

# TLR4 信号通路在高糖诱导骨髓来源巨噬细胞激活中的作用

张婷敏 邵云侠 徐兴欣 王 坤 吴永贵

**摘要** 目的 通过研究高糖对骨髓来源巨噬细胞(BMDM) Toll 受体 4(TLR4) 表达及其下游信号通路的影响,初步探讨高糖通过 TLR4 信号通路促进巨噬细胞分泌炎症因子的机制。方法 分离获取 C57BL/6J 及 B10ScNNju(TLR4 基因敲除小鼠) BMDM,流式细胞仪检测其纯度;选取不同浓度的高糖及甘露醇,在不同时间点刺激 BMDM;后将 BMDM 分为 4 组:正常糖浓度(LG)组、高糖刺激(HG)组、TLR4 基因敲除(TLR4<sup>-/-</sup>)组、TLR4 基因敲除 BMDM 高糖刺激(TLR4<sup>-/-</sup>+HG)组。采用流式细胞术观察 BMDM M1 表型,细胞免疫荧光法观察 BMDM TLR4 与诱生型一氧化氮合酶(iNOS)共表达,实时定量 PCR 法检测各组细胞中促炎细胞因子肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、单核细胞趋化因子-1(MCP-1)、白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )及 iNOS 的 mRNA 表达,Western blot 法检测各组总蛋白中 TLR4、髓样分化因子 88(MyD88)、TIR 结构域衔接蛋白(Trif)、磷酸化白介素受体相关激酶-1(p-IRAK-1)、干扰素调节因子 3(IRF3)、磷酸化(p)-IRF3、核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) p65、NF- $\kappa$ B p-p65、iNOS 蛋白的表达,ELISA 法测定细胞上清液中促炎因子 TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$  的表达。结果 与 LG 组比较,高糖可使 M1 型巨噬细胞百分比增加;TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$  及 iNOS 的 mRNA 水平上调;TLR4、MyD88、Trif、p-IRAK-1、p-IRF3、IRF3、NF- $\kappa$ B p65、NF- $\kappa$ B p-p65、iNOS 蛋白表达水平升高;细胞培养基中分泌的 TNF- $\alpha$ 、MCP-1、IL-1 $\beta$  水平升高。TLR4 基因敲除可消除高糖导致的巨噬细胞激活效应。结论 高糖可诱导 BMDM 向 M1 型极化;TLR4 基因敲除可抑制高糖诱导的巨噬细胞向 M1 活化及炎症因子的产生。

**关键词** 骨髓来源巨噬细胞; Toll 受体 4; 高糖; 炎症

中图分类号 R 587.24

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)10-1396-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.002

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病患者常见的微血管并发症之一,研究<sup>[1]</sup>显示慢性炎症状态在 DN 的病程起了重要作用。巨噬细胞是

炎症反应中主要的调节细胞,在 DN 早期肾组织中已有巨噬细胞的浸润,激活后分泌细胞因子、炎症介质,产生氧自由基等<sup>[2]</sup>,造成肾组织结构 and 功能的损伤。DN 的病程中巨噬细胞如何浸润、激活一直是中外学者密切关注和研究的焦点。研究<sup>[3]</sup>显示 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)家族成员 Toll 受体 2(Toll-like receptor 2, TLR2)和 Toll 受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)很有可能是联系糖尿病患者天然免疫系统和微血管炎症反应的关键。但关于 TLRs 受体在糖尿病肾病中如何被激活,作用于何种细胞,引起炎症反应并没有清楚的认识。高血糖是 DN 发生、发展的先决条件,该实验在体外骨髓来源巨噬细胞(bone marrow-derived macrophages, BMDM)中以高糖刺激模拟糖尿病微环境,假定 TLR4 与其内源性配体结合,激活下游信号通路 TLR4、髓样分化因子 88(myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88)、TIR 结构域衔接蛋白(TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ , Trif)、磷酸化白介素受体相关激酶-1(phospho-IL-1 receptor-associated kinase-1, p-IRAK-1)、干扰素调节因子 3(interferon regulatory factor 3, IRF3)、核因子 $\kappa$ B(nuclear factor $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B),产生损伤介质如肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、单核细胞趋化因子-1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)、白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )等,使巨噬细胞极化为 M1 型。为下一步探讨阻断巨噬细胞 TLR4 信号通路激活途径防治 DN 提供实验基础。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** 6~8 周龄雄性 SPF 级 C57BL/6J 小鼠及 B10ScNNju(TLR4 基因敲除)小鼠,18~20 g,由南京大学模式动物研究所提供。L929 小鼠成纤维细胞细胞株(中科院上海细胞库);DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)(加拿大 WISSENT 公司);D-葡萄糖、甘露醇(美国 Sigma 公司);FITC 标记抗小鼠 F4/80 抗体、APC 标记抗小鼠 CD11b 抗体、PE 标记抗小鼠 CD11c 抗体(美国 Bio Legend 公司);TRIzol

2016-07-14 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:张婷敏,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

