

·基础研究·

TLR4 对人骨骼肌细胞炎症因子表达及胰岛素抵抗的影响 *

栗莉 张磊 侯祥红 曹瑞 季爱玲 王枫[△]

(第四军医大学营养与食品卫生学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究 TLR4 对脂多糖(LPS)及 Polymyxin B (PMB)作用下的人骨骼肌细胞的炎症因子表达的影响及其在细胞胰岛素抵抗中的作用。方法:通过脂多糖(LPS)及 Polymyxin B (PMB)干预骨骼肌细胞 24h,再用胰岛素刺激 1h 后,Real-time PCR 检测检测骨骼肌细胞 TLR4、MyD88、TNF- α mRNA 的表达;Western blot 检测 TLR4、Myd88 和 CRP 的表达;葡萄糖氧化酶法(GOD-POD 法)检测细胞培养液中葡萄糖浓度。结果:TLR4 高表达可以使炎症因子的表达增高,细胞培养液中的葡萄糖浓度增高;TLR4 低表达可使炎症因子的表达降低,细胞培养液中的葡萄糖浓度没有明显变化。结论:TLR4 调控了炎症因子的表达,继而可以引起胰岛素敏感性的改变,影响了胰岛素抵抗的发生。

关键词 TLR4;人骨骼肌细胞(HSKMC 3500);炎症因子;胰岛素抵抗

中图分类号 Q593 Q75 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)02-201-03

Effects of TLR4 on the Expression of Inflammatory Factors and Insulin Resistance in Human Skeletal Muscle Cells*

LI Li, ZHANG Lei, HOU Xiang-hong, CAO Rui, JI Ai-ling, WANG Feng[△]

(Department of Nutrition and Food Hygiene, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of TLR4 on the expression of inflammatory factors and insulin resistance in human skeletal muscle cells. **Methods:** Cultured human skeletal muscle cells were treated by LPS and PMB for 24h, then the cells were incubated in insulin for 1h. The expression of TLR4, Myd88, TNF- α was examined by Real-time PCR and the expression of TLR4, Myd88, CRP were detected by Western Blot; GOD-POD method was used to assess the concentration of glucose. **Results:** The activation of TLR4 increased the expression of inflammatory factors and the concentration of glucose; The blocking of TLR4 inhibit the expression of inflammatory factors, the concentration of glucose had no significantly changes. **Conclusion:** TLR4 regulates the expression of inflammatory factors, then could alter the sensibility of insulin.

Key words: TLR4; Human skeletal muscle cell; Inflammatory factors; Insulin resistance

Chinese Library Classification (CLC): Q593, Q75 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)02-201-03

前言

TLR4 属于一类膜识别受体的 TLR 家族,最早在果蝇中以基因的形式被发现,该基因对于果蝇胚胎发育过程中的背腹轴起到控制作用^[1]。TLR 防止病原微生物的感染,是先天免疫系统的一部分。TLR4 是人类发现的第一个 TLR 相关蛋白,它分布广泛,几乎存在于所有细胞表面,包括肝脏、脂肪组织、骨骼肌等^[2]。TLR4 在自然配体(LPS)作用下,有两条信号通路,一条是髓样分化因子 88 (MyD88) 依赖途径,TLR4 通过与 LPS 结合,信号途径转移到胞内,TLR4 的胞内区与 MyD88 的羧基端结合,激活了 IL-1 受体相关激酶,继而激活了 NF κ B 通路,引起炎症因子的基因表达;另一条是 MyD88 非依赖途径,通过 TRAM 和 TRIF 的调节来激活 IKK, NF κ B 和 IRF3 并导致干扰素 1 的产生,这个过程需要 TLR4 的内在化^[3]。

胰岛素抵抗就是周围组织对胰岛素的反应性降低,胰岛素的敏感性下降。炎症损害胰岛素敏感性大部分是通过模式识别受体的 TLR 家族的激活,尤其是 TLR4。许多研究证实小鼠中 TLR4 基因的损伤避免了肥胖诱导的炎症和胰岛素抵抗^[4-5,6-8]。随之又有证据表明 2 型糖尿病的肥胖病人的骨骼肌细胞中,TLR4 基因和蛋白表达是显著增高的^[9]。

本实验通过 TLR4 的激动剂 LPS 和 TLR4 的抑制剂 PMB 作用下的人骨骼肌细胞来观察 TLR4 表达对炎症因子表达的影响,以及对胰岛素敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

