

网络出版时间: 2018-6-8 10:04 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180607.1131.010.html>

# 芍药苷对高糖刺激的小鼠骨髓来源的巨噬细胞 TLR4 信号通路的影响

杨雯雯 段分分 邵云侠 王 坤, 吴永贵

**摘要** 目的 探讨芍药苷(PF)对高糖刺激的小鼠骨髓来源的巨噬细胞(BMDMs) Toll 样受体 4(TLR4) 信号通路的影响。方法 分离骨髓来源的巨噬细胞作为研究对象,高糖作为刺激因素,芍药苷作为干预因素分组。将 BMDMs 分为 7 组:正常糖对照组(LG 组)、正常糖对照 + PF 组(LG + PF 组)、高糖刺激组(HG 组)、高糖刺激 + PF 组(HG + PF 组)、TLR4<sup>-/-</sup> 对照组(TLR4<sup>-/-</sup> 组)、TLR4<sup>-/-</sup> 对照 + 高糖刺激组(TLR4<sup>-/-</sup> + HG 组)、TLR4<sup>-/-</sup> 对照 + 高糖刺激 + PF 组(TLR4<sup>-/-</sup> + HG + PF 组)。流式细胞术鉴定巨噬细胞的纯度及成熟度;CCK-8 检测 PF 对 BMDMs 活力的影响;Transwell 检测各组 BMDMs 的趋化功能;激光共聚焦法检测各组的 TLR4 和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的协同表达;qRT-PCR 测定各组细胞中的肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、单核细胞趋化因子-1(MCP-1)及 iNOS mRNA 的转录表达;Western blot 法检测各组总蛋白中 iNOS、TLR4、髓样分化因子 88(MyD88)、TIR 结构域衔接蛋白(Trif)、磷酸化白介素-1 受体相关激酶(p-IRAK1)、磷酸化干扰素调节因子 3(p-IRF3)、核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) p65 和 NF- $\kappa$ Bp-p65 蛋白的表达;ELISA 法检测各组细胞培养上清液中促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MCP-1 的分泌情况。结果 与 LG 组比较,高糖刺激可以增加巨噬细胞的趋化功能;明显上调细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP-1 及 iNOS mRNA 的转录表达( $P < 0.01$ );同时 HG 组的 iNOS 及 TLR4、MyD88、Trif、p-IRF3、NF- $\kappa$ Bp65 和 NF- $\kappa$ Bp-p65 等信号通路蛋白表达水平明显增强( $P < 0.01$ );细胞培养上清液中分泌的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 MCP-1 水平增高( $P < 0.01$ )。PF 和敲除 TLR4 基因均可以抑制高糖刺激导致的巨噬细胞的激活效应。结论 高糖可以诱导 BMDMs 细胞内的 TLR4 及下游信号传导通路表达上调,同时使巨噬细胞激活导致促炎因子表达上调;PF 和敲除 TLR4 基因均可抑制 TLR4 信号通路的激活,并且使巨噬细胞促炎因子的表达下调。

**关键词** 芍药苷;巨噬细胞;Toll 样受体 4;炎症;糖尿病肾病中图分类号 R 364.5; R 329.24; R 587.24

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)07-1037-08  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.010

2018-03-28 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81374034)

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:杨雯雯,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

随着糖尿病发病率的上升,糖尿病肾病已成为全球终末期肾病的主要原因之一。从实验和临床研究中获得的证据表明,肾脏炎症在糖尿病期间肾脏损伤的进展中起关键作用<sup>[1]</sup>。Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4) 在糖尿病肾病中的作用机制已相当明确, Lin et al<sup>[2]</sup> 发现在糖尿病肾病患者的肾活检中 TLR4 表达升高,与之相关的肾组织中巨噬细胞的浸润程度也随之增加。白芍总苷(total glucosides of paeony, TGP) 是我国重要传统中药白芍根的主要成分。前期研究<sup>[3-4]</sup> 表明 TGP 可以抑制 STZ 诱导的糖尿病肾组织巨噬细胞激活,其机制部分与抑制肾组织中巨噬细胞的 TLR4 及 STAT3 信号通路有关。TLR4 可以通过髓样分化因子 88(myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88) 依赖途径和 MyD88 非依赖途径激活下游信号通路,参与核因子- $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 的活化<sup>[5]</sup>。而芍药苷(paeoniflorin, PF) 作为 TGP 的主要有效成分,一直深受广泛关注。该研究旨在探讨 PF 是否通过 TLR4 信号通路抑制巨噬细胞的激活,为糖尿病肾病提供新的防治思路。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 6~8 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠和 TLR4<sup>-/-</sup> 小鼠(南京大学模式动物研究所); PF(南京广润公司); CCK-8 检测试剂盒(南京诺唯赞公司); 兔抗 TLR4、TIR 结构域衔接蛋白(TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ , Trif)、MyD88、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、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 $\beta$ )、单核细胞趋化因子-1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 抗体(美国 Abcam 公司); 兔抗磷酸化白介素-1 受体相关激酶(phospho-IL-1 receptor-associated kinase-1, p-IRAK1)、磷酸化干扰素调节因子 3(phospho-interferon regulatory factor 3, p-IRF3)、NF- $\kappa$ Bp65、NF- $\kappa$ Bp-p65 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司); 小鼠抗  $\beta$ -actin 抗体、山羊抗兔

IgG 抗体、山羊抗小鼠 IgG 抗体(武汉三鹰公司); TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MCP-1 ELISA 检测试剂盒(美国 R&D Systems 公司); LeicaTCS SP5 共聚焦扫描显微镜(德国 Leica 公司)。

## 1.2 研究方法

**1.2.1 提取骨髓来源的巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMDMs)及鉴定** 处死小鼠后,分离股骨和胫骨,在超净工作台中剪断骨的两端,用含有 2% 胎牛血清的无菌 PBS 溶液冲洗骨髓腔细胞,离心后弃去上清液,用配制好的 DMEM 培养基轻轻吹打重悬细胞,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养;7 d 后收集细胞,用巨噬细胞表面抗原 F4/80 和 CD11b 抗体标记细胞,鉴定巨噬细胞的纯度和成熟度。

