

# Btk 抑制剂依鲁替尼对 高糖刺激巨噬细胞炎症的抑制作用及机制

许思敏 范 哲 吴永贵

**摘要** 目的 探讨 Bruton 酪氨酸激酶(Btk)抑制剂依鲁替尼(PCI-32765)对高糖诱导巨噬细胞炎症的抑制作用及机制。方法 以骨髓来源巨噬细胞(BMMs)为研究对象,优化实验条件后,分为低糖组(LG)、抑制剂对照组(LG+PCI-32765)、高糖组(HG)和抑制剂组(HG+PCI-32765)。采用流式细胞术鉴定巨噬细胞,酶联免疫吸附法(ELISA)和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测细胞及细胞上清中炎症因子——单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的含量及mRNA相对表达量;蛋白印记法(Western blot)检测iNOS、Btk、ERK、JNK、p38MAPK、NF- $\kappa$ B p65、I $\kappa$ B及其磷酸化蛋白水平;激光共聚焦法检测巨噬细胞的活化及p65核转移。结果 与低糖组比较,高糖组炎症因子的表达升高( $P < 0.05$ ),抑制剂组较高糖组有下降( $P < 0.05$ );高糖组p-Btk相对表达量较低糖组升高( $P < 0.01$ ),p-ERK、p-JNK、p-p38MAPK、NF- $\kappa$ B p65和p-I $\kappa$ B的相对表达量亦升高( $P < 0.05$ ),而PCI-32765可降低其中p-Btk、p-ERK、NF- $\kappa$ B p65和p-I $\kappa$ B的表达( $P < 0.05$ );巨噬细胞在高糖刺激下发生激活,iNOS表达升高( $P < 0.01$ ),PCI-32765可减低其表达( $P < 0.05$ );高糖刺激下p65发生核转移,PCI-32765使其减少。结论 PCI-32765可以抑制高糖引起巨噬细胞激活,通过下调ERK和NF- $\kappa$ B信号通路抑制炎症因子的释放。

**关键词** Bruton 酪氨酸激酶;依鲁替尼;高糖;NF- $\kappa$ B;炎症

**中图分类号** R 363.2+1

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2020)08-1161-08  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.08.003

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病重要的微血管并发症之一。研究<sup>[1]</sup>表明DN的发生发展与炎症有很大关系,其中肾脏组织巨噬细胞的浸润与肾脏组织炎症有着密切的联系。Bruton 酪氨酸激酶(Bruton's tyrosine kinase, Btk)是一种非受体型酪氨酸激酶,研究<sup>[2]</sup>表明Btk不仅参与了获得

性免疫调节,在固有免疫调节中也起到了重要作用,例如产生炎症因子单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemo-attractant protein-1, MCP-1)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor-alpha, TNF- $\alpha$ )、白细胞介素1 $\beta$ (interleukin-1 beta, IL-1 $\beta$ )<sup>[3]</sup>。此外,研究<sup>[4]</sup>表明Btk活性可以通过与Toll样受体(如TLR2和TLR4)相互作用后产生,增强NF- $\kappa$ B p65亚基的激活作用。总之,Btk在炎症和免疫反应中发挥重要作用。

依鲁替尼(ibrutinib),又名PCI-32765,是一种高度选择性的小分子Btk抑制剂,通过共价结合半胱氨酸481(cysteine 481, Cys-481)抑制Btk活性<sup>[5]</sup>。PCI-32765近年来在临床前研究和临床试验中均显示出很强的抗淋巴瘤活性<sup>[6]</sup>,此外,在动物自身免疫性疾病模型,如类风湿性关节炎中也有使用<sup>[7]</sup>。该研究主要探讨PCI-32765对高糖刺激巨噬细胞释放炎症因子的影响及其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 抗体与试剂** 葡萄糖、甘露醇购自美国Sigma公司;Btk抑制剂PCI-32765购自美国Selleck公司;试剂盒试剂购自美国Invitrogen公司;SYBR Green 荧光定量PCR Master Mix 试剂盒、Revert Aid 第一链cDNA合成试剂盒、CCK-8 试剂盒均购自南京诺唯赞生物科技有限公司;FITC标记的抗小鼠F4/80抗体、APC标记的抗小鼠/抗人CD11b抗体及同型对照均购自美国Bio Legend公司;Btk抗体、细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)抗体、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)抗体、p38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)抗体、核因子 $\kappa$ B(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B) p65抗体和核转录因子抑制蛋白(inhibitor of kappa B, I $\kappa$ B)抗体及其相应磷酸化产物p-Btk抗体、p-ERK抗体、p-JNK抗体、p-p38MAPK抗体、NF- $\kappa$ B p65抗体和p-I $\kappa$ B抗体以及诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)抗体均购自美国Cell Signaling

2020-05-15 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81470965)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肾脏内科,合肥 230022

作者简介:许思敏,女,硕士研究生;

吴永贵,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: wuyonggui@medmail.com.cn

Technology 公司;  $\beta$ -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 抗体和抗鼠 IgG 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司; 蛋白质检测试剂盒购自江苏碧云天生物技术有限公司; 检测鼠 IL-1 $\beta$  的 ELISA 试剂盒均购自广州瑞博奥生物科技有限公司; 检测鼠 MCP-1、TNF- $\alpha$  的 ELISA 试剂盒购自上海依科赛生物科技有限公司; ECL 发光液购自美国 Thermo Scientific 公司。