人骨骼肌细胞系 HSKMC 3500(ATCC 分装)(上海佛莱堡生物科技有限公司);1640 培养基(Hyclone);胎牛血清(杭州四季青

* 基金项目 国家自然科学基金资金项目(81072303)

作者简介 栗莉(1984-),女,硕士,分子营养学,Email: spring-lemon@163.com

[△]通讯作者 王枫, E-mail: wfeng651011@yahoo.com

(收稿日期 2011-09-30 接受日期 2011-10-23)

公司) ;LPS,胰岛素(Sigma); Polymymin B (Invivogen);兔抗人 TLR4 单克隆抗体、兔抗人 Myd88 的多克隆抗体(Abcam) ;兔抗人 CRP 单克隆抗体(Epitomics) ;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗、兔抗人 GAPDH 单克隆抗体及 BCA 蛋白定量试剂盒 (北京康为世纪生物科技公司);PageRuler 预染蛋白分子 (Fermentas);SyBR Premix、逆转录试剂盒(TakaRa) ;血糖检测试剂盒(上海复星)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人骨骼肌细胞在含 10%的胎牛血清的 1640 培养液中, 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养, 用 0.25%胰蛋白酶消化 ,传代。

1.2.2 LPS、PMB 以及胰岛素的配制 按说明书配制 ,将 LPS 配成 1mg/ml 的母液 ,PMB 配成 50mg/ml 的母液 ;胰岛素按说明书配制。

1.2.3 实验分组 取对数生长期细胞 ,配成单细胞悬液 ,以 1.0× 10⁴ ~1.0× 10⁵ 接种于培养皿中 ,常规培养至对数生长期分别以含 LPS(100ng/ml)、PMB(5μg/ml)的培养液干预 24h ,另外设置对照组(不加任何干预因素)。

1.2.4 Real-time PCR 测定 TLR4、MyD88、TNF-α mRNA 的表达 按说明书提取 RNA,首先弃培养液 ,用 1ml 4℃的 PBS 溶液洗 1 次 ,吸干 ,然后加入 1ml Trizol ,吹打混匀 ,室温静置 10min,加入 0.5ml 氯仿 ,震荡混匀 ,室温静置 15min, 4℃,12000g 离心 15min。将上层水相转移至新的离心管中 ,加入等体积的异丙醇 ,摇匀 ,室温静置 10min。4℃,12000g 离心 10min。弃上清 ,用 75%乙醇清洗 ,将 RNA 沉淀晾干 ,用 20μl DEPC 水去溶解。逆转录按试剂盒说明书进行。聚合链酶反应的反应条件为 :95℃ 预变性 1min ,随后 95℃ 15s ,58℃ 15s ,72℃ 45s ,共 40 个循环。引物由上海生工合成。见表 1。

表 1 引物
Table 1 Primer

Gene name	Forward primer	Reverse primer	Product size (bp)	Accession Number
TLR4	ttcttgctggctgcataaagta	aacaatcaccttgcgcttita	227	NM_138554
MyD88	ccatcaagtacaaggcaatgaa	ggcagacagatacacacacacc	172	NM_002468
TNF-α	tagcccatgtttagcaaac	atgaggtacagccctctgat	136	NM_000594

1.2.5 Western blot 测定 TLR4、MyD88、CRP 的表达 提取蛋白 ,按试剂盒说明书进行。蛋白上样后 80V 电泳 20min 后 ,变为 120V2h; 300mA 恒流湿转 1h 左右 ,转膜结束后 5%脱脂奶粉封闭 1h,加入一抗后 4℃冰箱孵育过夜。取出膜 ,用 TBST 洗膜 3 遍 ,每次 8min。然后加入二抗后室温孵育 1-2h。TBST 洗膜 3 遍 ,每次 8min。加入显影液显影 ,凝胶成像仪获取图像 ,进行灰度分析。

1.2.6 葡萄糖浓度的测定 除已设置的对照组、LPS 组、PMB 组外 ,另设一个空白对照组(只加胰岛素刺激) ,用 GOD-POD 法测定细胞培养液中葡萄糖浓度。

1.3 数据处理

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS16.0 统计软件进行 t 检验 , P<0.05 有显著性差异 ,具有统计学意义。