**1.2.2 优化实验条件** 使用不同浓度的葡萄糖刺激 BMDMs,同时不同浓度的甘露醇补充入各刺激组,以排除高糖产生的渗透压对实验的影响<sup>[5]</sup>。然后收集细胞,提取总蛋白,选取 TLR4 和 iNOS 蛋白表达最高时的糖浓度,作为实验的刺激浓度;在确定刺激浓度后,选取不同刺激时间收集 BMDMs,以确定高糖刺激的最佳时间。最后采用不同浓度的 PF 干预高糖刺激的 BMDMs,选择抑制蛋白表达上调的最适 PF 浓度。将 BMDMs 分为 7 组:正常糖对照组(LG 组)、正常糖对照 + PF 组(LG + PF 组)、高糖刺激组(HG 组)、高糖刺激 + PF 组(HG + PF 组)、TLR4<sup>-/-</sup> 对照组(TLR4<sup>-/-</sup> 组)、TLR4<sup>-/-</sup> 对照 + 高糖刺激组(TLR4<sup>-/-</sup> + HG 组)、TLR4<sup>-/-</sup> 对照 + 高糖刺激 + PF 组(TLR4<sup>-/-</sup> + HG + PF 组)。

**1.2.3 PF 干预及高糖刺激对巨噬细胞活力的影响** 将 BMDMs 制成细胞悬液接种于 96 孔板中,设无细胞组、无药物对照组、空白对照组、不同浓度 PF 的高糖刺激组,24 h 后每孔加入 CCK-8 溶液,用酶标仪进行光密度(optical density, OD)值测定,算出细胞活力。

**1.2.4 PF 干预对高糖刺激的巨噬细胞迁徙能力的影响** 将 BMDMs 接种于 Transwell 小室中,按照实验分组,每组分别加入高糖刺激和 PF 干预,后在各组的 Transwell 下室中分别加入重组小鼠 MCP-1 培养后弃取上清液,Transwell 上室乙醇固定 20 min 后,切去底部薄膜,结晶紫染色,轻轻铺在载玻片上,显微镜下拍照后用 PBS 漂洗 2 次,薄膜置于 33% 冰醋酸中,回收结晶紫染色液,测定各组 OD 值后比较分析。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR 法测定各分组细胞中的**

TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP-1 及 iNOS 的 mRNA 的转录表达

提取每组 BMDMs 的总 RNA 后,立即检测其纯度,并反转录成 cDNA。引物序列见表 1。SYBR Green PCR 试剂盒被用来进行 PCR,基因的相对 GAPDH 表达采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析。

表 1 各引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
GAPDH	F: ACCCCAGCAAGGACACTGAGCAAG R: GGCCCTCCTCTTATTATGGGGT
iNOS	F: GCTCGCTTTGCCACGGACGA R: AAGGCAGCGGCACATGCAA
TNF- $\alpha$	F: CCCTCCTGGCCAACGGCATG R: TCGGGGACGCTTGTCCCTT
IL-1 $\beta$	F: GCCTCGTGTGTGCGACCCATAT R: TCCTTTGAGGCCCAAGGCCACA
MCP-1	F: AGGTCTCTGTACAGCTTCTG R: CTGGTGATTCTTGTAGTCTCC

**1.2.6 Western blot 法检测各组巨噬细胞的蛋白表达** 提取各组细胞的总蛋白后,测定浓度。加样后经电泳,转膜,脱脂牛奶室温封闭后, TBST 洗膜 3 次,将膜放入一抗 TLR4(1 : 500)、MyD88(1 : 100)、Trif(1 : 1 000)、p-IRAK1(1 : 200)、p-IRF3(1 : 1 000)、IRF3(1 : 1 000)、NF- $\kappa$ Bp65(1 : 1 000)、NF- $\kappa$ Bp-p65(1 : 1 000)、iNOS(1 : 1 000)、 $\beta$ -actin(1 : 35 000) 中 4 °C 过夜, TBST 洗膜 3 次,二抗室温下孵育 45 min 后,再次洗膜 3 次,最后用 ECL 发光试剂盒进行显影, Image J 软件对条带进行分析。

**1.2.7 ELISA 法检测各组巨噬细胞的培养上清液中细胞因子的分泌量** 实验结束后收集各组培养上清液,离心,用 ELISA 试剂盒检测各组 BMDMs 培养上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MCP-1 的含量。

**1.2.8 激光共聚焦显微镜分析各组巨噬细胞 TLR4 和 iNOS 的协同表达** 细胞接种于 Petri 皿中,固定 10 min 后, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min, 5% 驴血清封闭 0.5 h, PBS 再次漂洗 3 次,加入抗 TLR4 和抗 iNOS 抗体, 4 °C 条件下孵育过夜, PBS 漂洗 3 次,加入相应的荧光二抗,室温下避光孵育 2 h。再次 PBS 漂洗, DAPI 染核 10 min, PBS 漂洗后进行封片,最后用激光共聚焦显微镜拍照。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据采用  $\bar{x} \pm s$  的形式表示。Levene 法进行方差齐性检验,统计学处理应用单因素方差分析(One-Way ANOVA) 组间差异显著性检验采用 LSD 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 BMDMs 纯度及成熟度的鉴定** 流式细胞术鉴定结果显示 FITC 及 CD11b 双标的 BMDMs 达 93.5%。见图 1。

