

网络出版时间: 2021-4-2 16:02 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210402.1340.016.html>

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

汤祥瑞¹, 张勇², 祝领², 崔倩卫², 刘仲伟², 石爽²

摘要 目的 探讨晚期糖基化产物(AGEs)诱导巨噬细胞发生 M1 型极化的分子机制。方法 提取小鼠骨髓细胞并分离培养原代 M0 型巨噬细胞。分别用 Toll 样受体 4(TLR4)及 AGEs 受体(RAGE)特异性抑制剂 TAK-242 及 FPS-ZM1 对获得的 M0 型巨噬细胞进行预处理。制备 AGEs 并以 2.5、5 及 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度处理巨噬细胞。流式细胞术检测细胞内活性氧簇(ROS)水平;免疫荧光染色观察 M1 型巨噬细胞表面标记物诱导性一氧化氮合酶(iNOS)表达;酶联免疫吸附试验法对巨噬细胞分泌的炎症因子浓度进行检测;Western blot 检测相关浆蛋白及核蛋白的相对表达水平。结果 AGEs 刺激可使巨噬细胞内 ROS 水平、分泌炎症因子浓度、细胞质 TLR4、磷酸化信号转导与转录激活因子 1(p-STAT1)以及 STAT1 核转位水平显著升高(P 均 < 0.001)。巨噬细胞表面 iNOS 表达水平显著升高(P 均 < 0.001)。且均具有显著的 AGEs 浓度依赖性(P 均 < 0.001)。TAK-242 预处理对 AGEs 诱导的巨噬细胞 iNOS 表达、细胞内 ROS 水平及 TLR4 表达水平无显著影响,可显著降低 AGEs 诱导的巨噬

细胞 iNOS 表达、分泌炎症因子浓度(P 均 < 0.001)、细胞 p-STAT1 表达水平及 STAT1 核转位水平(P 均 < 0.001)。FPS-ZM1 预处理可显著抑制 AGEs 诱导的巨噬细胞内 ROS 水平($P < 0.001$)、分泌炎症因子浓度(P 均 < 0.001)、细胞 TLR4 及 p-STAT1 表达水平(P 均 < 0.001)以及 STAT1 核转位水平($P < 0.001$)。结论 AGEs 可通过 RAGE/ROS/TLR4/STAT1 信号通路诱导巨噬细胞向 M1 型极化。

关键词 晚期糖基化产物;巨噬细胞;极化;Toll 样受体 4

中图分类号 R 329.2+5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)05-0751-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.05.015

2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)促进动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)^[1]。M1 型巨噬细胞通过参与局部炎症反应、泡沫细胞生成、血栓形成以及斑块破裂等过程,促进 AS 的发生发展^[2]。由于糖代谢紊乱, T2DM 患者体内产生大量的晚期糖基化产物(advanced glycation end products, AGEs),与细胞表面 AGEs 受体(receptors for AGEs, RAGE)结合后,通过激活 NADPH 氧化酶使细胞内活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)增加^[3]。课题组前期研究^[4]表明,糖尿病时细胞内 ROS 水平升高,导致其下游的 Toll 样受体 4(toll like receptor 4,

2020-12-29 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81700401);中国博士后科学基金特别资助项目(编号:2017T100760)

作者单位:¹ 三二〇一医院心血管内科 汉中 723000

² 陕西省人民医院心血管内科 西安 710068

作者简介:汤祥瑞,男,副主任医师;

石爽,女,副教授,责任作者, E-mail: jmotuz@sina.com

2% DMSO for 120 h and the medium of K562 was changed every 24 h. The changes of cell counts, cell cycle, the positive rate of TMB and the expression of CD235a were detected. **Results** Proliferation of K562 was inhibited in G0/G1 from 48 h to 72 h and G2/M phase from 96 h to 120 h by sodium butyrate, and the positive rate of TMB was(22.02 $\pm$ 2.27) % at 120 h. Hemin had no statistical significance on the proliferation and cell cycle of K562, and the positive rate of TMB was(90.83 $\pm$ 2.69) % at 120 h. The proportion of G0/G1 of K562 treated with DMSO increased, but there was no statistical significance on cell proliferation after 72 h culture, and the positive rate of TMB was(1.84 $\pm$ 0.48) %, which was not significantly different from that of the control group(2.89 $\pm$ 0.18) %. The level of CD235a of K562 exposed to sodium butyrate and Hemin improved compared with control group and DMSO group after cultured 120 h and there was no statistical significance between two groups. However, there was no statistical significance between the expression of CD235a of the DMSO group and the control group. **Conclusion**

According to the comparison the changes of proliferation, cell cycle, positive rate of TMB and expression of CD235a of K562 after erythroid induction, it is found that Hemin is a more effective reagent than DMSO and sodium butyrate in inducing erythroid differentiation of K562.