试剂(美国 Life Technology 公司);反转录试剂盒(美国 Promega 公司);实时荧光定量 PCR 试剂盒(美国 Bio-Rad 公司);实时荧光定量 PCR 引物(上海生工、美国 GeneCopoeia 公司);兔抗 TLR4、兔抗 MyD88、兔抗 Trif、兔抗诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)多克隆抗体(美国 Abcam 公司);兔抗 p-IRAK1 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);兔抗 p-IRF3、兔抗 IRF3、兔抗 NF- $\kappa$ B p-p65、兔抗 NF- $\kappa$ B p65 多克隆抗体(美国 CST 公司);小鼠抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG、羊抗小鼠 IgG(武汉三鹰生物技术公司);ECL 增强化学发光试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司);流式细胞仪(美国 BD 公司, FACS Calibur);激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司, TCS SP5)。

## 1.2 方法

**1.2.1 BMDM 分离、培养及鉴定** 颈椎脱臼法处死小鼠后, 75% 乙醇浸泡 5 min, 分离股骨和胫骨, 70% 乙醇浸泡 3 min; 移入超净台剪开骨两端, 用含 2% FBS 的预冷 PBS 5~6 ml 冲出骨髓细胞, 过细胞筛, 红细胞裂解液去除红细胞, 2 290 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用含有 15% L929 细胞培养液、10% FBS 和 1% 青链霉素的 DMEM 培养基重悬, 调整细胞浓度至  $1 \times 10^6$  个/ml, 接种至 6 孔板, 于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 孵箱中培养, 第 7 天时收获细胞, 流式细胞仪 F4/80 和 CD11b 双标记阳性为成熟 BMDM。

**1.2.2 实验条件优化** 使用不同浓度葡萄糖刺激成熟 BMDM, 甘露醇补充使培养基渗透压浓度相同, 以排除渗透压对实验的影响。收集细胞, 提取总蛋白, 选取 TLR4、iNOS 蛋白表达上调最高的葡萄糖刺激浓度, 作为后续实验中的高糖刺激浓度。采取同一浓度高糖刺激 BMDM, 选取不同时间点收集细胞, 提取总蛋白, 观察 TLR4、iNOS 蛋白表达, 以确定高糖刺激最佳时间。将 BMDM 分为 4 组: 正常糖浓度(LG)组、高糖刺激(HG)组、TLR4 基因敲除(TLR4<sup>-/-</sup>)组、TLR4 基因敲除 BMDM 高糖刺激(TLR4<sup>-/-</sup> + HG)组。

**1.2.3 细胞免疫荧光** 取  $1 \times 10^5$  个 BMDM 接种于 Petri 皿中, 预冷 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 4 °C 条件下, 加入 5% 驴血清阻断 2 h, PBS 漂洗 2 遍, 加入抗 iNOS 和抗 TLR4 的一抗, 4 °C 过夜, PBS 洗涤后, 分别加入一抗对应的标记为 PE 和 FITC 的二抗, 避光孵育 2 h。PBS 洗涤后, 用 DAPI 进行细胞核染色, 然后将细胞放在激光共聚焦显微镜下观察。

**1.2.4 流式细胞术检测** 各组 BMDM M1 型活化百分比 用抗小鼠 CD16/CD32 受体阻断抗体孵育 30 min 封闭 BMDM 膜上 Fc 受体, 然后加入 FITC 标记的抗小鼠 F4/80 抗体, APC 标记的 CD11b 和 PE 标记的 CD11c 抗体, 4 °C 避光孵育 30 min, 2 500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 重悬于 500  $\mu$ l PBS 中混匀, 流式细胞仪检测 F4/80、CD11b 和 CD11c 标记均为阳性的细胞(De Novo Software 公司的 FCS Express 4.0), 计算阳性巨噬细胞百分比。

**1.2.5 Western blot 法检测细胞蛋白表达** 收集各组细胞, 冰上裂解后提取总蛋白, BCA 蛋白试剂盒测定各组蛋白浓度。每个蛋白样品取 40  $\mu$ g 上样, 经 8%~12% SDS-PAGE 电泳, 恒流转至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂牛奶 37 °C 封闭 2 h, 加一抗 TLR4 (1:1 000)、MyD88 (1:250)、Trif (1:500)、p-IRAK1 (1:200)、p-IRF3 (1:1 000)、IRF3 (1:1 000)、NF- $\kappa$ B p-p65 (1:1 000)、NF- $\kappa$ B p65 (1:1 000)、 $\beta$ -actin (1:35 000) 4 °C 过夜, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入辣根过氧化物酶标记二抗 (1:8 000), 37 °C 孵育 45 min, 将 ECL 发光试剂盒中的 A、B 液等体积混合, 用移液枪反复滴于膜上, 反应 30 s 后, 放入 AI 600 化学发光凝胶成像系统中显影。用 IQTL8.1 软件对 Western blot 条带进行半定量分析。以  $\beta$ -actin 条带和目的条带积分光密度(optical density, OD) 值比值均值作为每组的结果。