**1.2 骨髓来源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMMs) 的培养** BMMs 由雄性 C57 小鼠分离获得。选用 6~8 周龄雄性 C57 小鼠的股骨和胫骨, 去除肌肉及结缔组织, 用 75% 乙醇浸泡消毒 3 min 后, 将股骨和胫骨移至 4 °C 预冷的无菌 PBS 溶液中漂洗 1 min。在超净台剪断骨的两端, 用 1 ml 注射器缓缓将骨髓腔内细胞冲洗进含 2% 的胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 4 °C 预冷的无菌 PBS 溶液 (约 6 ml/只) 中。将含有骨髓腔内细胞的冲洗液经 2 290 r/min 4 °C 离心 10 min, 弃去上清液, 加入 3 ml 红细胞裂解液去除红细胞, 2 290 r/min 4 °C 离心 5 min。将沉淀的细胞重悬于含 10% FBS, 1% 青链霉素及 15% L929 细胞上清液的 DMEM 低糖培养基 (5 mmol/L) 中, 在 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 3 d 后更换培养基, 此后每天更换。7 d 后采用流式细胞术检测 BMMs 的成熟度及纯度。

**1.3 细胞活力检测** 采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力。在 96 孔板每个孔中加入  $1 \times 10^4$  个 BMMs。24 h 后, 使用不同浓度的 PCI-32765 或二甲基亚砜处理 BMMs 45 min, 再予以高糖刺激 24 h。向每个孔中加入 10  $\mu$ l CCK-8 溶液, 继续培养 4 h。用酶标仪检测 490 nm 下各孔的吸光度 (OD) 值。细胞活力的计算: 细胞活力 = (加药细胞 OD - 空白 OD) / (对照细胞 OD - 空白 OD)  $\times$  100%。将低糖组的平均细胞活力定为 100%, 其余实验结果以百分比表示。

**1.4 实验条件的优化与实验分组** 采用 20~35 mmol/L 高糖刺激 BMMs, 使用甘露醇作为渗透压对照, 选定影响 Btk 表达及 BMMs 活化的最佳浓度作为实验中的高糖浓度。采用  $10^{-9}$ ~ $10^{-5}$  mmol/L PCI-32765 影响高糖刺激 BMMs, 选定抑制 Btk 表达的最佳浓度作为实验中的抑制剂浓度。根据研究目的和实验条件优化结果, 将 BMMs 分为低糖组 (LG), 抑制剂对照组 (LG + PCI-32765), 高糖组 (HG) 和抑制剂组 (HG + PCI-32765), 其中 LG 组葡萄糖浓度为 5 mmol/L。

**1.5 RNA 提取及 qRT-PCR** RNA 提取和 qRT-

PCR 的操作方法参考文献报道<sup>[8]</sup>。使用 TRIzol 试剂从实验所得 BMMs 中提取总 RNA。通过逆转录反应体系将 1  $\mu$ g RNA 逆转录为 cDNA。采用 SYBR Green 荧光定量 PCR Master Mix 试剂盒完成实时定量 PCR, 实现 cDNA 扩增。检测 mRNA 的引物序列为包括: GAPDH 作为内参: F: 5'-ACCCCAGCAAGGAGACACTGAGCAAG-3', R: 5'-GGCCCTCCTGTATTATGGGGGT-3'; TNF- $\alpha$ : F: 5'-CCCTCCTGGCCAA CGGCATG-3', R: 5'-TCGGGGCAGCCTTGTCCCTT-3'; MCP-1: F: 5'-TTGACCCGTAAATCTGAAGCTAA T-3', R: 5'-TCACAGTCCGAGTCACACTAGTTAC-3'; IL-1 $\beta$ : F: 5'-GCCTCGTGCTGTCCGACCCATAT-3', R: 5'-TCCTTTGAGGCCCAAGGCCACA-3'。使用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 mRNA 相对 GAPDH 的表达量。

**1.6 ELISA** 将 BMMs 根据实验要求按组别处理后从培养基中提取上清液, 5 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 离心后再次留取上清液。根据 ELISA 试剂盒说明书检测 MCP-1、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 。

**1.7 激光共聚焦检测** 将细胞铺板于 24 孔板。在含有 PCI-32765 或不含 PCI-32765 的培养基中预处理 45 min 后, 再加入高糖刺激 24 h, 室温下用 4% 多聚甲醛固定 30 min。使用混合溶液 (5% 驴血清 + 0.2% 聚乙二醇辛基苯基醚) 封闭 2 h 后, 加入 iNOS 或 NF- $\kappa$ B p65 一抗 4 °C 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次后, 加入 F4/80 标记的一抗 Alexa Fluor 647 和二抗 Alexa Fluor 488, 37 °C 避光孵育 2 h。再次用 PBS 洗涤 3 次后, 滴入 DAPI 染色细胞核 10 min。使用 Leica TCS SP5 激光共聚焦显微镜 (Leica 公司, 德国) 观察巨噬细胞。

**1.8 流式细胞术分析** 将成熟的 BMMs 按组别处理后分别收集细胞, 每组  $1 \times 10^6$  个, 2 500 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 用 PBS (500  $\mu$ l/管) 重悬细胞, 加入 CD16/CD32 抗体, 室温处理 20 min 后, 2 500 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 再次以 PBS (500  $\mu$ l/管) 重悬细胞, 加入 FITC 标记的 F4/80、APC 标记的 CD11b, 于室温下避光孵育 30 min。PBS 洗涤两次后, 加入 500  $\mu$ l PBS, 用流式细胞术检测巨噬细胞。

**1.9 Western blot** BMMs 在含有 PCI-32765 或不含 PCI-32765 的培养基中预处理 45 min, 再按实验设计予以高糖刺激。提取各组总蛋白并转移至 PVDF 膜上, 以 5% 脱脂牛奶 37 °C 封闭 2 h 后, 加入一抗 4 °C 孵育过夜。PBST 洗涤 3 次后孵育相应二抗, 孵育条件为 37 °C 45 min。再次用 PBST 洗涤 3

次后,将 PVDF 膜置于 ECL 发光液中 15 ~ 30 s 后,采用化学发光凝胶成像系统检测蛋白表达情况。最后,使用 ImageJ 软件统计各条带灰度值,并与内参比较分析。

**1.10 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组数据间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 BMMs 的鉴定** 巨噬细胞采用 FITC 标记的 F4/80 抗体和 APC 标记的 CD11b 两种抗体标记。如图 1A 所示, F4/80 及 CD11b 均阳性表达的细胞判定为成熟的 BMMs。第 7 天获得纯度为 94.5% 的巨噬细胞。