Key words sodium butyrate; Hemin; DMSO; K562; erythroid differentiation

TLR4) 信号通路激活。信号转导与转录激活因子 1 (signal transducers and activators of transcription 1, STAT1) 是 TLR4 下游的核因子, 激活后发生核转位, 启动靶基因转录诱导巨噬细胞发生 M1 型极化^[5]。该研究拟对 AGEs 可通过巨噬细胞 ROS/TLR4/STAT1 信号通路激活诱导巨噬细胞发生 M1 型极化这一科学假说进行验证, 进一步阐明 T2DM 相关 AS 的发病分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 RPMI 1640 培养液、D-Hanks 培养液及胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Hyclone 公司; FPS-ZM1 购自美国 MCE 公司, TAK-242 购自美国 Abmole 公司, DCFH-DA 活性氧检测试剂盒购自上海 Beyotime 公司, 诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 抗体、Alexa Fluor 555 荧光标记二抗、DAPI、TLR4 抗体、GAPDH 抗体、Histone H3 抗体以及 HRP 标记二抗均购自美国 Abcam 公司; STAT1 抗体以及磷酸化 STAT1 (phosphorylated STAT1, p-STAT1) 抗体购自美国 CST 公司。

1.2 AGEs 的制备 AGEs 的制备方法步骤参考本课题组及既往文献^[6]中的描述进行。即在无菌条件下, 将牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 与 0.1 mmol/L 甘油醛在 0.2 mmol/L 的磷酸钠缓冲液 (pH = 7.4) 中充分混合, 37 °C 孵育 7 d。使用 PD-10 脱盐柱层析法去除未形成基团的糖类。将未与甘油醛混合的 BSA 作为对照。

1.3 M0 型巨噬细胞的分离与培养 原代 M0 型巨噬细胞的分离与培养步骤均按照既往文献^[7]中的描述进行。C57BL/6 小鼠颈椎脱臼法处死后以 75% 酒精充分消毒, 在无菌条件下取出小鼠的股骨及胫骨。去除骨周围组织, 剪去骨两端, 注射器获取骨髓。1 500 r/min 离心 8 min 后, 弃去上清液, 以红细胞裂解液处理。RPMI 1640 培养液重悬细胞后以 40 μm 滤网过滤。以含 20 ng/ml 的 M-CSF 及 20% FBS 的 RPMI 1640 培养基在 37 °C 条件下进行培养。F4/80 染色鉴定获得的 M0 型巨噬细胞。上述动物实验方案经陕西省人民医院医学研究伦理委员会批准。

1.4 细胞处理 根据处理方式不同, 将细胞分为以下几组, 分别为: ① 对照 (control) 组; ② 低浓度 AGEs (L-AGEs) 组: 以终浓度为 2.5 μmol/L 的 AGEs-BSA 培养细胞 48 h; ③ 中浓度 AGEs (M-AGEs) 组: 以终浓度为 5 μmol/L 的 AGEs 培养细胞

48 h; ④ 高浓度 AGEs (H-AGEs) 组: 以终浓度为 10 μmol/L 的 AGEs 培养细胞 48 h; ⑤ RAGE 抑制 [RAGE (-)] 组: 以终浓度为 0.25 μmol/L 的 RAGE 阻断剂 FPS-ZM1 对巨噬细胞进行 2 h 预处理后, 以终浓度为 10 μmol/L 的 AGEs 培养细胞 48 h; ⑥ TLR4 抑制 [TLR4 (-)] 组: 以终浓度为 0.04 μmol/L 的 TLR4 抑制剂 TAK-242 对巨噬细胞进行 2 h 预处理后, 以终浓度为 10 μmol/L 的 AGEs 培养细胞 48 h。

1.5 细胞内 ROS 水平检测 巨噬细胞内 ROS 水平使用流式细胞术进行检测。以磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 对各组细胞进行漂洗 2 遍后, 在暗盒中将各组细胞在 37 °C 条件下与终浓度为 10 μmol/L 的 2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 共培育 30 min。使用 FACS 流式细胞仪 (美国 BD 公司) 在 529 nm 对 DCFH-DA 荧光信号进行检测。