**1.2.6 实时荧光定量 PCR 法检测各组细胞 mRNA 的表达** 使用 TRIzol 试剂提取各组细胞总 RNA, 紫外分光光度法检测 RNA 纯度, 要求 OD<sub>260 nm</sub>/OD<sub>280 nm</sub> 比值在 1.8~2.0, 后以 RNA 为模板反转录成 cDNA。实时荧光定量 PCR 采用 SYBR Green 法, GAPDH 引物序列上游引物: 5'-ACCCCAGCAAGGA-CACTGAGCAAG-3'; 下游引物: 5'-GGCCCCTCCTGT-TATTATGGGGT-3'。TNF- $\alpha$  引物序列上游引物: 5'-CCCTCCTGGCCAACGGCATG-3'; 下游引物: 5'-TCGGGGCAGCCTTGTCCCTT-3'。下列引物由 GeneCopoeia 公司合成: MCP-1: 货号 MQP027672; IL-1 $\beta$ : 货号 MQP027422; iNOS: 货号 MQP029793。其反应条件为: 95 °C 预变性 10 min, 进入循环; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 扩增 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。每个样本重复 3 次, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法分析相对表达量。

**1.2.7 ELISA 法检测** 各组巨噬细胞培养基中细胞因子含量 实验结束后吸取各组巨噬细胞培养基, 5 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 吸取上清液, -80 °C

保存。按照 ELISA 试剂盒说明书测定培养基中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP-1 的含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示; 方差齐性检验用 Levene 法, 应用单因素方差分析(One-Way ANOVA) 组间差异显著性采用 LSD 检验。

## 2 结果

2.1 BMDM 诱导分化及鉴定 流式细胞术鉴定 BMDM ,FITC 标记的抗小鼠 F4/80、APC 标记的抗小鼠 CD11b。BMDM 纯度达到 99.18%。见图 1。

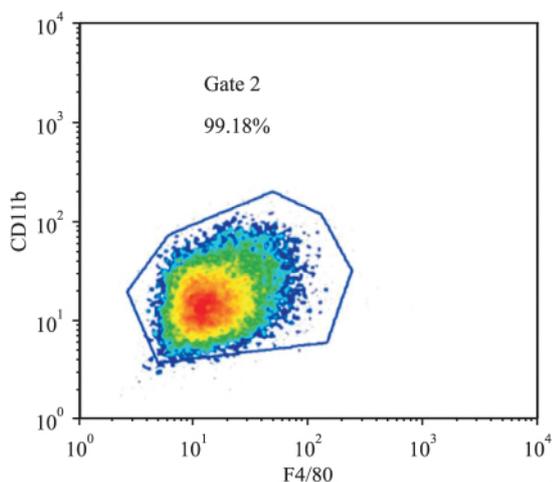


图 1 流式细胞术检测 BMDM 的纯度  
CD11b 示巨噬细胞的成熟度; F4/80 示巨噬细胞的表面标志物

2.2 BMDM 不同高糖刺激浓度、不同刺激时间点 TLR4 及 iNOS 的表达 为优化实验条件,使用 20、25、30、35 mmol/L 4 个糖浓度刺激 BMDM 并使用甘露醇做渗透压对照,Western blot 结果提示在糖浓度为 25 mmol/L 时 TLR4 表达升高,但在 30 mmol/L 时(0.69  $\pm$  0.02) 升高最明显 ( $F = 128.334, P < 0.05$ ); 糖浓度为 20 mmol/L 即可使 iNOS 表达升高,糖浓度在 30 mmol/L 时(0.67  $\pm$  0.03) 升高最明显 ( $F = 89.259, P < 0.05$ )。见图 2。随后在 8 个刺激时间点 0、0.5、1、2、4、6、12、24 h 收集 BMDM,Western blot 结果提示 TLR4 在刺激 1 h 即开始升高 24 h (0.67  $\pm$  0.01) 达到高峰 ( $F = 159.263, P < 0.05$ ); iNOS 在刺激 6 h 开始升高 24 h (0.69  $\pm$  0.01) 达到高峰( $F = 52.853, P < 0.05$ )。见图 3。后续实验选择 30 mmol/L 糖浓度做为培养基葡萄糖终浓度,刺激时间 24 h 做为实验终点。

2.3 高糖刺激 BMDM M1 型活化及 TLR4 基因敲除的影响 激光共聚焦显微镜下观察 HG 组 TLR4

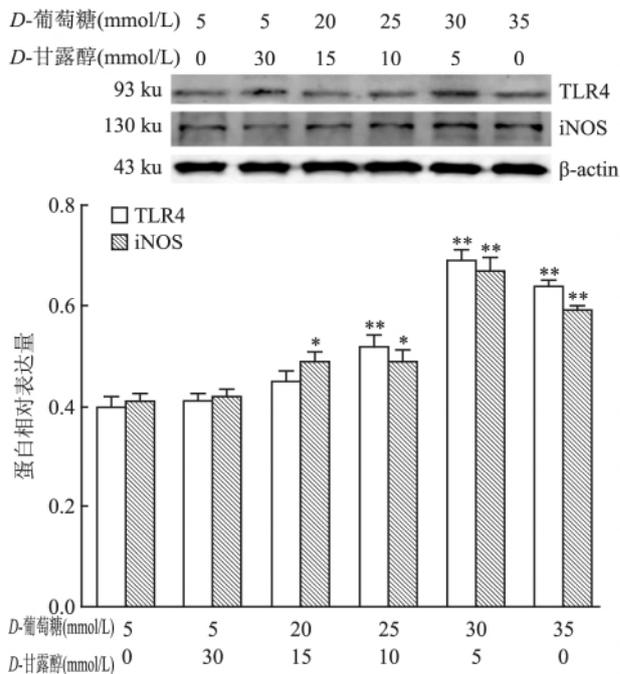


图 2 不同高糖浓度刺激 BMDM 对 TLR4 和 iNOS 表达的影响  
与正常糖浓度(5 mmol/L) 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