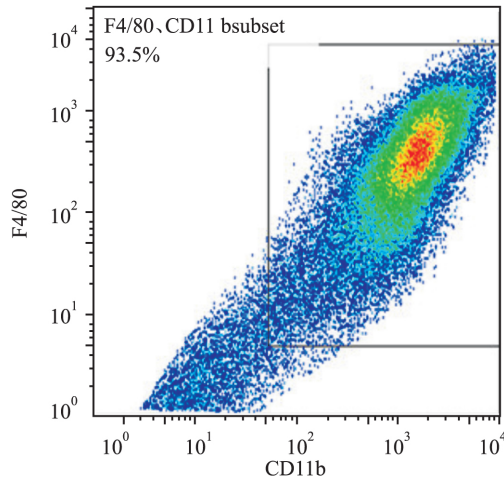


图 1 检测 BMDMs 纯度及成熟度

**2.2 实验条件的优化** Western blot 检测显示,高糖可导致 TLR4 表达上调,巨噬细胞活化;同时甘露醇作为高糖的渗透压对照,对 TLR4 的表达及巨噬细胞的活化没有影响。高糖浓度在 30 mmol/L 时,TLR4 表达增加最明显 ( $0.55 \pm 0.01$ ,  $F = 379.480$ ,  $P < 0.01$ ), iNOS 表达也增加最明显 ( $0.37 \pm 0.01$ ,  $F = 283.612$ ,  $P < 0.01$ );高糖刺激的 BMDMs 在 1 h TLR4 开始过量表达,6 h 开始巨噬细胞活化,产生 iNOS,与初始 0 h 比较:TLR4 ( $1.1 \pm 0.002$ ) 和 iNOS ( $0.82 \pm 0.02$ ) 均在 24 h 达到峰值 ( $F_{TLR4} = 420.112$ ,  $F_{iNOS} = 126.858$ ,  $P < 0.01$ );PF 可以抑制 TLR4 表达及 BMDMs 的激活,并且抑制的程度与其剂量有关,在 PF 浓度为  $10^{-5}$  mol/L 时,TLR4 ( $0.50 \pm 0.03$ ) 和 iNOS ( $0.27 \pm 0.01$ ) 的表达抑制最为明显 ( $F_{TLR4} = 291.643$ ,  $F_{iNOS} = 1818$ ,  $P < 0.01$ )。见图 2~4。

**2.3 PF 干预及高糖刺激对巨噬细胞活力的影响** 高糖刺激对 BMDMs 活性无影响,PF 浓度为  $10^{-3}$  mol/L 时对高糖刺激的 BMDMs 活性有影响 ( $95.30 \pm 1.56$ ,  $F = 1.083$ ,  $P < 0.01$ )。见图 5。

**2.4 PF 干预对高糖刺激巨噬细胞迁徙能力的影响** 高糖刺激可以增加 MCP-1 对巨噬细胞的趋化,导致巨噬细胞迁徙,而 PF 干预和 TLR4 基因敲除均可抑制高糖的刺激作用,各组间差异有统计学意义 ( $F = 49.39$ ,  $P < 0.01$ )。见图 6。

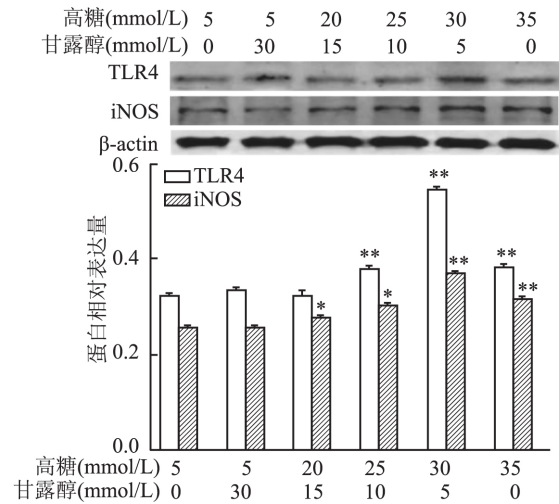


图 2 Western blot 检测高糖刺激 BMDMs 的 TLR4 及 iNOS 蛋白表达变化

与正常糖浓度组(高糖 5 mmol/L)比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

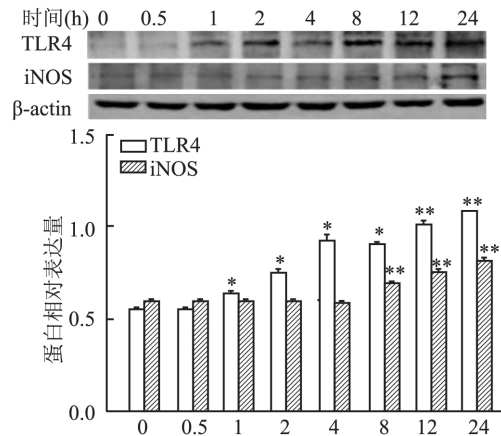


图 3 Western blot 检测高糖刺激 BMDMs

不同时间点 TLR4 及 iNOS 的蛋白表达变化

与 0 h 比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

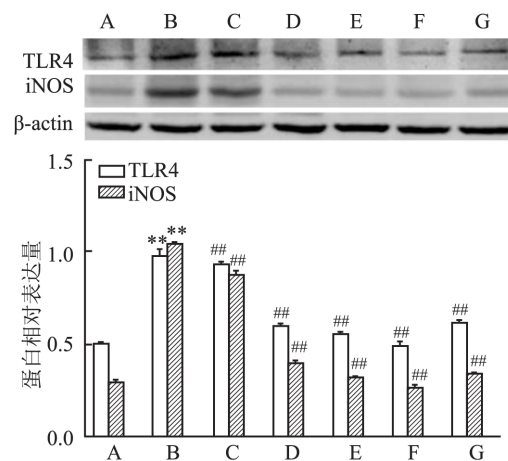


图 4 Western blot 检测不同浓度 PF 干预

高糖刺激 BMDMs 对 TLR4 及 iNOS 的蛋白表达变化

A: LG 组; B: HG 组; C: HG +  $10^{-8}$  mol/L 组; D: HG +  $10^{-7}$  mol/L 组; E: HG +  $10^{-6}$  mol/L 组; F: HG +  $10^{-5}$  mol/L 组; G: HG +  $10^{-4}$  mol/L 组; 与 LG 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 HG 组比较: ##  $P < 0.01$