1.6 免疫荧光染色 将各组巨噬细胞制成细胞爬片, PBS 漂洗 3 次后以 4% 多聚甲醛进行固定。0.2% Triton X-100 处理 10 min, PBS 漂洗 3 遍后, 以封闭缓冲液处理 30 min。使用 M1 巨噬细胞表面标记物 iNOS 抗体 (1:500) 在 4 °C 条件下孵育 10 h, PBS 漂洗后, 以 Alexa Fluor 555 标记的 IgG 第二抗体在 37 °C 条件下孵育 2 h。DAPI 复染。最后在倒置荧光显微镜下观察并使用 image J 软件 (ver1.38) 对捕捉的荧光图像进行分析。

1.7 Western blot 检测 离心收集各组巨噬细胞并以胰酶进行消化后, 使用配制好的含苯甲基磺酰氟的 RIPA 蛋白裂解液 (上海 Beyotime 公司) 进行处理。4 °C 条件下 14 000 r/min 离心 10 min 后, 留取上清液并使用总蛋白抽提试剂盒、细胞质蛋白提取试剂盒以及核蛋白提取试剂盒分别对总蛋白、浆蛋白以及核蛋白进行提取。BCA 法对蛋白浓度进行检测, SDS-PAGE 对蛋白样本进行分离后, 电转印法转印至 PVDF 膜。封闭缓冲液在 4 °C 条件下对裁剪的 PVDF 膜封闭 8 h。4 °C 条件下分别使用 TLR4 抗体、STAT1 抗体、p-STAT1、GAPDH 抗体以及 Histone H3 抗体对 PVDF 膜孵育 8 h。TBST 漂洗后, 室温下以相应第二抗体孵育 30 min, ECL 法对 Western blot 进行显色, 使用 image J 软件对捕捉的图像进行分析。

1.8 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 收集各组细胞上清液, 4 °C 条件下 3 000 r/min 离心 20 min。分别

使用白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-12 以及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α) ELISA 试剂盒对样本相应细胞因子水平浓度进行检测。操作步骤均参照相应 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用单因素方差多组数据比较, 组间两两比较采用 LSD 法检验来处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RAGE 及 TLR4 特异性阻断可抑制 AGEs 诱导的巨噬细胞 M0 型向 M1 型转化 如图 1 免疫荧光染色显示, 与 control 组相比, L-AGEs 组 iNOS 平均荧光强度(mean fluorescent intensity, MFI) 较 control 组显著升高($P < 0.001$); M-AGEs 组较 L-AGEs 组显著升高($P < 0.001$); H-AGEs 组较 M-AGEs 组显著升高($P < 0.001$)。TAK-242 预处理可使 TLR4(-) 组 iNOS 荧光强度显著下降, 较 H-AGEs 组显著降低($P < 0.001$); FPS-ZM1 预处理可使 RAGE(-) 组 iNOS 荧光强度显著下降, 较 H-AGEs 组显

著降低 [$F(5, 25) = 557.9, P < 0.0001$]。

2.2 RAGE 及 TLR4 特异性阻断可抑制 AGEs 诱导的巨噬细胞炎性细胞因子分泌 如图 2 所示, L-AGEs 组 IL-6、TNF α 以及 IL-12 的浓度较 control 组均显著升高($P < 0.001$); M-AGEs 组 IL-6、TNF α 以及 IL-12 的浓度较 L-AGEs 组显著升高($P < 0.001$); H-AGEs 组 IL-6、TNF α 以及 IL-12 的浓度较 H-AGEs 组均显著升高($P < 0.001$)。TAK-242 预处理可使 TLR4(-) 组的 IL-6、TNF α 以及 IL-12 的浓度较 H-AGEs 组显著降低($P < 0.001$); FPS-ZM1 预处理可使 RAGE(-) 组 IL-6、TNF α 以及 IL-12 的浓度较 H-AGEs 均显著降低 [$F_{IL-6}(5, 25) = 1445, P < 0.0001$; $F_{TNF\alpha}(5, 25) = 80.12, P < 0.0001$; $F_{IL-12}(5, 25) = 273, P < 0.0001$]。