**2.2 实验条件的优化** 如图 1B 所示, Western blot

分析结果显示在不同浓度的高糖组中, 30 mmol/L 的高糖组中 p-Btk 和 iNOS 表达较 5 mmol/L 低糖组增加最多, 差异有统计学意义 ( $F = 108.938, P < 0.05$ ;  $F = 79.779, P < 0.05$ ) ,因此采用 30 mmol/L 作为实验中高糖浓度。如图 1C 所示, PCI-32765 在  $10^{-6}$  mmol/L 和  $10^{-5}$  mmol/L 对 p-Btk 表达抑制效果最佳 ( $F = 4285.000, P < 0.01$ ;  $F = 426.276, P < 0.01$ ) ,且两者之间的差异无统计学意义, 故选择较低浓度  $10^{-6}$  mmol/L 作为实验中抑制剂对照组和抑制剂组中 PCI-32765 浓度。

**2.3 PCI-32765 对 BMMs 活力的影响** 为了确定 PCI-32765 是否影响 BMMs 活力, 采用不同浓度的 PCI-32765 预处理巨噬细胞 45 min, 再加入高糖刺激 24 h。如图 1D 所示, 与未处理细胞相比,  $10^{-8} \sim 10^{-5}$  mmol/L PCI-32765 无明显细胞毒性, 当 PCI-32765 浓度达到  $10^{-4}$  mmol/L 时, 高糖刺激下的骨髓

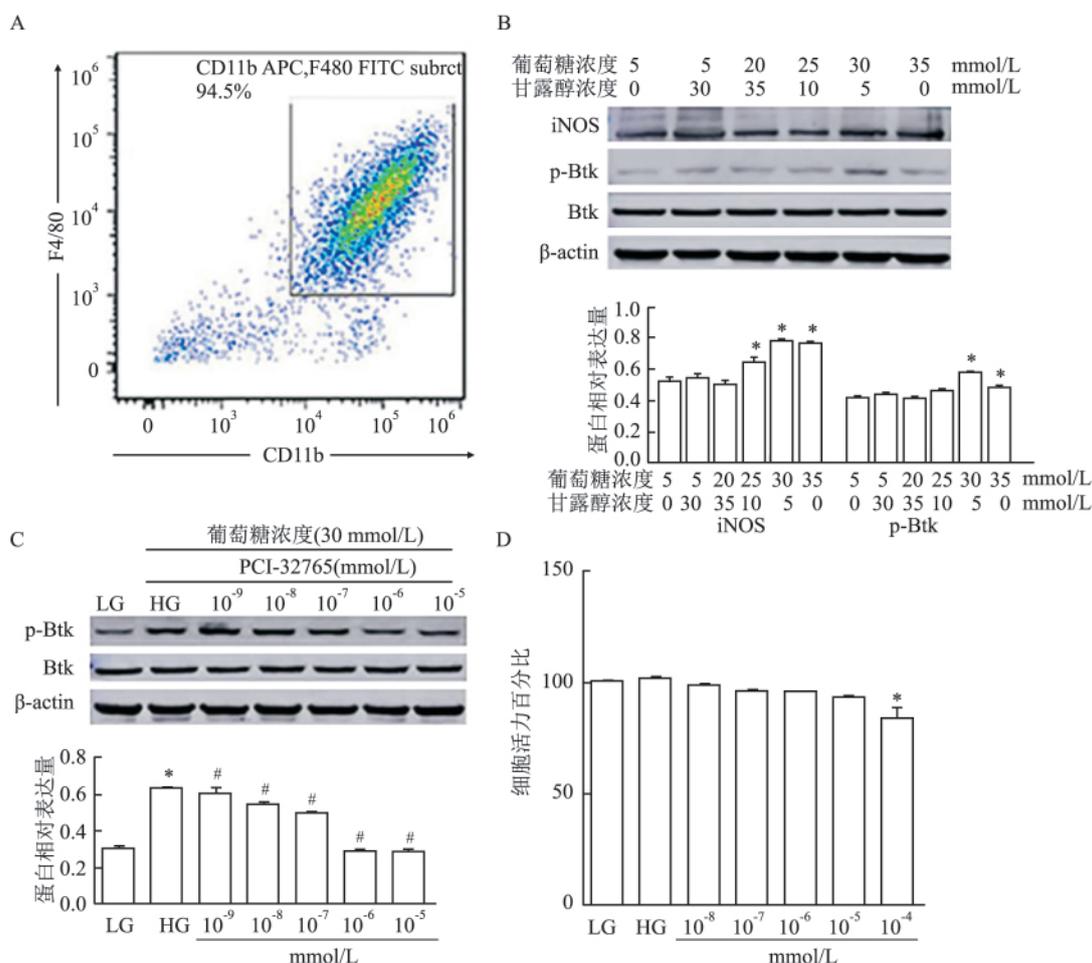


图 1 BMMs 的鉴定

A: BMMs 纯度检测; B: 不同浓度高糖刺激对 BMMs 活化的影响; 与 5 mmol/L 组比较: \*  $P < 0.05$ ; C: 不同浓度 PCI-32765 对高糖刺激 BMMs p-Btk 的抑制作用, 与 LG 组比较: \*  $P < 0.05$ , 与 HG 组比较, #  $P < 0.01$ ; D: 不同浓度 PCI-32765 对高糖刺激 BMMs 活力的影响, 与 LG 组比较: \*  $P < 0.05$

巨噬细胞活力受到影响,差异有统计学意义( $F = 34.287, P < 0.05$ )。

**2.4 PCI-32765 对 BMMs 趋化的影响** 为了检测 PCI-32765 对 BMMs 趋化功能的影响,将高糖诱导的 BMMs 分为 2 组,一组使用 PCI-32765 处理,另一组不使用 PCI-32765,分别检测细胞趋化情况。结果显示,高糖刺激的 BMMs 趋化量高于低糖组( $F = 191.919, P < 0.05$ ),而  $10^{-6}$  mmol/L PCI-32765 预处理后, BMMs 趋化受到抑制( $F = 18.901, P < 0.05$ ) (图 2)。