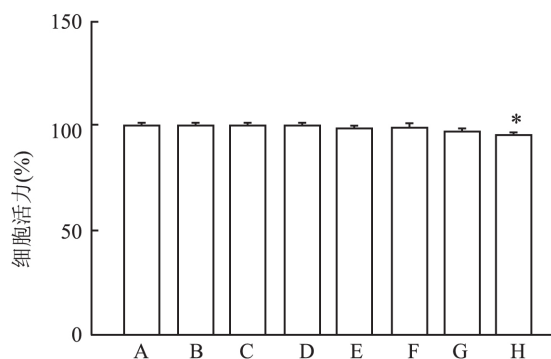


图5 PF对高糖刺激的BMDMs活性的影响

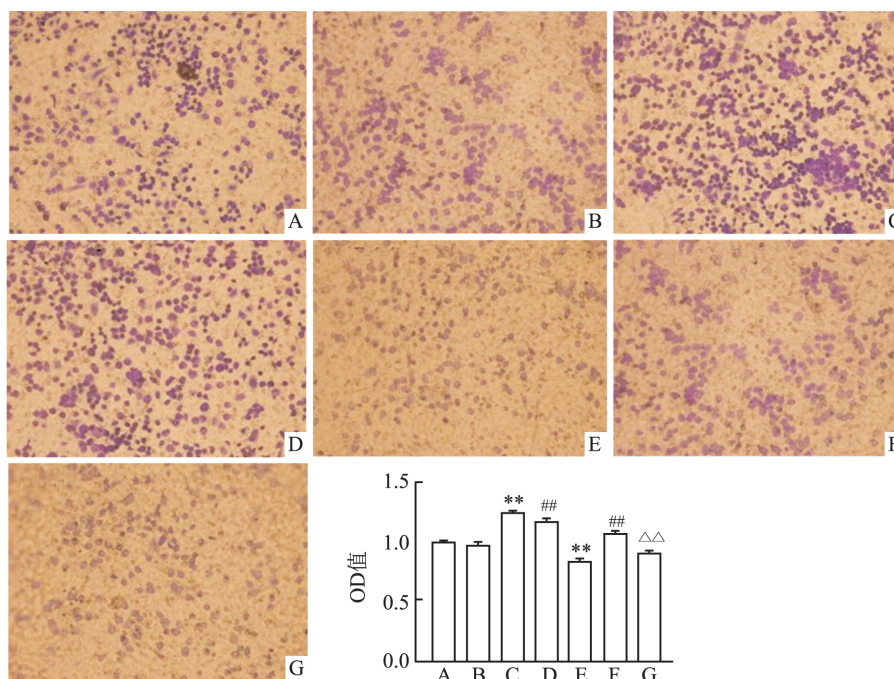
A: LG 组; B: HG 组; C: HG +  $10^{-8}$  mol/L 组; D: HG +  $10^{-7}$  mol/L 组; E: HG +  $10^{-6}$  mol/L 组; F: HG +  $10^{-5}$  mol/L 组; G: HG +  $10^{-4}$  mol/L 组; H: HG +  $10^{-3}$  mol/L 组; 与 HG 组比较: \*  $P < 0.05$

**2.5 实时荧光定量 PCR 检测各组巨噬细胞的 iNOS、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MCP-1 mRNA 的表达** 与 LG 组比较, LG + PF 组 iNOS、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MCP-1 的 mRNA 的表达差异无统计学意义, HG 组的 mRNA 转录表达明显增加 ( $P < 0.01$ ), 正常糖浓度下敲除 TLR4 组的 mRNA 表达明显减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与 HG 组比较, PF 组和 TLR4 $^{-/-}$  + HG 组 mRNA 表达明显下降 ( $P < 0.01$ ); 与 TLR4 $^{-/-}$  + HG 组比较, 敲除 TLR4 之后, PF 仍然可以进一步抑制高糖导致的 mRNA 转录表达的增加 ( $P < 0.01$ ), 各指标组间差异有统计学意义 ( $F_{\text{iNOS}} = 297.8$ ,  $F_{\text{TNF-}\alpha} =$

162.8,  $F_{\text{IL-1}\beta} = 170.9$ ,  $F_{\text{MCP-1}} = 102.2$ ,  $P < 0.01$ )。见图 7。

**2.6 Western blot 检测各组巨噬细胞的 iNOS、TLR4、MyD88、p-IRAK-1、Trif、p-IRF3、NF- $\kappa$ Bp65 和 NF- $\kappa$ Bp-p65 蛋白表达** 与 LG 组比较, LG + PF 组 iNOS、TLR4、MyD88、p-IRAK-1、Trif、p-IRF3、NF- $\kappa$ Bp65 和 NF- $\kappa$ Bp-p65 的蛋白表达差异无统计学意义, HG 组各蛋白表达明显上调 ( $P < 0.01$ ), 在正常糖浓度下, TLR4 $^{-/-}$  组各蛋白的表达明显减少; 与 HG 组比较, PF 干预组和 TLR4 $^{-/-}$  + HG 组的蛋白相对表达量受到抑制 ( $P < 0.01$ ); 与 TLR4 $^{-/-}$  + HG 组比较, TLR4 $^{-/-}$  + HG + PF 组在敲除 TLR4 基础上, PF 仍可以进一步抑制高糖导致的各蛋白表达增加 ( $P < 0.01$ )。各指标每组间差异有统计学意义 ( $F_{\text{TLR4}} = 227.3$ ,  $F_{\text{iNOS}} = 112.99$ ,  $F_{\text{MyD88}} = 55.89$ ,  $F_{\text{p-IRAK-1}} = 16.75$ ,  $F_{\text{Trif}} = 32.75$ ,  $F_{\text{p-IRF3}} = 42.11$ ,  $F_{\text{NF-}\kappa\text{Bp65}} = 37.92$ ,  $F_{\text{NF-}\kappa\text{Bp-p65}} = 343.9$ ,  $P < 0.01$ )。见图 8。

**2.7 ELISA 检测各组巨噬细胞分泌的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MCP-1 水平** 与 LG 组比较, LG + PF 组细胞培养基上清中所含 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 MCP-1 水平差异无统计学意义, HG 组明显增高 ( $P < 0.01$ ), TLR4 $^{-/-}$  明显减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与 HG 组比较, HG + PF 组和 HG + TLR4 $^{-/-}$  组明显减少 ( $P < 0.01$ ); 与 HG + TLR4 $^{-/-}$  组比较, 敲除 TLR4 基因