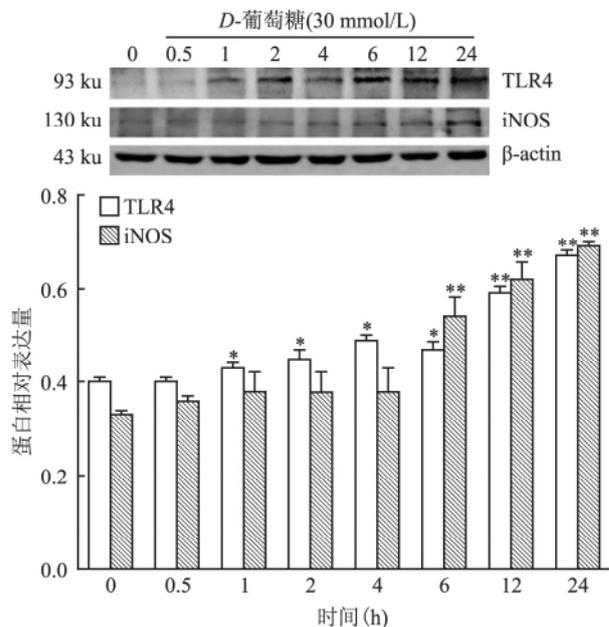


图 3 不同刺激时间点对 BMDM TLR4 和 iNOS 表达的影响  
与 0 h 比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

及 M1 型巨噬细胞特异性标志物 iNOS 荧光强度明显高于 LG 组,而 TLR4 基因敲除后可使 iNOS 荧光强度明显减弱,见图 4。流式细胞仪检测 F4/80、CD11b 和 CD11c 阳性的 M1 型巨噬细胞结果显示, HG 组 M1 型巨噬细胞比例比 LG 组显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 HG 组比较,敲除 TLR4 基因后 M1 型巨噬细胞比例显著降低 ( $P < 0.05$ ),各组间差异有统计学意义 ( $F = 475.454, P < 0.05$ )。见图 5。

