

TLR4 乙酰化对 LPS-TLR4-NF- κ B 通路的影响及其在妊娠期糖尿病发病机制中的作用

李松丛 林袁静 方慧琴 陈薇 李琴 杨琴

摘要 目的 研究 Toll 样受体 4 (TLR4) 乙酰化在妊娠期糖尿病 (GDM) 孕妇外周血单核细胞 (PBMC) 中的表达及其在内毒素 (LPS)-TLR4-核因子 κ B (NF- κ B) 通路中的作用, 进一步探讨 GDM 的炎症发病机制。方法 选取正常孕妇、GDM 孕妇各 30 例, 抽取静脉血 15 ml, 密度梯度离心法分离 PBMC 进行体外培养, 并保留血清用于检测 LPS 的量; 将研究分成正常组 (对照组)、正常 + LPS 组、GDM 组和 GDM + LPS 组。PBMC 用于免疫共沉淀法、Western blot 法检测 TLR4 乙酰化和 NF- κ B 蛋白的表达量; 上清液用于 ELISA 法检测炎症因子肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-1 (IL-1)、白介素-10 (IL-10) 的水平。结果 正常孕妇、GDM 孕妇体内 LPS 量的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。GDM 组发生 TLR4 乙酰化变化,

而对照组未检测到 TLR4 乙酰化; LPS 干预后, 正常 + LPS 组、GDM + LPS 组 TLR4 乙酰化的程度明显增加, 且 GDM + LPS 组 TLR4 乙酰化程度明显高于 GDM 组和正常 + LPS 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。4 组 NF- κ B 的表达和炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-10 水平的差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。各组 TLR4 乙酰化与 NF- κ B 蛋白表达量之间具有正相关性 ($P < 0.05$)。结论 TLR4 乙酰化通过影响 LPS-TLR4-NF- κ B 通路的活化介导炎症因子的释放, 促进孕妇体内抗炎-致炎的失衡, 从而参与 GDM 的发生。

关键词 妊娠期糖尿病; 炎症; Toll 样受体 4; 乙酰化

中图分类号 R 714.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)01-0026-05

2015-10-20 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (编号: 1208085MH172), 安徽高校省级自然科学基金项目 (编号: KJ2011Z215)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院妇产科产前诊断中心, 合肥 230022

作者简介: 李松, 男, 硕士研究生;

丛林, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: conglin1957@163.com

妊娠期糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM) 的发病率在逐年上升, 其近、远期并发症给母儿健康带来了严重的危害。为预防和治疗 GDM, 其发病机制的研究显得尤为重要。目前认为, 胰岛功能受损、胰岛素抵抗 (insulin resistant, IR) 是 GDM 的主要病因。GDM 孕妇体内慢性炎症状态、抗炎-致

The construction of eukaryotic and shRNA expression vector of mevalonate kinase gene and its effect on cyclins expression in BxPC-3

Jin Rui, Wang Fang, Luan Kang, et al

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct the eukaryotic expression and shRNA expression vectors of mevalonate kinase (MVK) gene and study the effect on cyclins expression in BxPC-3 cells. **Methods** Total RNA was extracted from BxPC-3 cells, and the desired gene MVK was obtained by RT-PCR and acquiring chemical synthesis MVK (751-779) and MVK (1089-1117) locus oligo fragments. After construction of eukaryotic and shRNA expression vectors using genetic engineering, the recombinant was transfected into BxPC-3 and cell lines of stable expression were selected by antibiotic. Western blot was used to analyze the expression of MVK and cyclins in BxPC-3. **Results** MVK eukaryotic (pcDNA3.1-mvk) and two shRNA (piLenti-RNAi-shRNA1/2) expression vectors for MVK were successfully constructed. The cell lines with stable MVK over-expression and knockdown were obtained by antibiotic selection and Western blot. Western blot results showed that Cyclin B1 and Cyclin E expressed significantly lower both in BxPC-3 cell with MVK over-expression and MVK knockdown compared with the control. **Conclusion** Both MVK over expression and knockdown can inhibit the expression of Cyclin B1, Cyclin E in BxPC-3.