图6 PF干预对高糖刺激巨噬细胞迁徙能力的影响  $\times 400$ 

A: LG 组; B: LG + PF 组; C: HG 组; D: HG + PF 组; E: TLR4 $^{-/-}$  组; F: TLR4 $^{-/-}$  + HG 组; G: TLR4 $^{-/-}$  + HG + PF 组; 与 LG 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 HG 组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与 TLR4 $^{-/-}$  + HG 组比较:  $\Delta\Delta P < 0.01$



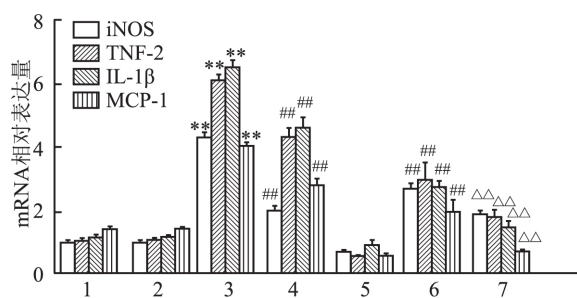


图7 实时定量PCR检测高糖刺激对

各组巨噬细胞iNOS、TNF-α、IL-1β和MCP-1的mRNA表达

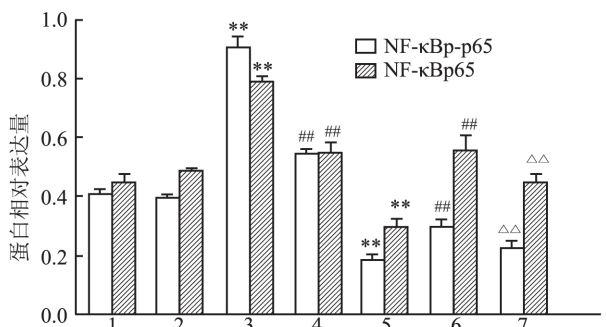
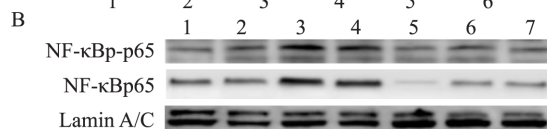
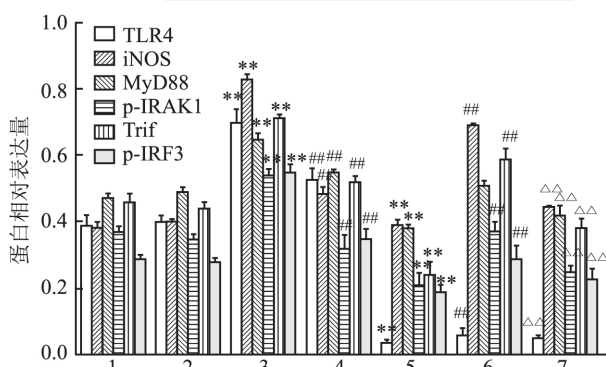
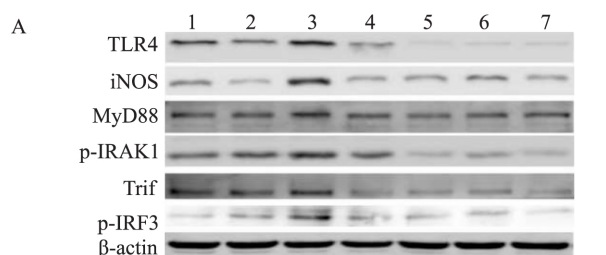
1: LG组; 2: LG + PF组; 3: HG组; 4: HG + PF组; 5: TLR4<sup>-/-</sup>组; 6: TLR4<sup>-/-</sup> + HG组; 7: TLR4<sup>-/-</sup> + HG + PF组; 与LG组比较:\*\**P* < 0.01; 与HG组比较: ##*P* < 0.01; 与TLR4<sup>-/-</sup> + HG组比较:ΔΔ*P* < 0.01

图8 Western blot检测各组巨噬细胞的蛋白表达

A: TLR4、iNOS、MyD88、p-IRAK1、Trif、p-IRF3蛋白相对表达量,

B: NF-κBp65和NF-κBp-p65的蛋白相对表达; 1: LG组; 2: LG + PF

组; 3: HG组; 4: HG + PF组; 5: TLR4<sup>-/-</sup>组; 6: TLR4<sup>-/-</sup> + HG组;7: TLR4<sup>-/-</sup> + HG + PF组; 与LG组比较: \*\**P* < 0.01; 与HG组比较: ##*P* < 0.01; 与TLR4<sup>-/-</sup> + HG组比较: ΔΔ*P* < 0.01

后, PF仍可进一步抑制高糖刺激导致的培养基中TNF-α、IL-1β及MCP-1分泌增加(*P* < 0.01)。每种指标各组间差异具有统计学意义( $F_{\text{TNF-}\alpha} = 29.76$ 、 $F_{\text{IL-1}\beta} = 60.96$ 、 $F_{\text{MCP-1}} = 41.65$ , *P* < 0.01)。见图9。

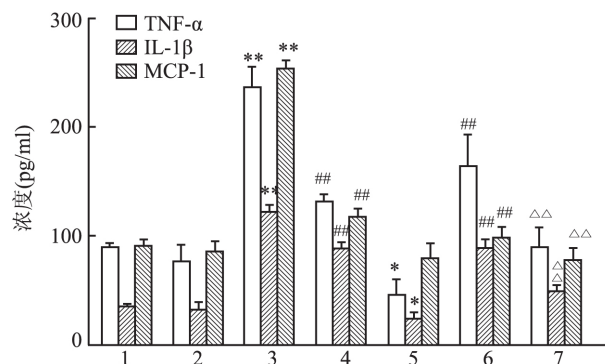


图9 ELISA法检测各组巨噬细胞培养基中分泌的TNF-α、IL-1β和MCP-1表达

1: LG组; 2: LG + PF组; 3: HG组; 4: HG + PF组; 5: TLR4<sup>-/-</sup>组;6: TLR4<sup>-/-</sup> + HG组; 7: TLR4<sup>-/-</sup> + HG + PF组; 与LG组比较: \**P* < 0.05,\*\**P* < 0.01; 与HG组比较: ##*P* < 0.01; 与TLR4<sup>-/-</sup> + HG组比较: ΔΔ*P* < 0.01