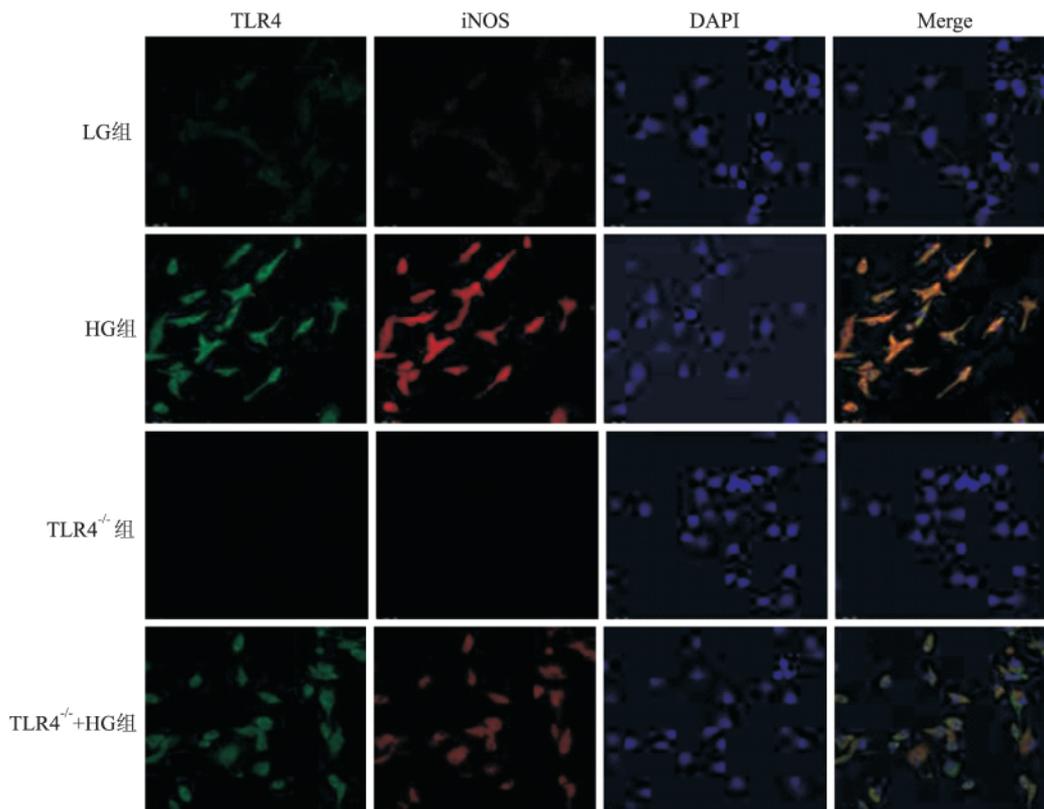


图4 激光共聚焦检测高糖对 BMDM 的活化作用 ×400

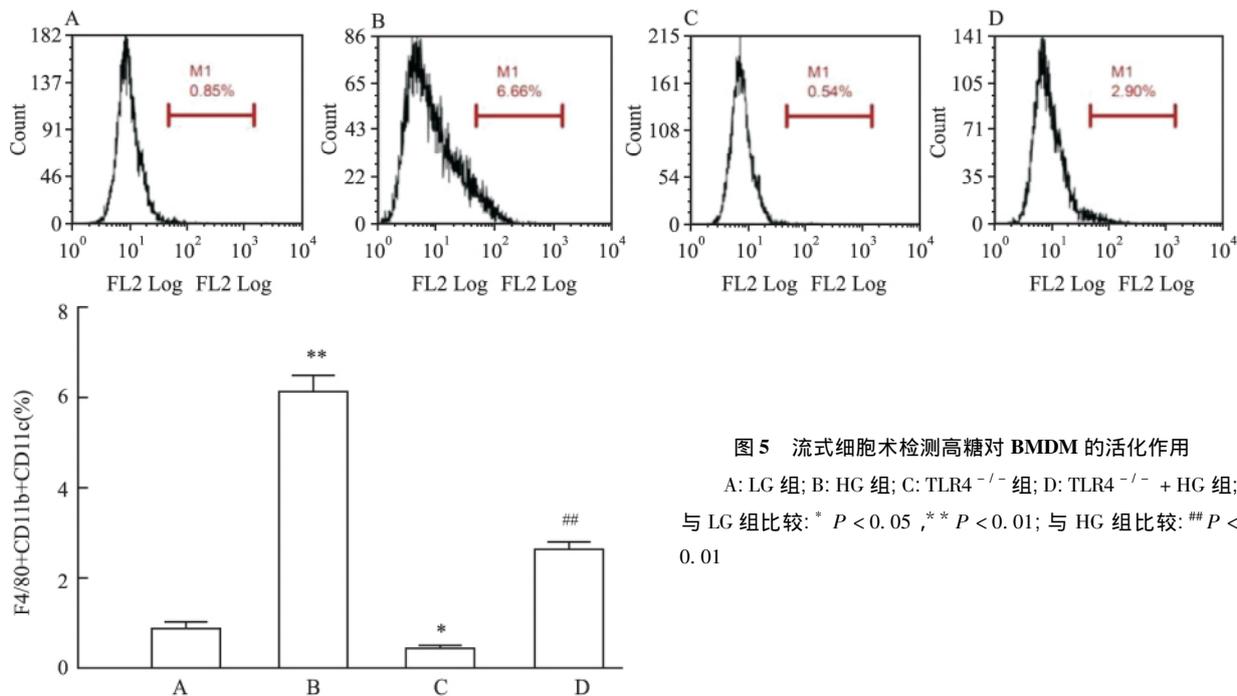


图5 流式细胞术检测高糖对 BMDM 的活化作用

A: LG 组; B: HG 组; C: TLR4<sup>-/-</sup> 组; D: TLR4<sup>-/-</sup> + HG 组; 与 LG 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 HG 组比较: ##  $P < 0.01$

2.4 高糖刺激对 TLR4 信号通路及 iNOS 的影响

Western blot 结果显示,与 LG 组比较,HG 组 TLR4、MyD88、p-IRAK-1、Trif、p-IRF3、IRF3、NF-κB p-p65、NF-κB p65 及 iNOS 蛋白表达均升高 ( $P < 0.05$ );而与 HG 组比较,TLR4 基因敲除可显著抑制 TLR4、MyD88、p-IRAK-1、Trif、p-IRF3、IRF3、NF-κB

p-p65、NF-κB p65 及 iNOS 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ )。各指标组间差异有统计学意义 ( $F_{TLR4} = 655.171$ ,  $F_{MyD88} = 844.074$ ,  $F_{p-IRAK-1} = 335.537$ ,  $F_{Trif} = 247.578$ ,  $F_{p-IRF3} = 171.421$ ,  $F_{IRF3} = 179.654$ ,  $F_{NF-κB p-p65} = 800.409$ ,  $F_{NF-κB p65} = 181.135$ ,  $F_{iNOS} = 188.658$ ,  $P < 0.05$ )。见图 6。