**2.5 PCI-32765 对 BMMs iNOS 表达的影响** 为了确定 PCI-32765 是否能改变 BMMs 极化,采用共聚焦显微镜分析 BMMs 的表型。结果显示,未处理的巨噬细胞中绿色(iNOS)荧光较弱,而在高糖诱导的 BMMs 中,观察到更强的 iNOS 染色,经 PCI-32765 处理后 iNOS 染色减弱(图 3A)。Western blot 分析结果提示,高糖增加了 iNOS 的表达( $F = 173.206, P < 0.01$ ),PCI-32765 降低了 iNOS 的表达( $F = 22.289, P < 0.05$ ) (图 3B)。

**2.6 PCI-32765 对高糖刺激的 BMMs 炎症因子分泌和 mRNA 水平的影响** 用 ELISA 法分别检测各组培养基上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP-1 含量。如图 4A 所示,高糖组中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MCP-1 的水平高于低糖组,差异具有统计学意义( $F = 10.882, P < 0.05$ ;  $F = 70.218, P < 0.05$ ;  $F = 349.905, P < 0.05$ )。而相比高糖组,PCI-32765 抑制了高糖刺激产生的这些细胞炎症因子,差异有统计学意义( $F = 30.477, P < 0.05$ ;  $F = 22.599, P < 0.05$ ;  $F =$

$370.476, P < 0.05$ )。用 qRT-PCR 法分别检测各组 BMMs 中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MCP-1 的 mRNA 相对表达量。如图 4B 所示,高糖组中, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MCP-1 的 mRNA 水平高于低糖组,差异有统计学意义( $F = 80.279, P < 0.05$ ;  $F = 15.987, P < 0.05$ ;  $F =$

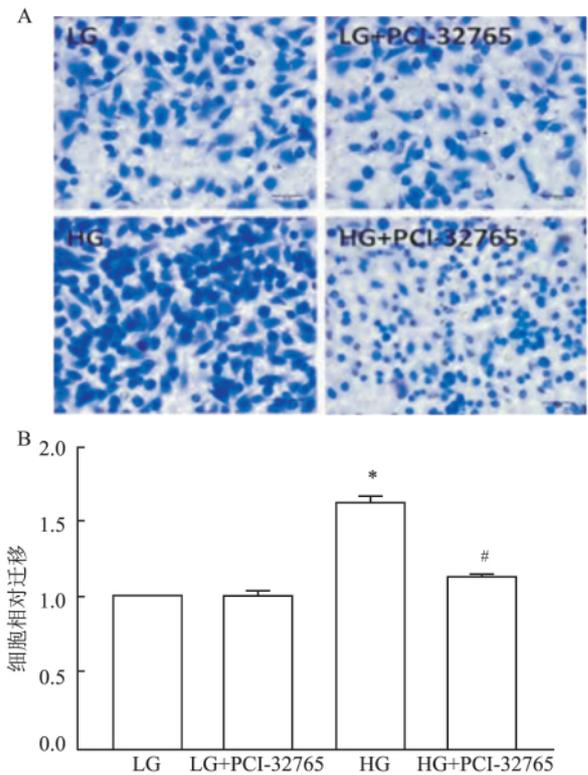


图 2 PCI-32765 对高糖刺激 BMMs 趋化作用的影响 A: 各组 BMMs 迁移情况(苏木精染色  $\times 400$ ); B: 不同组别 BMMs 的相对迁移情况,与 LG 组比较: \*  $P < 0.05$ ,与 HG 组比较: #  $P < 0.05$

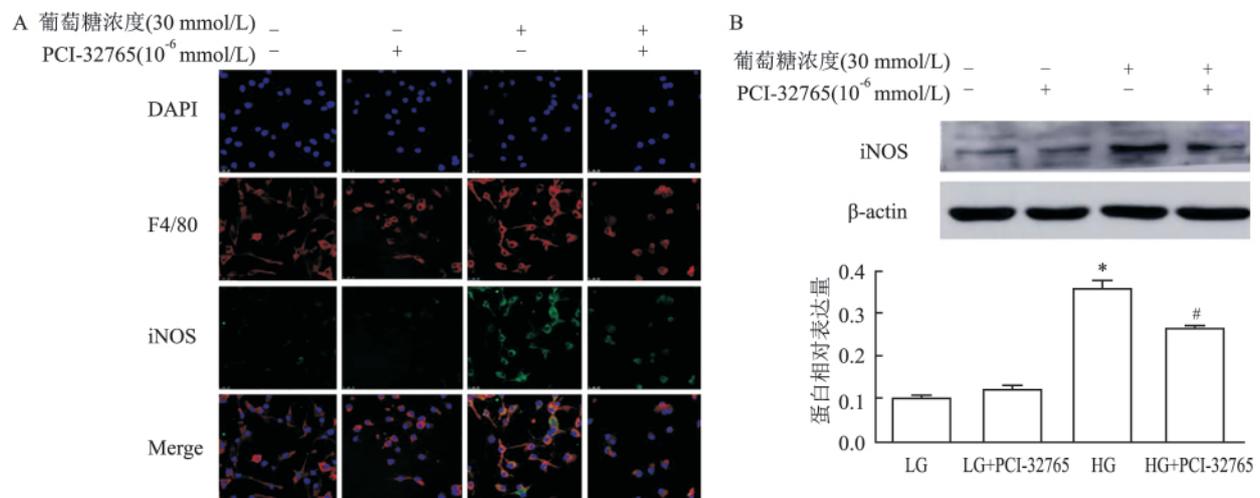


图 3 PCI-32765 对高糖刺激 BMMs 活化的影响

A: 激光共聚焦双标记 F4/80 和 iNOS; B: PCI-32765 对高糖刺激 BMMs iNOS 表达的影响; 与 LG 组比较: \*  $P < 0.01$ ,与 HG 组比较: #  $P < 0.05$