**2.8 共聚焦显微镜分析各组巨噬细胞TLR4和iNOS的荧光表达** 与LG组细胞比较, LG + PF组绿色及红色荧光表达无差别, TLR4<sup>-/-</sup>组红、绿荧光基本无表达, HG组荧光表达增强; 与HG组比较, HG + PF组、HG + TLR4<sup>-/-</sup>组、HG + TLR4<sup>-/-</sup> + PF组荧光表达降低, 提示高糖可同时激活TLR4和iNOS在巨噬细胞胞质内表达, PF干预及TLR4基因敲除可抑制高糖的诱导作用。见图10。

### 3 讨论

糖尿病肾病与全身炎症和局部的肾脏炎症都有关, 在糖尿病肾病的早期阶段血清或外周血细胞中可检测到炎症细胞因子(如TNF-α、IL-1及MCP-1)和免疫介质水平的升高, 其中一些因子随疾病进展而增加<sup>[6]</sup>。本实验的刺激因素是高血糖, 同时高血糖也是糖尿病肾病发生的先决条件, 巨噬细胞是糖尿病肾脏中发现的最普遍的浸润性白细胞, 有研究<sup>[7-9]</sup>表明, 高糖可以刺激巨噬细胞迁移, 本实验使用MCP-1作为初始趋化因子, 在高糖的刺激下, 各组实验细胞均发生了趋化迁移, 但与正常糖浓度对照组比较, 高糖刺激组巨噬细胞迁移明显增加, 其增加的程度可被PF干预及TLR4信号通路敲除抑制。