2.3 RAGE 特异性阻断可抑制 AGEs 诱导的巨噬细胞氧化应激反应 流式细胞术对 DCFH-DA 水平进行检测的结果如图 3 所示。L-AGEs DCFH-DA 组平均荧光强度较 control 组显著升高($P < 0.001$); M-AGEs 组 DCFH-DA MFI 较 L-AGEs 组显著升高($P < 0.001$); H-AGEs 组 DCFH-DA MFI 较 M-AGEs

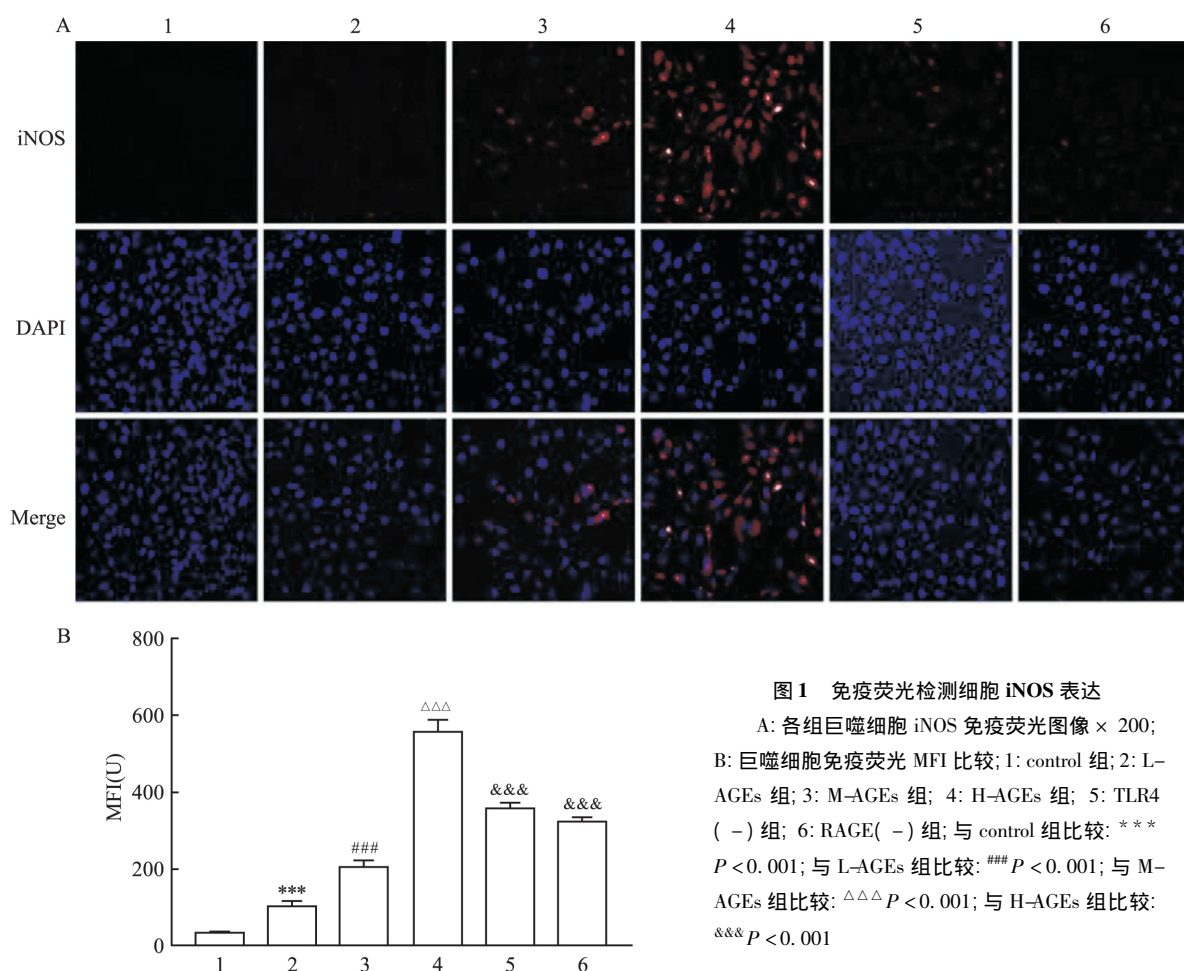


图1 免疫荧光检测细胞 iNOS 表达

A: 各组巨噬细胞 iNOS 免疫荧光图像 $\times 200$;
B: 巨噬细胞免疫荧光 MFI 比较; 1: control 组; 2: L-AGEs 组; 3: M-AGEs 组; 4: H-AGEs 组; 5: TLR4(-) 组; 6: RAGE(-) 组; 与 control 组比较: *** $P < 0.001$; 与 L-AGEs 组比较: ### $P < 0.001$; 与 M-AGEs 组比较: △△△ $P < 0.001$; 与 H-AGEs 组比较: &&& $P < 0.001$