Key words mevalonate kinase; genetic recombination; oligos; cyclins; BxPC-3 cell; shRNA

炎失衡、Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 途径等参与了胰岛功能受损和 IR 的形成过程^[1-2]。GDM 也被认为是一种慢性炎症性疾病。TLR4 过度表达导致的机体异常炎症反应状态已成为许多炎症性疾病的病理基础^[3]。前期研究^[4]证实内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) -Toll 样受体 4 (TLR4) -核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路激活导致的炎症因子的释放可能参与了 GDM 的发病。蛋白质乙酰化是一种动态可逆的翻译后修饰,在调控蛋白质功能上具有简单的开关作用^[5-6]。文献^[7]报道,经 LPS 刺激培养后,单核细胞内 TLR4 可发生乙酰化,并且正向调控炎症通路的激活及炎症因子的表达。目前关于 TLR4 乙酰化在 GDM 体内是否表达并发挥一定作用仍不明确。该研究旨在通过探讨 TLR4 乙酰化在 LPS-TLR4-NF- κ B 通路中的作用,进一步阐述 GDM 的炎症发病机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取在安徽医科大学第一附属医院内分泌实验室行口服葡萄糖耐量实验 (OGTT) 的妊娠 24~28 周的孕妇为研究对象, GDM 孕妇、正常孕妇各取 30 例。GDM 的纳入采用国际妊娠期糖尿病研究组 (IADPSG) 诊断标准^[8],同时排除 GDM 的高危因素。GDM 孕妇年龄 21~34 (31.04 \pm 2.67) 岁,孕 24~28 (26.24 \pm 1.26) 周;正常孕妇年龄 22~34 (30.91 \pm 1.60) 岁,孕 24~28 (25.68 \pm 3.41) 周,且两组差异无统计学意义。本研究获得受试者知情同意,并经我院伦理委员会讨论通过。

1.2 试剂 Ficoll 淋巴细胞分离液 (上海华精生物公司); LPS、台盼蓝 (美国 Sigma 公司); RPMI-1640 培养液 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司); RIPA 裂解液、5 \times 和 2 \times 蛋白上样缓冲液、蛋白 A + G 琼脂糖珠 (上海碧云天公司); 小鼠抗人 TLR4 抗体、小鼠抗人泛乙酰化赖氨酸抗体 (英国 Abcam 公司); 小鼠抗人 NF- κ B p65 抗体、 β -actin (美国 CST 公司); 山羊抗小鼠二抗 (北京中杉公司); ECL 显影液 (美国 Thermo 公司); 鲎试剂盒 (厦门鲎试剂公司); ELISA 试剂盒 (上海源叶生物科技有限公司)。

1.3 标本采集与细胞培养 采集受试者晨起空腹静脉血 15 ml,室温静置 30 min 后血液不凝。Ficoll 淋巴细胞分离液分离外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC),洗涤提纯后细胞计数板计数,台盼蓝测定细胞活力 (>95%)。调整细

胞浓度后,将细胞接种于 24 孔板内,加 RPMI-1640 培养基 (含 10% 的胎牛血清,青、链霉素 1 ml/100 ml) 将每孔总体积调至 1 ml,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.4 实验分组 细胞培养 48 h 后,向 24 孔板内加入终浓度为 1 μ g/ml 的 LPS 干预 24 h,每种处理设 3 个复孔,并将处理后的细胞标记为正常组 (对照组) 和正常 + LPS 组、GDM 组和 GDM + LPS 组。24 h 后收集细胞用于后续实验。LPS 浓度设定参考前期实验^[9]。

1.5 血清 LPS 含量的检测 血清 LPS 检测按照鲎试剂盒说明书操作。

1.6 Western blot 法检测 NF- κ B p65 的表达 RIPA 裂解细胞,离心取上清液加入 5 \times 蛋白上样缓冲液,煮蛋白 10 min。10% SDS-PAGE 电泳分离总蛋白,转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,洗膜后放入 NF- κ B p65 抗体 (1:250) 和 β -actin (1:1000) 中 4 $^{\circ}$ C 过夜。洗膜,放入二抗 (1:1000) 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, ECL 显影液显影。采用 Image J 和 GraphPad Prism5.0 分析软件进行蛋白显影后图像分析。