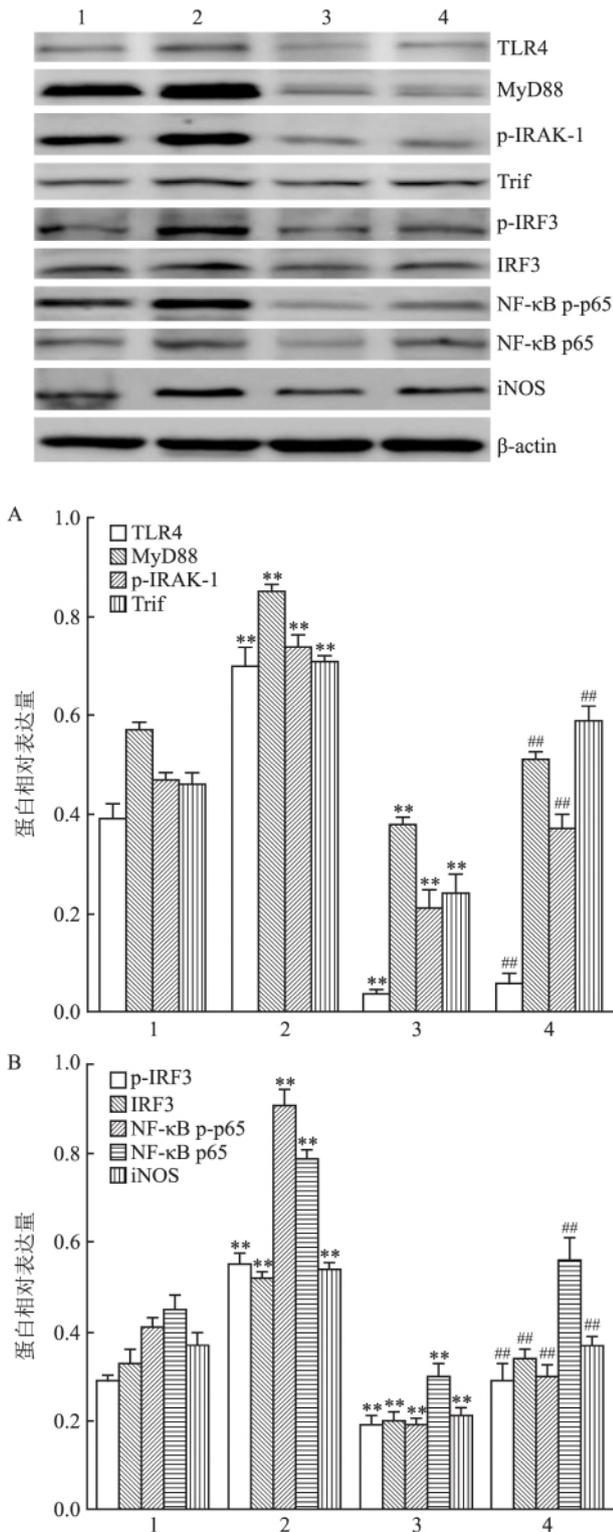


图6 Western blot 法检测和光密度分析高糖刺激 BMDM 细胞对 TLR4 信号通路及 iNOS 的影响

A: TLR4、MyD88、p-IRAK-1、Trif 蛋白表达; B: p-IRF3、IRF3、NF-κB p-p65、NF-κB p65 及 iNOS 蛋白表达; 1: LG 组; 2: HG 组; 3: TLR4<sup>-/-</sup> 组; 4: TLR4<sup>-/-</sup> + HG 组; 与 LG 组比较: \*\**P* < 0.01; 与 HG 组比较: ##*P* < 0.01

2.5 高糖刺激对 TNF-α、IL-1β、MCP-1 和 iNOS mRNA 表达的影响 实时荧光定量 PCR 结果显示, 与 LG 组比较, HG 组 TNF-α、IL-1β、MCP-1 和 iNOS mRNA 水平均明显上调 (*P* < 0.05)。而与 HG 组比较, TLR4 基因敲除可使 TNF-α、IL-1β、MCP-1 和 iNOS mRNA 水平不同程度降低 (*P* < 0.05)。各指标组间差异有统计学意义 ( $F_{TNF-α} = 1119.907$ ,  $F_{IL-1β} = 1047.669$ ,  $F_{MCP-1} = 797.689$ ,  $F_{iNOS} = 1251.348$ , *P* < 0.05)。见图 7。

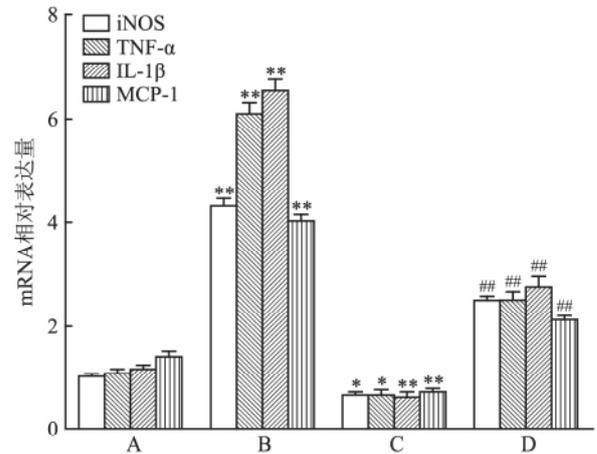


图7 高糖刺激对 TNF-α、IL-1β、MCP-1 和 iNOS mRNA 表达的影响

A: LG 组; B: HG 组; C: TLR4<sup>-/-</sup> 组; D: TLR4<sup>-/-</sup> + HG 组; 与 LG 组比较: \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01; 与 HG 组比较: ##*P* < 0.01