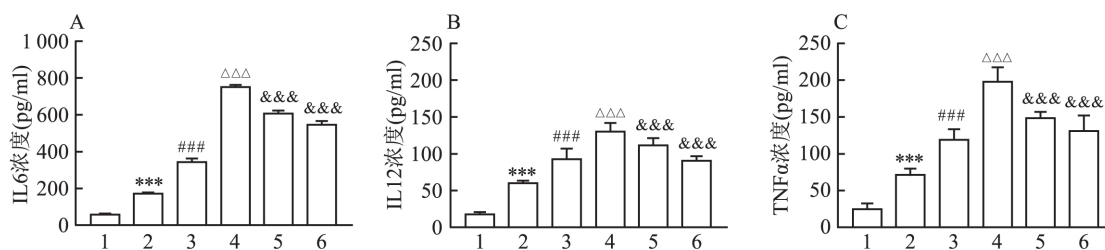


图2 ELISA 法检测细胞培养上清液炎症细胞浓度

A: IL-6 浓度比较; B: IL-12 浓度比较; C: TNF α 浓度比较; 1: control 组; 2: L-AGEs 组; 3: M-AGEs 组; 4: H-AGEs 组; 5: TLR4(-) 组; 6: RAGE(-) 组; 与 control 组比较: *** $P < 0.001$; 与 L-AGEs 组比较: ### $P < 0.001$; 与 M-AGEs 组比较: △△△ $P < 0.001$; 与 H-AGEs 组比较: &&& $P < 0.001$