1.7 免疫共沉淀法和 Western blot 法检测 TLR4 乙酰化的表达 冰上裂解细胞,离心取上清液置于离心管中加入 2 μ g TLR4 抗体。离心使其向离心管内加入再悬浮后的蛋白 A + G 琼脂糖珠 20 μ l; 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;离心使颗粒沉淀,弃上清液;颗粒洗涤 3 遍,每次离心均弃上清液;加 2 \times 蛋白上样缓冲液 10 μ l 重悬沉淀物;煮沸 10 min。12.5% SDS-PAGE 电泳分离总蛋白,转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,洗膜后放入泛乙酰化抗体 (1:800) 和 TLR4 抗体 (1:400) 中 4 $^{\circ}$ C 过夜。洗膜,放入二抗 (1:1000) 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, ECL 显影液显影。采用 Image J 和 GraphPad Prism5.0 分析软件进行蛋白显影后图像分析。

1.8 ELISA 法检测肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白介素-1 (interleukin-1, IL-1)、白介素-10 (interleukin-10, IL-10) 的水平 培养液中 TNF- α 、IL-1、IL-10 的检测均按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析 (ANOVA) 相关分析采用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 血清 LPS 的检测结果 GDM 组血清 LPS 水

平 $[(0.92 \pm 0.03) \text{ IU/ml}]$ 明显高于对照组 $[(0.53 \pm 0.02) \text{ IU/ml}]$, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 TLR4 乙酰化的检测结果 GDM 组检测到 TLR4 发生乙酰化修饰, 而对照组 TLR4 则未检测到乙酰化的修饰。LPS 干预培养后, 正常 + LPS 组和 GDM + LPS 组 TLR4 乙酰化的程度均显著增加, 且 GDM + LPS 组高于 GDM 组和正常 + LPS 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

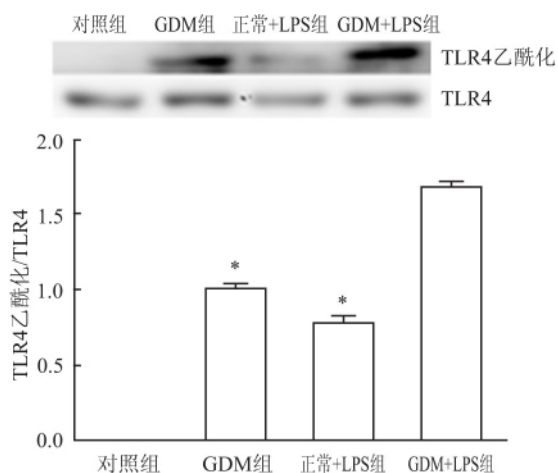


图1 各组 TLR4 乙酰化的水平
与 GDM + LPS 组比较: * $P < 0.05$

2.3 Western blot 法检测 NF- κ B p65 表达的结果

GDM 组 NF- κ B p65 的表达高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); LPS 干预处理后, 正常 + LPS 组、GDM + LPS 组 NF- κ B p65 的表达明显高于对照组, GDM + LPS 组高于正常 + LPS 组和 GDM 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.4 ELISA 法检测炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-10 的表达结果 GDM 组、正常 + LPS 组、GDM + LPS 组 TNF- α 、IL-1、IL-10 的表达均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); LPS 干预处理后, 正常 + LPS 组 TNF- α 、IL-1、IL-10 的表达均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), GDM + LPS 组高于正常 + LPS 组和 GDM 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1、图 3。

表1 各组 TNF- α 、IL-1、IL-10 表达水平的比较 (pg/ml $\bar{x} \pm s$)

分组	TNF- α	IL-1	IL-10
对照	45.49 \pm 0.81	53.82 \pm 5.13	21.01 \pm 0.51
GDM	55.97 \pm 2.84* #	75.92 \pm 1.18* #	31.42 \pm 1.52* #
正常 + LPS	52.48 \pm 1.39* #	73.60 \pm 0.99* #	28.77 \pm 0.63* #
GDM + LPS	62.55 \pm 0.87	89.08 \pm 2.93	39.51 \pm 3.81

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 GDM + LPS 组比较: # $P < 0.05$