2.6 高糖刺激对 BMDM 培养基中分泌 TNF-α、IL-1β、MCP-1 的影响 ELISA 结果显示, 与 LG 组比较, HG 组细胞培养基中 TNF-α、IL-1β、MCP-1 分泌水平均明显上调 (*P* < 0.05)。而与 HG 组比较, TLR4 基因敲除可使培养基中 TNF-α、IL-1β、MCP-1 分泌水平不同程度降低 (*P* < 0.05)。各指标组间差异有统计学意义 ( $F_{TNF-α} = 77.556$ ,  $F_{IL-1β} = 238.684$ ,  $F_{MCP-1} = 1117.901$ , *P* < 0.05)。见图 8。

### 3 讨论

DN 作为最常见的糖尿病微血管并发症, 具体发病机制尚不明确。研究<sup>[4]</sup>表明, 其发生发展可能与遗传背景、血流动力学改变、氧化应激、免疫以及炎症反应有关, 而炎症作为主要的影响因素, 近些年来受到越来越多的关注。巨噬细胞是主要的炎症细胞, 其在肾脏内浸润是 DN 炎症反应公认的特点, Nguyen et al<sup>[5]</sup>在糖尿病患者肾活检组织中发现肾小球和间质存在巨噬细胞浸润, 且浸润程度与后期肾功能下降率呈正相关性。糖尿病动物模型中肾组

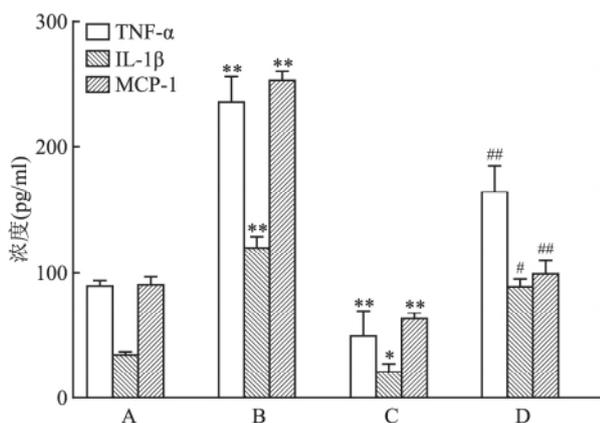


图8 ELISA法检测各组BMDM培养基中TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP-1的含量

A: LG组; B: HG组; C: TLR4<sup>-/-</sup>组; D: TLR4<sup>-/-</sup> + HG组; 与LG组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与HG组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

织巨噬细胞浸润较对照组明显增加<sup>[6]</sup>,而抑制巨噬细胞游走抑制因子的表达,可抑制巨噬细胞激活,减少炎症因子的释放,降低尿白蛋白排泄率,从而延缓DN的发展<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8]</sup>表明,高糖环境下可诱导巨噬细胞激活并向M1型分化,参与持续炎症反应和组织损伤。本实验应用高糖刺激BMDM,与LG组比较,HG组M1型巨噬细胞比例显著上升,同时炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、MCP-1表达上调,与上述研究一致,表明高糖诱导下巨噬细胞的活化、浸润参与DN的炎症反应过程,然而巨噬细胞参与DN发生发展分子水平的机制目前仍不明确。

Dasu et al<sup>[9]</sup>发现高糖刺激的人单个核细胞TLR2、TLR4表达升高,TLR4基因敲除后其下游信号蛋白及炎症因子表达明显降低。Toll样受体是一组可表达在免疫提呈细胞(如巨噬细胞、树突状细胞)及固有细胞表面的参与固有免疫反应的受体家族。研究<sup>[10-11]</sup>显示TLR的信号传导通路可启动炎症级联反应,导致肾脏的损伤和DN的进展。TLR4通过与内源性或外源性配体结合,启动MyD88依赖途径和非MyD88依赖途径,引起NF- $\kappa$ B信号通路的激活,最终释放促炎因子、趋化因子,导致炎症反应参与DN的发生<sup>[12]</sup>。Lin et al<sup>[13]</sup>发现TLR4信号通路可促进肾小管间质炎症反应,Mudaliar et al<sup>[14]</sup>也在高糖培养的内皮细胞中证实TLR4对炎症的调节作用,而关于TLR4是否作用于巨噬细胞引起炎症反应,从而参与DN的进程尚无报道。Orr et al<sup>[15]</sup>发现TLR4的缺乏可促进脂肪巨噬细胞的选择性激

活,且TLR4依赖的巨噬细胞激活可导致视网膜损伤<sup>[16]</sup>,因而实验假设TLR4缺乏可抑制巨噬细胞向M1型分化,通过抑制巨噬细胞浸润及其下游信号通路及产物的激活,减轻炎症状态。本实验显示高糖可促进TLR4、其下游信号通路MyD88、p-IRAK-1、Trif、p-IRF3、IRF3、NF- $\kappa$ B p-p65、NF- $\kappa$ B p65以及炎症因子IL-1 $\beta$ 、MCP-1、TNF- $\alpha$ 表达均显著增加,而敲除TLR4基因抑制巨噬细胞胞内NF- $\kappa$ B信号通路的激活从而缓解炎症反应。同时在TLR4和iNOS双标的激光共聚焦结果中敲除TLR4可同时使iNOS的荧光强度减弱,进一步证实TLR4可通过调节其下游MyD88依赖途径和非MyD88依赖途径抑制巨噬细胞活化,引发炎症反应。