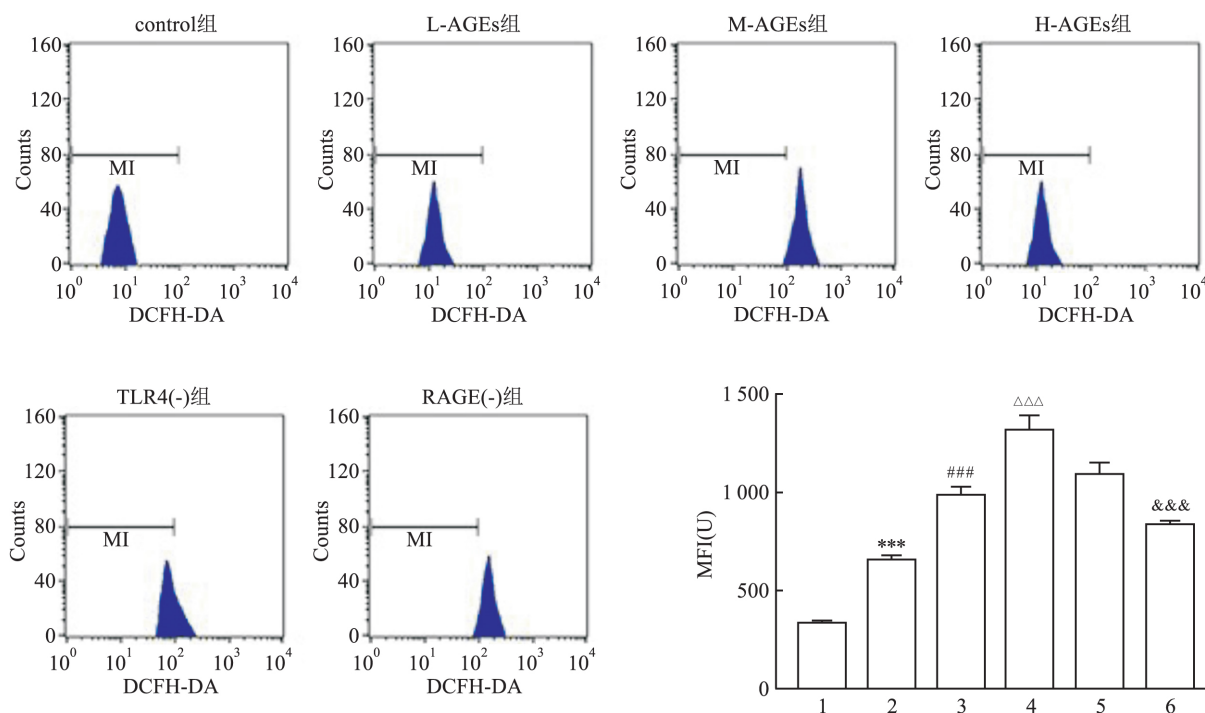


图3 流式细胞术检测细胞内 ROS 水平

1: control 组; 2: L-AGEs 组; 3: M-AGEs 组; 4: H-AGEs 组; 5: TLR4(-) 组; 6: RAGE(-) 组; 与 control 组比较: *** $P < 0.001$; 与 L-AGEs 组比较: ### $P < 0.001$; 与 M-AGEs 组比较: △△△ $P < 0.001$; 与 H-AGEs 组比较: &&& $P < 0.001$

显著升高 ($P < 0.001$)。TAK-242 预处理的 TLR4(-) 组巨噬细胞 DCFH-DA MFI 较 H-AGEs 组差异无显著意义 ($P > 0.05$) ; FPS-ZM1 预处理的 RAGE(-) 组 DCFH-DA MFI 较 H-AGEs 组显著下降 ($P < 0.01$) , [$F(5, 25) = 453.2, P < 0.0001$]。

2.4 RAGE 及 TLR4 特异性阻断可抑制 AGEs 诱导的巨噬细胞 TLR4/STAT1 信号通路激活 如图 4 (A ~ C) 所示, 与 control 组相比, L-AGEs、M-AGEs 及 H-AGEs 组巨噬细胞质蛋白 TLR4 及 p-STAT1 相对表达水平均升高 ($P < 0.001$) 且具有 AGEs 的浓度依赖性 ($P < 0.001$)。FPS-ZM1 预处理可使 H-AGEs

组 TLR4 及 p-STAT1 相对表达水平降低 ($P < 0.001$) ; TAK-242 预处理可使 H-AGEs 组 p-STAT1 相对表达水平降低 ($P < 0.001$) , 而对 TLR4 相对表达水平差异无显著意义。如图 4 (D、E) 所示, 与 control 组相比, L-AGEs、M-AGEs 以及 H-AGEs 组巨噬细胞核蛋白 STAT1 水平升高 ($P < 0.001$) , 且具有显著的 AGEs 的浓度依赖性 ($P < 0.001$)。TAK-242 及 FPS-ZM1 预处理均可使 H-AGEs 巨噬细胞核蛋白内 STAT1 相对表达水平降低 ($P < 0.001$)。 [$F_{\text{TLR4}}(5, 25) = 124, P < 0.0001$; $F_{\text{p-STAT1}}(5, 25) = 188.8, P < 0.0001$; $F_{\text{STAT1}}(5, 25) = 100.6, P < 0.0001$]