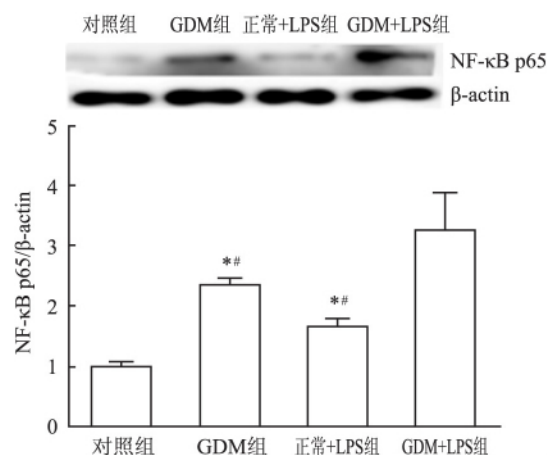


图2 各组 NF- κ B p65 的水平
与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 GDM + LPS 组比较: # $P < 0.05$

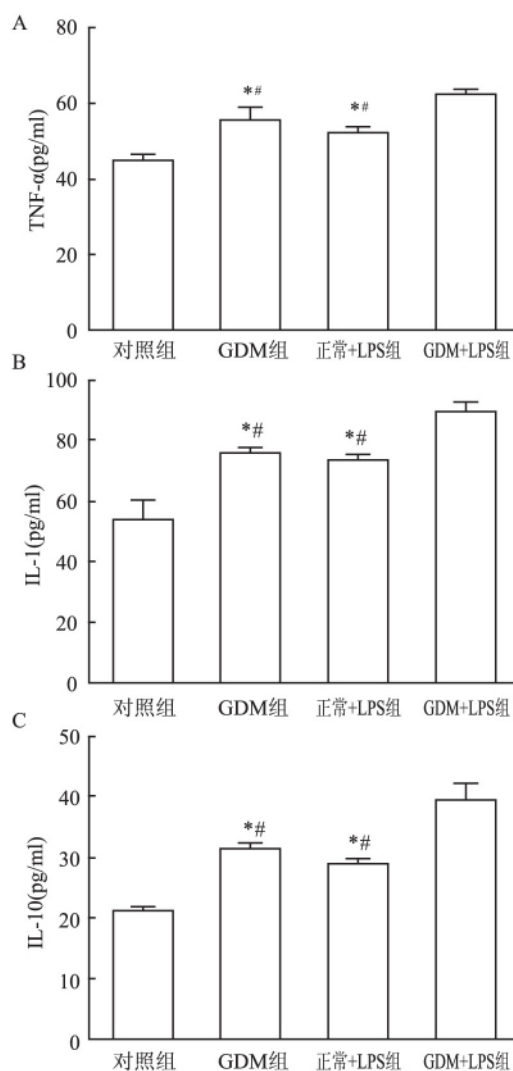


图3 各组 TNF- α 、IL-1、IL-10 的水平

A: TNF- α ; B: IL-1; C: IL-10; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 GDM + LPS 组比较: # $P < 0.05$

2.5 各组 TLR4 乙酰化、NF- κ B p65 蛋白表达的相关性分析 Pearson 相关分析显示,GDM 组、正常 + LPS 组、GDM + LPS 组 TLR4 乙酰化、NF- κ B p65 蛋白表达量之间呈正相关性($r=0.901, 0.870, 0.942$, $P<0.001$)。

3 讨论

TLR4 为 I 型跨膜蛋白受体,在其介导的炎症通路中具有“闸门”的作用^[10]。NF- κ B 是 TLR4 信号通路下游最重要的介质,激活后的 NF- κ B 进入细胞核与靶基因特定序列结合,促进炎症因子的合成和释放。LPS-TLR4-NF- κ B 是 TLR4 信号通路中的经典炎症通路,现已成为 GDM 炎症发病机制的研究热点。研究^[1]表明,单核细胞内 TLR4 mRNA 和蛋白表达的增加与 GDM 的发生密切相关,前期研究^[4,9]则通过对 TLR4、NF- κ B mRNA 及炎症因子表达的相关性分析得出,LPS-TLR4-NF- κ B 通路的激活是 GDM 发病的关键。蛋白质乙酰化是重要的翻译后修饰过程,不仅在细胞核内具有重要作用,同时调控着不同的细胞质过程,包括细胞的骨架动力学、能量代谢、内吞、细胞膜信号转导等^[11]。TLR4 蛋白存在翻译后修饰,包括甲基化、乙酰化、磷酸化等,其中乙酰化促进炎症因子的表达,其存在是 TLR4 炎症通路活化的必要条件。