综上所述,本实验初步验证了高糖可诱导BM-DM向M1型极化,TLR4参与巨噬细胞极化过程并促进炎症因子在高糖环境下的合成及释放;因此敲除TLR4基因可通过抑制巨噬细胞活化,减少炎症因子的产生,延缓DN的持续进程,为DN的预防和治疗提供新的研究方向。

#### 参考文献

- [1] 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 Chin Med 2012, 40(3): 521-36.
- [2] Wu C C, Sytwu H K, Lu K C, et al. Role of T cells in type 2 diabetic nephropathy [J]. Exp Diabetes Res 2011; 514738.
- [3] Jialal I, Kaur H. The Role of Toll-like receptors in diabetes induced inflammation: implications for vascular complications [J]. Curr Diab Rep 2012, 12(2): 172-9.
- [4] Awad A S, You H, Gao T, et al. Delayed treatment with a small pigment epithelium derived factor (PEDF) peptide prevents the progression of diabetic renal injury [J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0133777.
- [5] Nguyen D, Ping F, Mu W, et al. Macrophage accumulation in human progressive diabetic nephropathy [J]. Nephrology 2006, 11(3): 226-31.
- [6] Xu X X, Qi X M, Zhang W, et al. Effects of total glucosides of paeony on immune regulatory toll-like receptors TLR2 and 4 in the kidney from diabetic rats [J]. Phytomedicine, 2014, 21(6): 815-23.
- [7] Wang Z, Wei M, Wang M, et al. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor reduces diabetic nephropathy in type II diabetes mice [J]. Inflammation 2014, 37(6): 2020-9.
- [8] 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.
- [9] Dasu M R, Devaraj S, Zhao L, et al. High glucose induces toll-

- like receptor expression in human monocytes: mechanism of activation [J]. *Diabetes* 2008 57(11): 3090–8.
- [10] Lin M, Tang S C. Toll-like receptors: sensing and reacting to diabetic injury in the kidney [J]. *Nephrol Dial Transplant* 2014 29(4): 746–54.
- [11] Mudaliar H, Pollock C, Panchapakesan U. Role of Toll-like receptors in diabetic nephropathy [J]. *Clin Sci*, 2014, 126(10): 685–94.
- [12] Mudaliar H, Pollock C, Komala M G, et al. The role of Toll-like receptor proteins (TLR) 2 and 4 in mediating inflammation in proximal tubules [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 305(2): F143–54.
- [13] 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.
- [14] Mudaliar H, Pollock C, Ma J, et al. The role of TLR2 and 4-mediated inflammatory pathways in endothelial cells exposed to high glucose [J]. *PLoS One* 2014, 9(10): e108844.
- [15] Orr J S, Puglisi M J, Ellacott K L, et al. Toll-like receptor 4 deficiency promotes the alternative activation of adipose tissue macrophages [J]. *Diabetes* 2012 61(11): 2718–27.
- [16] Lee J J, Wang P W, Yang I H, et al. High-fat diet induces toll-like receptor 4-dependent macrophage/microglial cell activation and retinal impairment [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, 56(5): 3041–50.

## Role of Toll-like receptor 4( TLR4) signaling pathway in bone marrow derived macrophages activation induced by high glucose

Zhang Tingmin, Shao Yunxia, Xu Xingxin, et al

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

**Abstract Objective** To investigate the mechanism of high glucose and Toll-like receptor 4( TLR4) signaling pathway in macrophages for promoting the secretion of inflammatory cytokines through observing the effect of high glucose on the expression of TLR4 and its downstream signaling pathway in bone marrow derived macrophages( BM-DM). **Methods** The BMDM were separated from C57BL/6J and B10ScNNju( TLR4 knockout mice) and the purity of which was tested by flow cytometry. Different concentrations of high glucose and mannitol were selected to stimulate BMDM at different time points in order to optimize experimental condition. The BMDM were divided into normal control group( LG), high glucose group( HG), TLR4 knockout group( TLR4<sup>-/-</sup>) and high glucose stimulated TLR4 knockout BMDM group( TLR4<sup>-/-</sup> + HG). The M1 phenotype of macrophages was detected by flow cytometry and the co-expression of TLR4 and macrophage activation marker inducible nitric oxide synthase( iNOS) was observed by immunofluorescence. TNF- $\alpha$ , MCP-1 and IL-1 $\beta$  were assessed by RT-PCR and ELISA, together with the mRNA level of iNOS. Western blot was performed to analyze the protein levels of TLR4, MyD88, Trif, p-IRAK-1, p-IRF3, IRF3, NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B p-p65, iNOS. **Results** Compared with the LG group, high glucose could increase the percentage of M1 macrophages and the mRNA level of TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-1 $\beta$  and iNOS. In addition, the expression of TLR4, MyD88, Trif, p-IRAK-1, p-IRF3, IRF3, NF- $\kappa$ B p65, NF- $\kappa$ B p-p65, iNOS protein enhanced either. TLR4 knockout could eliminate the effect of macrophage activation induced by high glucose. **Conclusion** The study suggests that high glucose can promote BMDM to M1 phenotype polarization and TLR4 knockout can inhibit the M1 activation and the production of inflammatory cytokines induced by high glucose.

**Key words** BMDM; TLR4; high glucose; inflammation