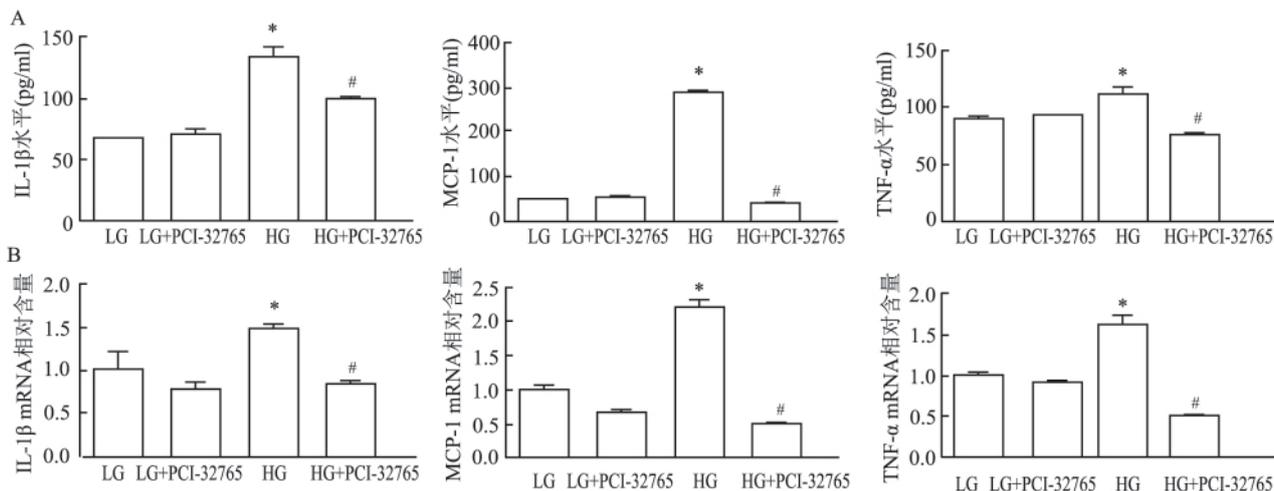


图4 PCI-32765对高糖刺激BMMs分泌促炎因子及mRNA表达的影响

A: PCI-32765对高糖刺激BMMs分泌促炎因子的影响; B: PCI-32765对高糖刺激促炎因子mRNA表达的影响; 与LG组比较: \*  $P < 0.05$  与HG组比较: #  $P < 0.05$

505.917  $P < 0.05$ ) ,而 PCI-32765 抑制了其 mRNA 的表达 ( $F = 285.553, P < 0.05$ ;  $F = 321.007, P < 0.05$ ;  $F = 1588.000, P < 0.05$ ) 。

**2.7 PCI-32765对高糖刺激的BMMs中p-Btk、p-p38MAPK、p-ERK、p-JNK、NF-κB p-p65和p-IκB表达的影响** 检测高糖刺激下,不同时间MAPK及NF-κB信号通路各蛋白表达情况,根据最佳表达时间为选取高糖刺激时长。如图5、6所示,Western blot结果分析表明,高糖诱导的BMMs组中p-Btk表达增加( $F = 313.820, P < 0.01$ ) ,同时 p-p38MAPK、p-ERK、p-JNK和NF-κB p-p65水平亦有增加( $F = 3824.000, P < 0.05$ ;  $F = 1083.000, P < 0.05$ ;  $F = 6147.000, P < 0.05$ ;  $F = 2833.000, P < 0.05$ ) 。抑制剂对照组中上述蛋白表达相比低糖组无明显差别,PCI-32765抑制了高糖诱导的p-Btk、p-ERK、NF-κB

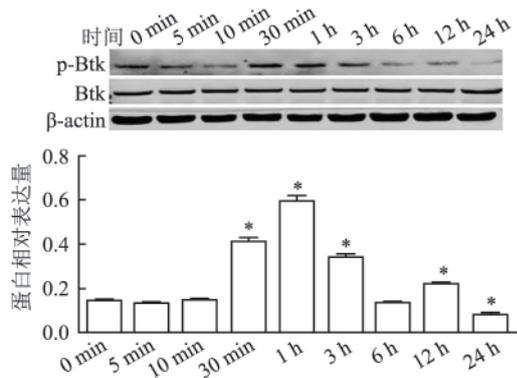


图5 高糖在不同时间点对BMMs p-Btk表达的影响  
与0 min比较: \*  $P < 0.05$

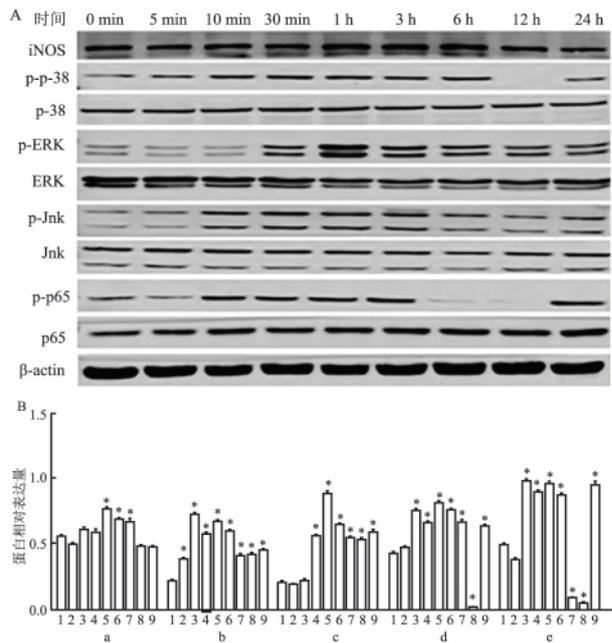


图6 高糖刺激在不同时间点对BMMs各蛋白表达的影响

A: 各蛋白在不同时间的蛋白印记; B: 不同时间点BMMs各蛋白的相对表达量,1~9组分别对应0.5、10、30 min,1、3、6、12和24 h,柱状图a~e分别代表iNOS、p-JNK、p-ERK、p-p38和p-p65表达情况;与0 min组比较: \*  $P < 0.05$

p-p65和p-IκB表达( $F = 154.631, P < 0.05$ ;  $F = 8.654, P < 0.05$ ;  $F = 6546, P < 0.05$ ;  $F = 12.91, P < 0.05$ ) (图7~9) 。