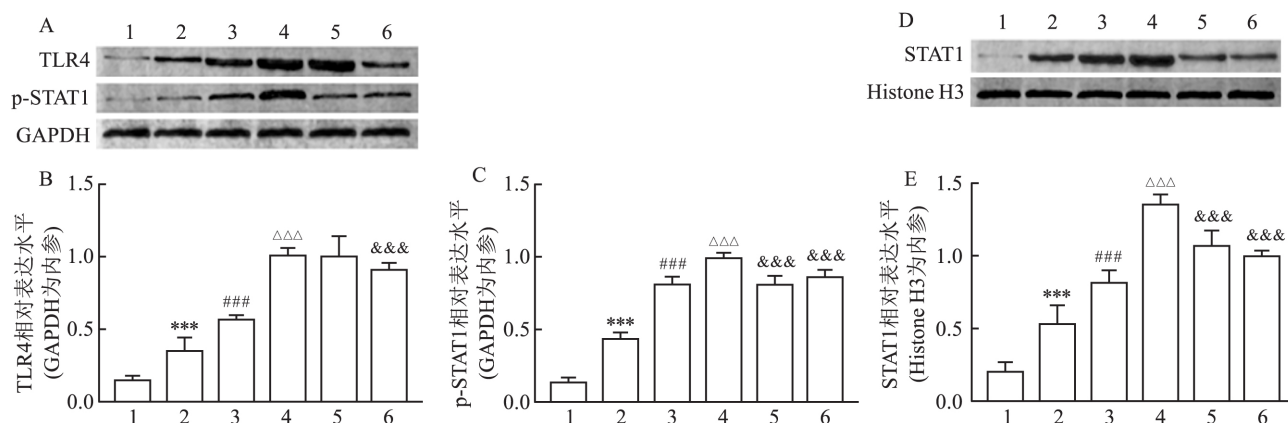


图4 Western blot 法检测蛋白水平

A: Western blot 法检测 TLR4 及 p-STAT1 胞质表达; B: 胞质 TLR4 表达水平比较; C: 胞质 p-STAT1 水平比较; D: Western blot 法检测 STAT1 胞核表达; E: 胞核内 p-STAT1 水平比较; 1: control 组; 2: L-AGEs 组; 3: M-AGEs 组; 4: H-AGEs 组; 5: TLR4(-) 组; 6: RAGE(-) 组; 与 control 组比较: *** $P < 0.001$; 与 L-AGEs 组比较: ### $P < 0.001$; 与 M-AGEs 组比较: △△△ $P < 0.001$; 与 H-AGEs 组比较: &&& $P < 0.001$

3 讨论

当 T2DM 患者持续高血糖状态控制不佳,其体内的蛋白质、脂类以及核酸相互作用发生 Maillard 反应,形成的 Schiff 碱通过 Amadori 反应形成具有病理作用的产物 AGEs,是 T2DM 患者体内异常代谢产物的典型代表^[8]。T2DM 患者的主要心血管事件发生率与其体内的 AGEs 水平有关。本课题组的前期研究^[9-10]表明,AGEs 通过影响不同的细胞参与了 AS 的发生发展。AS 可以被视为动脉壁的慢性炎症,血液循环中的单核细胞被趋化并募集至血管壁内分化为巨噬细胞。巨噬细胞有 M1 及 M2 2 种亚型,其中 M1 型巨噬细胞通过诱发炎症反应具有促进 AS 的作用^[11]。

AGEs 与细胞表面的 RAGE 结合后,可激活细胞内 NADPH 氧化酶导致细胞氧化应激,表现为细胞内 ROS 的大量聚集^[12]。本研究显示,随着外源性 AGEs 浓度的不断升高,巨噬细胞内 ROS 水平升高。TLR4 是巨噬细胞表面识别病原相关分子模式的识别受体之一。TLR4 信号通路的激活被证实与 AS 的发生发展有关^[13]。本研究结果表明,巨噬细胞内 ROS 水平的升高导致了 TLR4 信号通路的激活,表现为 TLR4 表达水平的增加,这与本课题组的前期研究^[4]结果相符。FPS-ZM1 是 RAGE 的拮抗剂,可通过阻断 AGEs 与 RAGE 的结合进而抑制其下游信号的激活。结果表明,对 RAGE 的特异性阻断可使 AGEs 诱导的巨噬细胞内 ROS 含量及 TLR4 表达水平降低。上述结果表明在巨噬细胞内, RAGE/ROS/TLR4 可构成信号通路并可由 AGEs 激

活。

本研究显示,AGEs 作用后,巨噬细胞表面 M1 型标记物 iNOS 表达水平升高,表明 AGEs 可使巨噬细胞发生 M0 型向 M1 型的极化。STAT 通路在哺乳动物细胞高度保守,对诸如细胞生长、凋亡以及免疫应答等均具有调控作用。STAT1 是 TLR4 的下游效应因子,TLR4 信号通路激活后,可指导 STAT1 在胞质内发生磷酸化,形成二聚体后发生核转位,作用于例如 iNOS 等靶基因的启动子。既往研究^[5]表明,STAT1 是巨噬细胞发生 M1 型极化的关键通路之一。TAK-242 通过结合 TLR4 胞内结构域,抑制 TLR4 信号转导。本研究还表明,以 TAK-242 及 FPS-ZM1 分别对 TLR4 和 RAGE 的特异性阻断均可显著抑制巨噬细胞内 STAT1 的磷酸化及核转位,抑制 AGEs 诱导的巨噬细胞 M1 型极化。

参考文献

- [1] Paschou S A, Anagnostis P, Vryonidou A, et al. Diabetes and atherosclerosis: old players in a new field, osteoporosis [J]. Curr Vase Pharmacol, 2018, 16(6): 524-7.
- [2] Tabas I, Bornfeldt K E. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis [J]. Circ Res, 2016, 118(4): 653-67.
- [3] Bongarzone S, Savickas V, Luzi F, et al. Targeting the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE): a medicinal chemistry perspective [J]. J Med Chem, 2017, 60(17): 7213-32.
- [4] Liu Z W, Wang J K, Qiu C, et al. Matrine pretreatment improves cardiac function in rats with diabetic cardiomyopathy via suppressing ROS/TLR-4 signaling pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2015, 36(3): 323-33.
- [5] Gan Z S, Wang Q Q, Li J H, et al. Iron reduces m1 macrophage