Toll样受体能识别危险相关分子模式的受体并促进先天性免疫反应, 可通过两种途径激活下游信

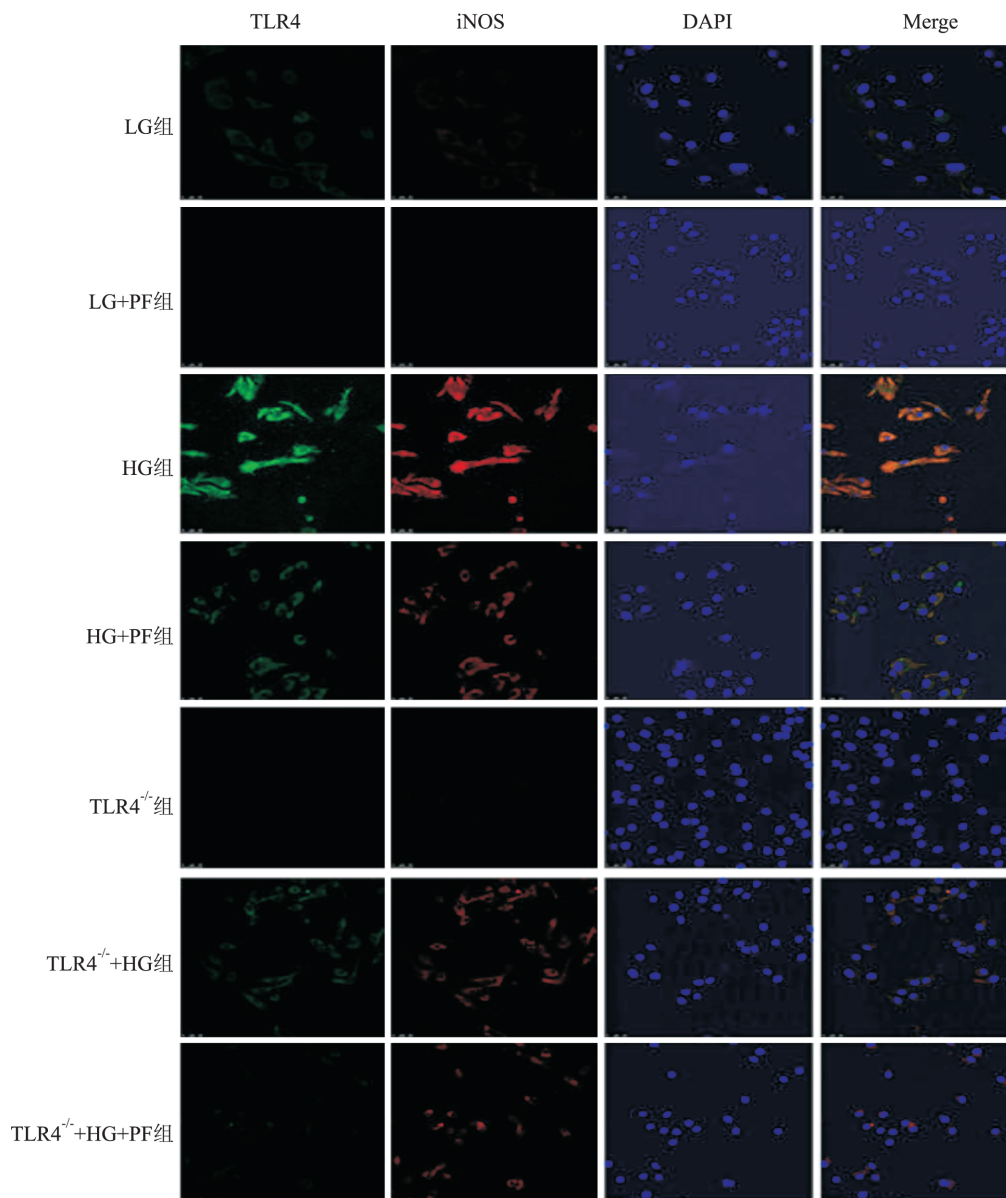


图 10 共聚焦显微镜下各组巨噬细胞 TLR4 和 iNOS 的协同表达  $\times 400$

号分子: MyD88 依赖途径和 MyD88 非依赖途径。这两种途径均可参与由 TLR4 激活的通路从而产生炎症因子<sup>[10-11]</sup>。在未刺激的细胞中, NF- $\kappa$ B 游离存在于胞质中; 一旦受到刺激, NF- $\kappa$ B 便移位于细胞核中并促进多种炎症因子, 如 TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 MCP-1 的释放<sup>[12]</sup>。在本实验中, 高糖作为刺激因素, 模拟了糖尿病的微环境, 结果提示, 在高糖刺激下, TLR4 与高糖结合, 作为内源性配体, 激活下游的依赖 MyD88 信号途径和非依赖 MyD88 信号途径, 使 TLR4、MyD88、p-IRAK-1、Trif、p-IRF3、NF- $\kappa$ Bp65 及 NF- $\kappa$ Bp-p65 表达均上调, 与此同时启动巨噬细胞的活化; 表现为巨噬细胞活化产物 iNOS、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 MCP-1 的 mRNA 表达明显上升, 同时细胞的培养

上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 MCP-1 水平也显著升高。通过激光共聚焦显微镜中也可以看出高糖可以增加 TLR4 及 iNOS 的荧光强度, 敲除 TLR4 基因后可以同时使 iNOS 荧光强度减弱, 这提示 TLR4 及其下游的两种信号通路可调节巨噬细胞激活。

PF 作为 TGP 的主要生物活性成分, 近几年在临床越来越多地被用来治疗类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮和系膜增生性肾炎等疾病<sup>[13-15]</sup>, PF 的药理作用可能与抗炎、抗氧化和免疫调节有关, 但是 PF 对肾脏保护作用的具体信号通路机制仍然是不明确的。本实验室前期的研究<sup>[4]</sup>证实了 TGP 可抑制肾小球和肾小管-间质巨噬细胞 TLR4 的表达, 在本实验中, 可以观察到 PF 对体外高糖刺激的 BM-

DMs 激活起到抑制作用,可减少炎症因子  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、MCP-1 及巨噬细胞表面活化标志物 iNOS 的产生;这些证实了 PF 具有抗炎作用;同时观察到 PF 对正常糖浓度下的 BMDMs 及 TLR4 信号通路无影响,但是对高糖刺激下的 BMDMs 的 TLR4 及其下游信号通路有抑制作用,由此可以推测,PF 是通过抑制高糖刺激下 TLR4 信号通路的上调而调节巨噬细胞活化的。另外,还可以观察到,在敲除 TLR4 基因后,继续给予 PF 干预,仍然可以进一步抑制 BMDMs 的激活, $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、MCP-1 及 iNOS 的产生也进一步减少,MyD88、p-IRAK-1、Trif、p-IRF3、NF- $\kappa$ Bp65 和 NF- $\kappa$ Bp65 表达减弱,由此可以推测 PF 对巨噬细胞激活的抑制作用可能还与其他信号通路有关,其具体的机制有待进一步研究。

综上所述,高糖刺激可以导致巨噬细胞的 TLR4 信号通路激活,同时启动巨噬细胞活化,PF 可以通过抑制巨噬细胞 TLR4 信号通路的上调从而调节巨噬细胞的活化,但是 PF 的抑制作用是否同时与其他信号通路有关还需深入研究。

### 参考文献

- [1] Tesch G H. Diabetic nephropathy is this an immune disorder? [J]. *Clin Sci (Lond)* 2017, 131(16): 2183–99.
- [2] Lin M, Yiu W H, Wu H J, et al. Toll-like receptor 4 promotes tubular inflammation in diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(1): 86–102.
- [3] Wang K, Wu Y G, Su J, et al. Total glucosides of paeony regulates JAK2/STAT3 activation and macrophage proliferation in diabetic rat kidneys [J]. *Am J Chi Med*, 2012, 40(3): 521–36.
- [4] 赵莉, 苏双全, 夏林. 白芍总苷对糖尿病大鼠肾组织 TLR2、TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路调节的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2012, 47(5): 518–22.
- [5] Cheng C I, Chen P H, Lin Y C. High glucose activates Raw2647 macrophages through RhoA kinase-mediated signaling pathway [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(2): 283–92.
- [6] Perlman A S, Chevalier J M, Wilkinson P, et al. Serum inflammatory and immune mediators are elevated in early stage diabetic nephropathy [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2015, 45(3): 256–63.
- [7] Cheng C I, Chen P H, Lin Y C. High glucose activates Raw2647 macrophages through RhoA kinase-mediated signaling pathway [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(2): 283–92.
- [8] Sato W, Kosugi T, Zhang L, et al. The pivotal role of VEGF on glomerular macrophage infiltration in advanced diabetic nephropathy [J]. *Lab Invest*, 2008, 88(9): 949–61.
- [9] Xu X, Qi X, Shao Y, et al. Blockade of TGF- $\beta$ -activated kinase 1 prevents advanced glycation end products-induced inflammatory response in macrophages [J]. *Cytokine* 2016, 78: 62–8.
- [10] Akira S. Toll-like receptor signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(7): 499–511.
- [11] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2001, 1(2): 135–45.
- [12] Mendes K L, Lelis D F. Nuclear sirtuins and inflammatory signaling pathways [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2017, 38: 98–105.
- [13] Li P P, Liu D D, Liu Y J, et al. BAFF/BAFF-R involved in antibodies production of rats with collagen-induced arthritis via PI3K-Akt-mTOR signaling and the regulation of paeoniflorin [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 141(1): 290–300.
- [14] Wang Y N, Zhang Y, Wang Y, et al. The beneficial effect of total glucosides of paeony on psoriatic arthritis links to circulating Tregs and Th1 cell function [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(3): 372–81.
- [15] Yun B R, Weon J B, Lee J, et al. Simultaneous determination of 11 bioactive compounds in Jaumganghwa-tang by high performance liquid chromatography-diode array detection [J]. *Pharmacogn Mag*, 2014, 10(Suppl 2): S256–63.