**2.8 PCI-32765对p65核转移的影响** 为了研究PCI-32765在NF-κB信号路径中的作用,使用激光共聚焦检测p65核转移。研究结果表明,在低糖组

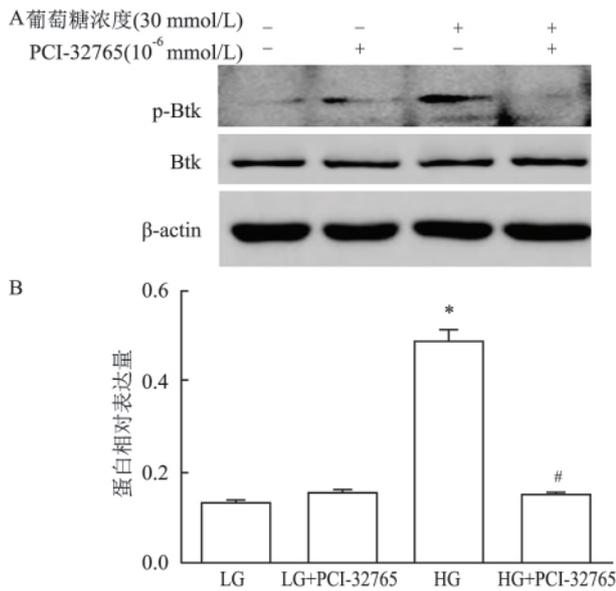


图7 PCI-32765对p-Btk表达的影响

A: 各蛋白在不同组别的蛋白印记; B: 不同组别中 p-Btk 的相对表达量; 与 LG 组比较: \*  $P < 0.01$  与 HG 组比较: #  $P < 0.05$

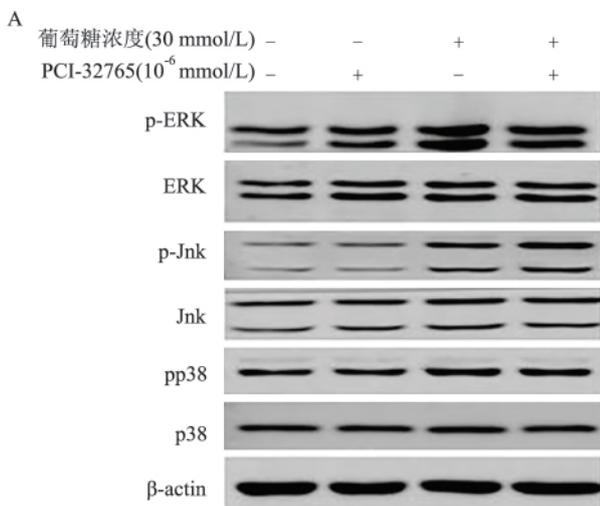


图8 PCI-32765对MAPK信号通路各蛋白表达的影响

A: 各蛋白在不同组别的蛋白印记; B: 不同组别中 MAPK 信号通路蛋白的相对表达量, 1~4 组分别对应 LG、LG + PCI-32765、HG 和 HG + PCI-32765 四组, 柱状图 a~c 分别对应 p-ERK、p-JNK 和 p-p38 表达情况; 与 LG 组比较: \*  $P < 0.05$  与 HG 组比较: #  $P < 0.05$

