-1 β 结合,在细胞核内与缺氧反应元件结合,激活靶基因转录^[18]。HIF-1 α 能够调节血管内皮生长因子和葡萄糖转运蛋白1表达,并且涉及炎症反应^[19]。为了验证TLR4能否调控HIF-1 α 表达,在Gly-LDL干预下沉默TLR4、HIF-1 α 基因,结果显示:Gly-LDL能够上调TLR4和HIF-1 α 蛋白水平,表明两者可能存在协同作用;沉默TLR4基因后,TLR4和HIF-1 α 蛋白表达下调,而沉默HIF-1 α 基因后,只有HIF-1 α 蛋白表达下调,而TLR4蛋白在Gly-LDL干预下仍是上调,因此推测,Gly-LDL上调TLR4信号,激活HIF-1 α 表达介导HUVECs炎症反应。

综上所述,本研究结果显示:Gly-LDL能够上调TLR4信号,激活HIF-1 α 的表达介导炎症因子释放,降低HUVECs生存率和迁移能力,诱导HUVECs损伤。Gly-LDL水平有望成为衡量糖尿病血管内皮损伤指标之一,并为糖尿病血管内皮损伤临床治疗提供新的潜在靶点。

参考文献

[1] Cole J B, Florez J C. Genetics of diabetes mellitus and diabetes

complications[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(7): 377-90.

- [2] Schalkwijk C G, Stehouwer C D A. Methylglyoxal, a highly reactive dicarbonyl compound, in diabetes, its vascular complications, and other age-related diseases[J]. *Physiol Rev*, 2020, 100(1): 407-61.
- [3] La Sala L, Prattichizzo F, Ceriello A. The link between diabetes and atherosclerosis[J]. *Eur J Prev Cardiol*, 2019, 26(2_suppl): 15-24.
- [4] Silveira Rossi J L, Barbalho S M, Reverete De Araujo R, et al. Metabolic syndrome and cardiovascular diseases: going beyond traditional risk factors[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2022, 38(3): e3502.
- [5] Sima A V, Botez G M, Stancu C S, et al. Effect of irreversibly glycated LDL in human vascular smooth muscle cells: lipid loading, oxidative and inflammatory stress[J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(12): 2790-802.
- [6] Poznyak A, Grechko A V, Poggio P, et al. The diabetes mellitus-atherosclerosis connection: the role of lipid and glucose metabolism and chronic inflammation[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1835.
- [7] Sangle G V, Chowdhury S K, Xie X, et al. Impairment of mitochondrial respiratory chain activity in aortic endothelial cells induced by glycated low-density lipoprotein[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(6): 781-90.
- [8] Abu-Saleh N, Yaseen H, Kinaneh S, et al. Combination of hyperglycaemia and hyperlipidaemia induces endothelial dysfunction: role of the endothelin and nitric oxide systems[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(4): 1884-95.
- [9] Li X, Tao Y, Wang X, et al. Advanced glycosylation end products (AGEs) controls proliferation, invasion and permeability through orchestrating ARHGAP18/RhoA pathway in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Glycoconj J*, 2020, 37(2): 209-19.
- [10] Al Saudi R M, Kasabri V, Naffa R, et al. Glycated LDL-C and glycated HDL-C in association with adiposity, blood and atherogenicity indices in metabolic syndrome patients with and without pre-diabetes[J]. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 2018, 9(10): 311-23.
- [11] Romacho T, Valencia I, Ramos-gonzález M, et al. Visfatin/eNamt induces endothelial dysfunction *in vivo*: a role for toll-like receptor 4 and NLRP3 inflammasome[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 5386.
- [12] Cheng J, Liu Q, Hu N, et al. Downregulation of hsa_circ_0068087 ameliorates TLR4/NF- κ B/NLRP3 inflammasome-mediated inflammation and endothelial cell dysfunction in high glucose conditioned by sponging miR-197[J]. *Gene*, 2019, 709: 1-7.
- [13] 汤祥瑞, 张勇, 祝领, 等. 晚期糖基化产物通过RAGE/TLR4/STAT1信号通路诱导巨噬细胞M1型极化[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(5): 751-6.
- [14] De Oliveira A A, Nunes K P. Crosstalk of TLR4, vascular NADPH oxidase, and COVID-19 in diabetes: What are the potential implications? [J]. *Vascul Pharmacol*, 2021, 139: 106879.
- [15] Zhao L, Li Y, Xu T, et al. Dendritic cell-mediated chronic low-