## Effects of paeoniflorin on TLR4 signal pathway in bone marrow derived macrophages of mice induced by high glucose

Yang Wenwen, Duan Fenfen, Shao Yunxia, et al

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

**Abstract Objective** To investigate the effect of paeoniflorin (PF) on Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathway in bone marrow-derived macrophages (BMDMs). **Methods** Macrophages derived from bone marrow were isolated from C57 mice and TLR4 knockout mice, high glucose was used as stimulus factor and paeoniflorin as intervention factor. BMDMs were divided into seven groups: normal control group (LG), normal control group + PF group (LG + PF), high glucose group (HG), high glucose + PF group (HG + PF), TLR4<sup>-/-</sup> control group (TLR4<sup>-/-</sup>), TLR4<sup>-/-</sup> control + high glucose group (TLR4<sup>-/-</sup> + HG), TLR4<sup>-/-</sup> control + high glucose group + PF group (TLR4<sup>-/-</sup> + HG + PF). The antigens expressed on cell surface including F4/80, CD11b and CD11c were detected by flow cytometry analyses. CCK-8 method was used to determine whether PF influenced macrophage via-

网络出版时间: 2018-6-8 10:04 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180607.1131.011.html>

## 胰岛素样生长因子-2 对婴幼儿血管瘤 干细胞增殖及脂肪分化的影响

张 魁 姜 寅 谢 娟 李红红 曹东升

**摘要** 目的 探讨胰岛素样生长因子-2 (IGF-2) 对婴幼儿血管瘤干细胞(HemSCs)增殖及向脂肪分化的影响。方法 搜集3例增生期草莓状婴幼儿血管瘤术后组织,采用胶原酶消化分离后CD133免疫磁珠吸附得到血管瘤干细胞。CCK-8法检测不同浓度IGF-2对HemSCs增殖的影响,Western blot检测空白对照组及IGF-2组(100 ng/ml)、IGF-2 + OSI-906组(IGF-2: 100 ng/ml; OSI-906: IGF-1R受体抑制剂1 μmol/L)、IGF-2 + LY294002组(LY294002: PI3K抑制剂10 μmol/L)、LY294002组(10 μmol/L)各组细胞中脂肪转化因子C/EBPα、C/EBPβ、PPARγ、adiponectin、p-AKT及total AKT的表达。结果 IGF-2在体外对HemSCs增殖有明显促进作用( $P < 0.05$ ); Western blot法显示,与IGF-2 + OSI-906组、IGF-2 + LY294002组、LY294002组及空白对照组比较,IGF-2组C/EBPα、C/EBPβ、PPARγ、adiponectin表达量增加( $P < 0.05$ ); 与IGF-2 + OSI-906组、IGF-2 + LY294002组及空白对照组比较,IGF-2组p-AKT表达量增加( $P < 0.05$ )。结论

IGF-2可能通过IGF-1R/PI3K/AKT通路影响HemSCs的脂肪转化过程。

**关键词** 胰岛素样生长因子-2; 婴幼儿血管瘤干细胞; 增殖; 脂肪分化

中图分类号 R 732.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)07-1044-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.011

婴幼儿血管瘤是一种由异常增生的血管和未成熟的血管细胞组成的良性肿瘤。其生物过程概括为毛细血管的异常增生及自行消退<sup>[1]</sup>,原病灶处血管瘤组织可溃疡出血或萎缩后形成瘢痕组织或者纤维脂肪组织<sup>[2]</sup>。近年来,婴幼儿血管瘤干细胞(hemangiomas stem cells, HemSCs)被证实作为婴幼儿血管瘤的起源细胞参与其生物学过程,有较高的增殖和分化能力。胰岛素样生长因子-2(insulin-like growth factor 2, IGF-2)是一种小却有多重功能的多肽,在肿瘤生长及调控各种生物学功能中有重要作用<sup>[3]</sup>。已有研究证实IGF-2在脂肪形成过程中明显上调<sup>[4]</sup>,而且IGF-2在增生期血管瘤组织中高表达<sup>[5]</sup>,IGF-2有三种受体:胰岛素样生长因子-2受体(insulin-like growth factor 2 receptor, IGF-2R)、胰岛

2018-04-16 接收

基金项目: 安徽省科技厅公益性技术应用研究联动计划项目(编号: 15011d04048)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院整形外科,合肥 230601

作者简介: 张 魁 男,硕士研究生;

曹东升 男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: dscao1966@126.com

bility. The chemotactic function of BMDMs in each group was detected by Transwell assay. The synergistic expression of TLR4 and inducible nitric oxide synthase(iNOS) was detected by laser scanning confocal microscopy. The expressions of tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin-1β(IL-1β), monocyte chemoattractant protein 1(MCP-1) and iNOS mRNA in each group were detected by quantitative real-time PCR. The expressions of TLR4, MyD88, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β(Trif), phospho-interferon regulatory factor 3(p-IRF3), NF-κB p65, NF-κB p-p65 and iNOS protein were detected by Western blot. Expressions of inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β and MCP-1 in cell supernatant were determined by ELISA. **Results** Compared with the LG group, high glucose can promote macrophage polarization. The transcripts of TNF-α, IL-1β, MCP-1 and iNOS mRNA were significantly increased. The expression of TLR4, MyD88, Trif, p-IRF3, IRF3, NF-κBp65, NF-κBp-p65 and iNOS proteins in HG group were significantly increased. The secretion of TNF-α, IL-1β and MCP-1 levels increased. Both PF and TLR4 knockout inhibited the macrophage activation induced by high glucose. **Conclusion**

High glucose can increase the expression of TLR4 and downstream signaling pathways, leading to the up-regulation of proinflammatory cytokines. PF and TLR4 knockout can inhibit the activation of TLR4 signaling pathway and down-regulate the expression of the production of inflammatory cytokines.

**Key words** paeoniflorin; macrophagocyte; TLR4; inflammation; diabetic nephropathy