本研究显示,GDM 孕妇外周血 LPS 含量高于正常孕妇,且 TLR4 乙酰化的修饰仅存在于 GDM 孕妇 PBMC,而正常孕妇并未检测到 TLR4 乙酰化变化;另外,GDM 组炎症因子 TNF- α 、IL-1 和 IL-10 的表达水平高于对照组,这与前期研究^[4,9]和国外的报道^[12]是一致的。妊娠期孕妇体内环境会发生适应性改变,肠道菌群产生的 LPS 可异位进入外周循环,进入外周循环后的 LPS 除可独立诱导机体产生 IR 外,还可诱导多种细胞的 TLR4 活化,激活炎症通路^[13]。推测 LPS 可能通过上调 TLR4 乙酰化进而影响炎症通路的活化,促进了炎症因子的表达。进一步研究显示,LPS 干预培养后,正常 + LPS 组、GDM + LPS 组 TLR4 乙酰化的表达明显增加,且 GDM + LPS 组明显高于 GDM 组和正常 + LPS 组,提示配体的增加对 TLR4 乙酰化的表达有促进作用。GDM 孕妇体内存在氧化应激和代谢的紊乱,如饱和脂肪酸、活性氧自由基、热休克蛋白等的增加^[14],这些均可作为 TLR4 的内源性配体,GDM 孕妇体内紊乱的代谢环境可能促进了 TLR4 乙酰化的表达介导炎症因子的释放,导致 GDM 疾病的进展,但这些有

待于进一步研究证实。

IL-1、TNF- α 、IL-10 的升高可导致 IR 的形成和胰岛功能的损伤。另外,IL-10 不仅是体内最重要的抗炎细胞因子,还可作为 NF- κ B 的抑制剂,抑制炎症细胞产生炎症因子,从而影响炎症反应的强度。本研究中,LPS 干预培养后,TNF- α 、IL-1 和 IL-10 的表达水平明显增高,且 GDM + LPS 组高于正常 + LPS 组;此外,IL-10 的升高幅度低于 TNF- α 和 IL-1。说明 GDM 孕妇体内低度炎症状态可能通过增加 TLR4 乙酰化的敏感性从而加剧了抗炎-致炎的失衡。

TLR4 乙酰化和 NF- κ B 蛋白表达的相关性分析,也说明了 TLR4 通过翻译后的乙酰化修饰作用调控着孕妇体内 LPS-TLR4-NF- κ B 通路的活化程度。本研究仅在体外环境下进行,然而人体内的复杂环境是否对 TLR4 乙酰化修饰产生影响,仍需要大量研究来证明。目前,针对蛋白质乙酰化的药物已在治疗肿瘤等疾病上取得了一定的成果^[15]。后期研究将会对 TLR4 的乙酰化位点进行检测,并评估这些位点的作用,以期对 GDM 的靶向治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] Xie B G, Jin S, Zhu W J. Expression of toll-like receptor 4 in maternal monocytes of patients with gestational diabetes mellitus [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 7(1): 236-40.
- [2] Kuzmicki M, Telejko B, Wawrusiewicz-Kurylonek N, et al. The expression of genes involved in NF- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with gestational diabetes [J]. *Eur J Endocrinol*, 2013, 168(3): 419-27.
- [3] Kolek M J, Carlquist J F, Muhlestein J B, et al. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes [J]. *Am Heart J*, 2004, 148(6): 1034-40.
- [4] 丛林,李从青,姚洁,等. LPS-TLR4-NF- κ B 通路在妊娠期糖尿病、正常孕妇及育龄妇女外周血单核细胞中的表达 [J]. *现代妇产科进展*, 2010, 19(11): 820-2.
- [5] Ito K, Charron C E, Adcock I M. Impact of protein acetylation in inflammatory lung diseases [J]. *Pharmacol Ther*, 2007, 116(2): 249-65.
- [6] Lu C T, Lee T Y, Chen Y J, et al. An intelligent system for identifying acetylated lysine on histones and nonhistone proteins [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 528650.
- [7] 王居平. TLR4 乙酰化/甲基化修饰激活对炎症免疫的调节 [D]. 杭州:浙江大学, 2011.
- [8] International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel, Metzger B E, Gabbe S G, et al. International