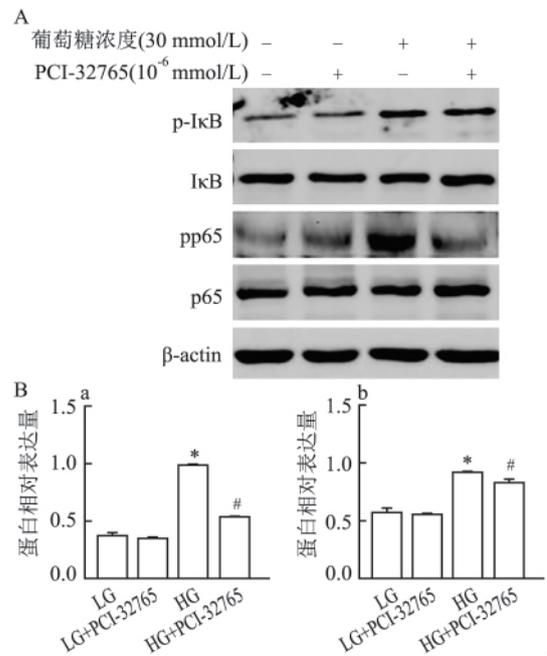


图9 PCI-32765对NF-κB信号通路蛋白表达的影响

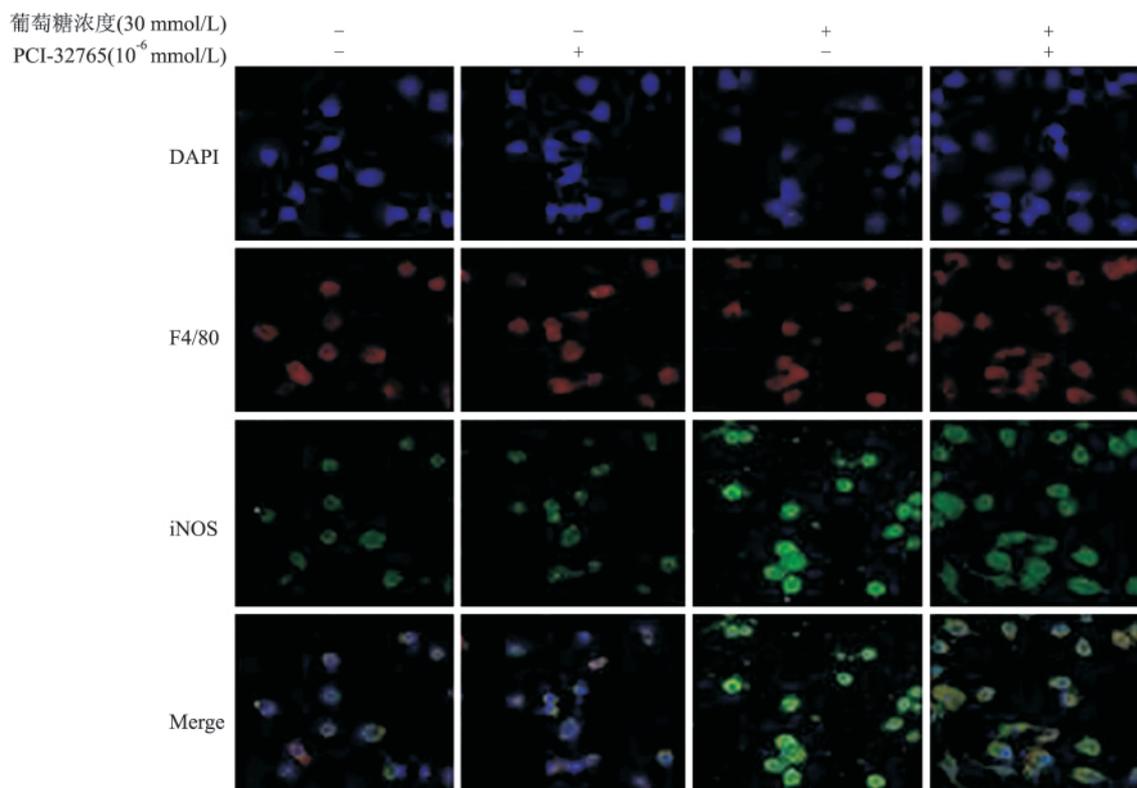
A: 各蛋白在不同组别的蛋白印记; B: 不同组别 NF-κB 信号通路蛋白的相对表达量, 柱状图 a 和 b 分别代表 p-IκB 和 p-p65 表达情况; 与 LG 组比较: \*  $P < 0.05$  与 HG 组比较: #  $P < 0.05$

中绿色荧光标记的 NF-κB p65 几乎全部分布于细胞质; 在高糖组中, 绿色荧光主要分布在细胞核中。而 PCI-32765 抑制了高糖诱导的 BMMs p65 核转移。见图 10。

### 3 讨论

在中国慢性肾脏病透析前人群中, DN 已经超过肾小球肾炎成为慢性肾脏病的主要病因, 在不久的将来, DN 将不可避免地成为导致透析的主要原因<sup>[9]</sup>, 研究其致病机制有助于减少透析人群, 减轻社会经济负担。DN 主要病理改变为巨噬细胞聚集、肾小球肥大、基底膜增厚、细胞外基质增加以及肾脏纤维化, 最终引起肾功能损害。目前对于 DN 的研究<sup>[10]</sup> 提示巨噬细胞浸润程度与糖尿病的肾脏损害之间存在相关性。高糖导致巨噬细胞活化、增殖、分化为促炎性巨噬细胞, 表达较高的 iNOS, 引起炎症反应和组织改变。

越来越多的学者研究 DN 与慢性微炎症的关系。本团队曾经报道<sup>[11]</sup> 过, 炎症介质如 MCP-1 和 TNF-α, 在糖尿病 db/db 小鼠的肾脏中表达增加。抑制炎症细胞因子的分泌可能延缓 DN 的进展。本研究结果表明, TNF-α、IL-1β 和 MCP-1 的水平在高糖诱导的 BMMs 中增加, 而高糖诱导的 BMMs 趋化

图 10 PCI-32765 对高糖刺激 BMMs NF- $\kappa$ B p65 核转移的影响

较正常组织增加,提示高糖诱导巨噬细胞迁移的原因是上清中炎症介质浓度增加,而 Btk 抑制剂 PCI-32765 可以抑制 MCP-1、TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  这些细胞炎症因子的表达。这与高糖环境下 iNOS 表达激活巨噬细胞<sup>[12]</sup>、PCI-32765 抑制巨噬细胞激活和炎症反应结果一致。

高糖引起 ERK 信号通路在系膜细胞和足细胞中激活<sup>[13-14]</sup>。本研究表明,高糖可以激活巨噬细胞中 ERK、JNK、p38MAPK 以及 NF- $\kappa$ B 信号通路,PCI-32765 抑制了高糖诱导的 ERK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路激活,而 p-JNK 和 p-p38 的减少并不明显,这进一步证实了 Btk 在 ERK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路起到关键作用,同时在高糖诱导肾脏炎症中发挥了重要作用。其中,NF- $\kappa$ B 通过调节细胞炎症因子的基因表达,参与肾脏炎症反应。Yang et al<sup>[15]</sup> 报道,抑制 NF- $\kappa$ B 通路可以抑制高糖刺激足细胞产生的炎症细胞因子。本研究结果提示,抑制 Btk 可以降低高糖诱导 BMMs 中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MCP-1 水平。因此,PCI-32765 可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路,从而在抗炎中发挥作用;这与研究<sup>[4]</sup>提示的 Btk 调节巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 磷酸化的结论相一致。

本研究结果表明,高糖通过调节 ERK、JNK、

p38MAPK 以及 NF- $\kappa$ B 信号通路,诱导巨噬细胞的炎症参与 DN 发生。而 Bruton 酪氨酸激酶抑制剂 PCI-32765 通过 ERK 及 NF- $\kappa$ B 信号通路降低了炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  以及 MCP-1 水平,提示 Btk 可能参与高糖环境下巨噬细胞通过 ERK 及 NF- $\kappa$ B 信号通路激活,参与调节高糖诱导巨噬细胞炎症的发生,这为抑制 DN 炎症反应提供了新的研究方向。