- polarization in raw264.7 macrophages associated with inhibition of STAT1 [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 8570818.
- [6] Liu Z W, Wang Y, Zhu H T, et al. Matrine blocks AGEs-induced hscms phenotypic conversion *via* suppressing Dll4-notch pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 835: 126–31.
- [7] Rios F J, Touyz R M, Montezano A C. Isolation and differentiation of murine macrophages [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1527: 297–309.
- [8] Alrabiah M, Al-Aali K A, Al-Sowygh Z H. Association of advanced glycation end products with peri-implant inflammation in prediabetes and type 2 diabetes mellitus patients [J]. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2018, 20(4): 535–40.
- [9] Ma W X, Xu J, Zhang Y, et al. Matrine pre-treatment suppresses ages-induced hscms fibrotic responses by regulating Poldip2/mTOR pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 865: 172746.
- [10] Zhao L, Cai H, Tang Z G, et al. Matrine suppresses advanced glycation end products-induced human coronary smooth muscle cells phenotype conversion by regulating endoplasmic reticulum stress-dependent notch signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 882: 173257.
- [11] 胡波, 张晓刚, 李德才. miR-22 靶向抑制 NLRP3 基因对冠心病内皮细胞炎症损伤的保护作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(5): 668–75.
- [12] Dobi A, Bravo S B, Veeren B, et al. Advanced glycation end-products disrupt human endothelial cells redox homeostasis: new insights into reactive oxygen species production [J]. *Free Radic Res*, 2019, 53(2): 150–69.
- [13] Zeng X Q, Guo R, Dong M, et al. Contribution of TLR4 signaling in intermittent hypoxia-mediated atherosclerosis progression [J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 106.

Advanced glycation end products induces macrophage M1 polarization *via* RAGE/TLR4/STAT1 signaling pathway

Tang Xiangrui¹, Zhang Yong², Zhu Ling², et al

(¹Dept of Cardiology, 3201 Hospital, Hanzhong 723000;

²Dept of Cardiology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xian 710068)

Abstract Objective To investigate the molecular mechanisms of advanced glycation end products (AGEs)–induced macrophage M1 polarization. **Methods** Primary M0 macrophages were isolated from mice bone marrow. Specific inhibitors of Toll-like receptor 4 (TLR4) and receptors for AGEs (RAGE), namely TAK-242 and FPS-ZM1 were used to pre-treat the macrophages. Then the macrophages were exposed to AGEs at 2.5, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ respectively. Flow cytometry was used to detect intracellular reactive oxygen species (ROS) levels; immunofluorescence staining was used to observe the expression of M1 macrophage phenotype hall marker inducible nitric oxide synthase (iNOS); ELISA was used to determine the concentrations of inflammatory cytokines secreted from macrophages; Western blot was used to evaluate relative expression levels of cytosol and nuclear proteins. **Results** AGEs treatment induced elevation of intracellular ROS levels, interleukin 6 (IL6), IL12 and tumor necrosis factor α (TNF α) concentrations, relative expression levels of cytosol TLR4, phosphorylated signal transducers and activators of transcription 1 (p-STAT1) and nuclear STAT1 expressions in macrophages in a concentration dependent manner (all $P < 0.001$). Pre-treatment of TAK242 significantly reduced iNOS expression, inflammatory cytokine concentrations, p-STAT1 expression and STAT1 nuclear translocation in AGEs-treated macrophages in a concentration dependent manner (all $P < 0.001$) without affecting TLR4 expression and intracellular ROS levels. Pre-treatment of FPS-ZM1 significantly reduced iNOS expression, intracellular ROS levels ($P < 0.001$), inflammatory cytokine concentrations (all $P < 0.001$), TLR4 and p-STAT1 expressions (all $P < 0.001$) and STAT1 nuclear translocation ($P < 0.001$) in AGEs-treated macrophages. **Conclusion** AGEs can induce macrophage M1 polarization *via* RAGE/ROS/TLR4/STAT1 signaling pathway.

Key words advanced glycation end products; macrophages; polarization; toll-like receptor 4