- grade inflammation is regulated by the RAGE-TLR4-PKC β 1 signaling pathway in diabetic atherosclerosis[J]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 4.
- [16] Zhu Z, Peng X, Li X, et al. HMGB1 impairs endothelium-dependent relaxation in diabetes through TLR4/eNOS pathway[J]. *Faseb J*, 2020, 34(6): 8641–52.
- [17] Chen Q F, Wang W, Huang Z, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α attenuates myocardial inflammatory injury in rats induced by coronary microembolization[J]. *An Acad Bras Cienc*, 2020, 92(1): e20190658.
- [18] Moldogazieva N T, Mokhosoev I M, Terentiev A A. Metabolic heterogeneity of cancer cells: an interplay between HIF-1, GLUTs, and AMPK[J]. *Cancers(Basel)*, 2020, 12(4):862.
- [19] Wu G, Xu G, Chen D W, et al. Hypoxia exacerbates inflammatory acute lung injury via the toll-like receptor 4 signaling pathway[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1667.

The TLR4/ HIF-1 α signaling pathway mediates glycated low density lipoprotein induced injury of human umbilical vein endothelial cells

Qiu Junhui¹, Liu Meizhi², Sun Dusang², Pan Ting³, Zhao Weiwei²,
Sha Wenjun², Lu Jun², Lei Tao^{1,2}

(¹Shanghai Putuo Central School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Shanghai 200062;

²Dept of Endocrinolog, Putuo Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062; ³School of Medical and Life Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610000)

Abstract Objective To investigate the effects of glycated low density lipoprotein (Gly-LDL) on the growth of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and the expression of toll like receptor 4 (TLR4) and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), and to explore its possible mechanism. **Methods** HUVECs were cultured *in vitro* and divided into control group, positive control group[50 mg/L normal low density lipoprotein(n-LDL)], low concentration, medium concentration and high concentration Gly-LDL(50, 75, 100 mg/L) groups. Respectively, the effects of different concentrations of Gly-LDL on survival rate of HUVECs were detected by CCK-8; The motility of HUVECs under different treatments were detected by wound healing assays; The level of inflammatory cytokine, such as tumor inducing factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1) were detected by ELISA; The mRNA levels of TLR4, HIF-1 α , TNF- α and IL-6 were detected by qRT-PCR; Protein expressions of TLR4, HIF-1 α , TNF- α and IL-6 were detected by Western blot; Respectively, si-RNA of TLR4 and HIF-1 α was used to intervene the effects of Gly-LDL on HUVECs. The experiment was divided into control group, model group (Gly-LDL 100 mg/L), si-TLR4 group (Gly-LDL 100 mg/L + si-TLR4), TLR4 unloading group (Gly-LDL 100 mg/L + si-NC1), si-HIF-1 α group (Gly-LDL 100 mg/L + si-HIF-1 α) and HIF-1 α unloading group (Gly-LDL 100 mg/L + si-NC2). Protein expressions of TLR4 and HIF-1 α were detected by Western blot to verify the interaction between TLR4 and HIF-1 α . **Results** The survival rate and migration rate of HUVECs were inhibited in Gly-LDL(50 mg/L, 75 mg/L, 100 mg/L) group ($P < 0.01$), the inflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-6, ICAM-1, VCAM-1 increased by Gly-LDL function on HUVECs($P < 0.001$), and the mRNA and protein levels of TLR4, HIF-1 α , TNF- α and IL-6 increased by Gly-LDL in a dose dependent manner. After TLR4 was knocked out, the proteins expression of TLR4 and HIF-1 α were down-regulated compared with model group($P < 0.05$), but after HIF-1 α was knockout, only the protein expression of HIF-1 α was down-regulated compared with model group($P < 0.01$), while the protein expression of TLR4 was up-regulated under the influence of Gly-LDL. **Conclusion** Gly-LDL may inhibit the proliferation and migration of HUVECs by up-regulating TLR4/HIF-1 α inflammatory signaling pathway, and promote the expression of inflammatory cytokines, leading to vascular endothelial injury.

Key words glycated low density lipoprotein; human umbilical vein endothelial cells; TLR4; HIF-1 α