#### 参考文献

- [1] Hickey F B, Martin F. Role of the immune system in diabetic kidney disease [J]. *Curr Diab Rep* 2018, 18(4): 20.
- [2] Weber A N R, Bittner Z, Liu X, et al. Bruton's tyrosine kinase: an emerging key player in innate immunity [J]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1454.
- [3] Florence J M, Krupa A, Booshehri L M, et al. Inhibiting Bruton's tyrosine kinase rescues mice from lethal influenza-induced acute lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 315(1): L52-8.
- [4] Sakuma C, Sato M, Takenouchi T, et al. Specific binding of the WASP N-terminal domain to Btk is critical for TLR2 signaling in macrophages [J]. *Mol Immunol*, 2015, 63(2): 328-36.
- [5] Herman S E, Mustafa R Z, Gyamfi J A, et al. Ibrutinib inhibits BCR and NF- $\kappa$ B signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL [J]. *Blood*, 2014, 123

- ( 21 ) : 3286 – 95.
- [6] Burger J A , Wiestner A. Targeting B cell receptor signalling in cancer: preclinical and clinical advances [J]. *Nat Rev Cancer* , 2018 ,18( 3 ) : 148 – 67.
- [7] Lv J , Wu J , He F , et al. Development of Bruton's tyrosine kinase inhibitors for rheumatoid arthritis [J]. *Curr Med Chem* ,2018 ,25 ( 42 ) : 5847 – 59.
- [8] Xu X X , Zhang W , Zhang P , et al. Superior renoprotective effects of the combination of breviscapine with enalapril and its mechanism in diabetic rats [J]. *Phytomedicine* 2013 ,20( 10 ) : 820 – 7.
- [9] Zhang L , Long J , Jiang W , et al. Trends in chronic kidney disease in China [J]. *N Engl J Med* 2016 ,375( 9 ) : 905 – 6.
- [10] Zhang X , Yang Y , Zhao Y. Macrophage phenotype and its relationship with renal function in human diabetic nephropathy [J]. *PLoS One* 2019 ,14( 9 ) : e0221991.
- [11] Xu X X , Fan Z , Qi X M , et al. The role of TGF- $\beta$ -activated kinase 1 in db/db mice and high glucose-induced macrophage [J]. *Int Immunopharmacol* 2016 ,38: 120 – 31.
- [12] Zhang X L , Guo Y F , Song Z X , et al. Vitamin D prevents podocyte injury via regulation of macrophage M1/M2 phenotype in diabetic nephropathy rats [J]. *Endocrinology* ,2014 ,155( 12 ) : 4939 – 50.
- [13] Li M , Xu L , Feng G , et al. High glucose downregulates myocardin expression in rat glomerular mesangial cells via the ERK signaling pathway [J]. *Oncotarget* 2017 ,8( 50 ) : 87390 – 400.
- [14] Zhu Y. PRMT1 mediates podocyte injury and glomerular fibrosis through phosphorylation of ERK pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2018 ,495( 1 ) : 828 – 38.
- [15] Yang S , Zhang J , Wang S , et al. SOCS2 overexpression alleviates diabetic nephropathy in rats by inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Oncotarget* 2017 ,8( 53 ) : 91185 – 98.

## Effect of Bruton's tyrosine kinase inhibitor , ibrutinib , on inflammatory response in high glucose – induced macrophages

Xu Simin , Fan Zhe , Wu Yonggui

( Dept of Nephrology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the effects of Bruton's tyrosine kinases ( Btk) inhibitor , ibrutinib , on inflammatory response in high glucose-induced macrophages and to discover the underlying mechanisms. **Methods** In this study , bone marrow-derived macrophages ( BMMs) were used. After the optimization of the experimental conditions , the BMMs were divided into four groups: low-glucose group ( LG) , low-glucose + ibrutinib control group ( LG + PCI-32765) , high-glucose group ( HG) , and high-glucose + ibrutinib group ( HG + PCI-32765) . The macrophages were detected by flow cytometry. The expression of inflammatory cytokines in cell and in cell supernatant , including the monocyte chemo-attractant protein-1 ( MCP-1) , the tumor necrosis factor-alpha ( TNF- $\alpha$ ) and the interleukin-1beta ( IL-1 $\beta$ ) and the mRNA , were detected by enzyme-linked immuno sorbent assay and quantitative real-time PCR. The iNOS , Btk , ERK , JNK , p38MAPK , NF- $\kappa$ B p65 , I $\kappa$ B and the corresponding phosphorylated proteins were detected by Western blot. The activation of macrophages and nuclear transfer of p65 were detected by laser confocal microscopy. **Results** Compared with the LG group , the expression of inflammatory cytokines in the HG group increased (  $P < 0.05$  ) , while that decreased in the HG + PCI-32765 group compared with the HG group (  $P < 0.05$  ) . The expression of p-Btk was higher in the HG group (  $P < 0.01$  ) , and the p-ERK , p-JNK , p-p38MAPK , NF- $\kappa$ B p-p65 and p-I $\kappa$ B in the HG group were also higher (  $P < 0.05$  ) compared with the LG group , and the Btk inhibitor , PCI-32765 , could reduce the expression of p-Btk , p-ERK , NF- $\kappa$ B p-p65 and p-I $\kappa$ B (  $P < 0.05$  ) . The macrophages were activated by high-glucose , and the expression of iNOS increased (  $P < 0.01$  ) , while PCI-32765 could reduce its expression (  $P < 0.05$  ) . By using laser confocal microscopy , it was found that under high-glucose stimulation , p65 had nuclear-transfer , and PCI-32765 could reduced it. **Conclusion** Ibrutinib is able to inhibit the high glucose-induced activation of macrophages and suppress the release of inflammatory cytokines by down-regulating the ERK and the NF- $\kappa$ B signaling pathways.

**Key words** Bruton's tyrosine kinase; PCI-32765; high glucose; NF-kappa B; inflammation