- association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy [J]. *Diabetes Care* ,2010 ,33(3) : 676 – 82.
- [9] 李从青,姚洁,刘长明,等. 内毒素对妊娠期糖尿病患者外周血单核细胞 TLR4 mRNA 及 NF- κ B mRNA 表达的影响[J]. *安徽医科大学学报* ,2011 ,46(3) : 254 – 7.
- [10] Medzhitov R ,Preston-Hurlburt P ,Janeway C A Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. *Nature* ,1997 ,388(6640) : 394 – 7.
- [11] Matthias P ,Yoshida M ,Khochbin S. HDAC6 a new cellular stress surveillance factor[J]. *Cell Cycle* ,2008 ,7(1) : 7 – 10.
- [12] Volpe L ,Di Cianni G ,Lencioni C , et al. Gestational diabetes , inflammation , and late vascular disease [J]. *J Endocrinol Invest* , 2007 ,30(10) : 873 – 9.
- [13] Liang H ,Hussey S E ,Sanchez-Avila A , et al. Effect of lipopolysaccharide on inflammation and insulin action in human muscle [J]. *PLoS One* ,2013 ,8(5) : e63983.
- [14] Beg A A. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses [J]. *Trends Immunol* ,2002 ,23(11) : 509 – 12.
- [15] Geng H ,Harvey C T ,Pittsenbarger J , et al. HDAC4 protein regulates HIF1 α protein lysine acetylation and cancer cell response to hypoxia [J]. *J Biol Chem* ,2011 ,286(44) : 38095 – 102.

Effect of TLR4 acetylation on LPS-TLR4-NF- κ B pathway and its role in pathogenesis of gestional diabetes mellitus

Li Song ,Cong Lin ,Yuan Jing ,et al

(*Prenatal Diagnosis Center ,Dept of Obstetrics and Gynecology ,
The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022*)

Abstract Objective To study TLR4 acetylation for analysing the expression in peripheral blood mononuclear cells of gestional diabetes mellitus(GDM) patients , and the impact on LPS-TLR4-NF- κ B pathway , discussing the inflammatory pathogenesis of GDM. **Methods** 30 normal pregnant women and 30 GDM patients were picked and 15 ml peripheral blood was drawn per subject respectively. Peripheral blood mononuclear cells(PBMC) were extracted *via* density gradient centrifugation and were cultured *in vitro* , Serum was used for detecting the level of lipopolysaccharide(LPS) . The research was divided into four groups: normal group (control group) , normal + LPS group , GDM group and GDM + LPS group. PBMC were adopted into immunoprecipitation and Western blot was used to detect the expression of TLR4 acetylation , the supernatant was used in ELISA for detecting different levels of inflammatory cytokines ,TNF- α ,IL-1 and IL-10. **Results** Levels of LPS were statistically significant in woman with GDM and normal pregnant woman($P < 0.05$) . TLR4 acetylation appeared in GDM group , and was negative in the control group. After the LPS intervention ,the degree of TLR4 acetylation was enhanced evidently in both normal + LPS group and GDM + LPS group. And the latter was obviously higher than that of GDM group and normal + LPS group ($P < 0.05$) . The differences among levels of these four inflammatory cytokines ,TNF- α ,IL-1 and IL-10 , had statistical significance($P < 0.05$) . There was a positive correlation between TLR4 acetylation and NF- κ B protein expression levels($P < 0.05$) . **Conclusion** TLR4 acetylation mediates the release of inflammatory cytokines by influencing the activation of LPS-TLR4-NF- κ B pathway , which contributes to promoting antiinflammatory-proinflammatory imbalance in pregnant woman , thereby involves in the occurrence of GDM.

Key words gestional diabetes mellitus; inflammation; TLR4; acetylation