2 结果

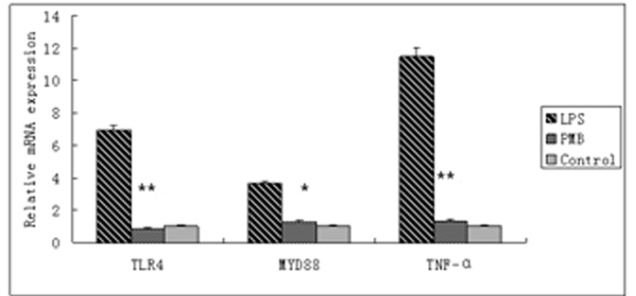


图 1 TLR4 对 MyD88、TNF-a mRNA 表达的影响

Fig.1 Effects of TLR4 on the expression of MyD88 and TNF-a mRNA
*P<0.05,**P<0.01

2.1 TLR4 对 MyD88、TNF-α mRNA 表达的影响

Real-time PCR 结果显示 LPS 组的 MyD88 和 TNF-α mRNA 的表达显著高于对照组 ;而 PMB 组两者的表达与对照组没有明显差异 ,因为 LPS 和 PMB 分别是 TLR4 的激活剂和抑制剂 ,这就表明 TLR4 mRNA 的表达增高时可以激活 MyD88 mRNA 和 TNF-α mRNA 的表达 ,TLR4 mRNA 的表达降低时抑制了 MyD88 和 TNF-α mRNA 的表达 ,也就是说 ,TLR4 基因的表达可以调节 MyD88 与 TNF-α 的基因表达水平(见图 1)。

2.2 TLR4 对 MyD88、CRP 表达的影响

Western blot 法检测 TLR4 对人骨骼肌细胞的 MyD88、CRP 表达的影响。结果如图 2 所示 ,LPS (TLR4 高表达) 组的 MyD88、CRP 表达显著高于 PMB(TLR4 低表达)组 ,这就说明了 TLR4 蛋白的表达可以调节 MyD88 的蛋白表达与 CRP 的表达。

2.3 TLR4 对细胞培养液中葡萄糖浓度的影响

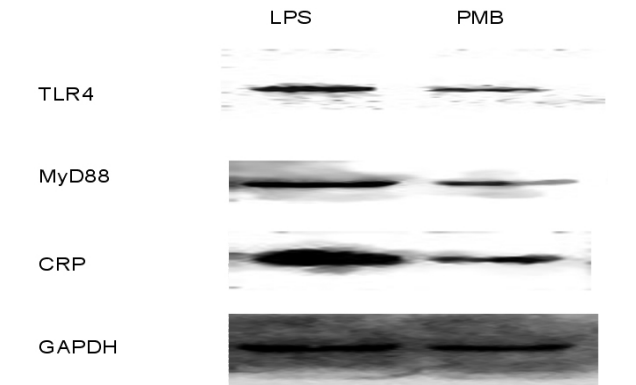


图 2 TLR4 对 MyD88、CRP 表达的影响

Fig.2 Effects of TLR4 on the expression of MyD88 and CRP

空白对照组(Blank control)培养液中的葡萄糖浓度明显高于加入了骨骼肌细胞的对照组(Control)培养液中葡萄糖的浓度,可见骨骼肌细胞对葡萄糖的摄取与利用程度很高,而TLR4高表达(加LPS)组的细胞培养液中葡萄糖浓度高于对照组,且

有显著性差异,说明细胞对葡萄糖的利用程度降低了,TLR4低表达(加PMB)组与对照组之间没有差异,这就表明了TLR4的表达可以影响细胞对葡萄糖的摄取(表2)。

表 2 细胞培养液中的葡萄糖浓度 ($\bar{x} \pm s$, n=6)
Tab.2 The concentration of glucose in cell culture fluid ($\bar{x} \pm s$, n=6)

Group	The concentration of glucose in cell culture fluid
Blank control	2.63± 0.007
Control	0.101± 0.005
LPS	0.97± 0.009 **
PMB	0.14± 0.005

Note: **P<0.01

3 讨论

近年来随着人民生活水平的改善,代谢性疾病已成为影响我们生活质量的主要疾病。而代谢性疾病的发生均与长期能量摄入正平衡引起的肥胖有关。肥胖实际上是一种低度炎症反应,在肥胖导致其它代谢性疾病发生的过程中,有一个非常重要的环节就是全身各个组织胰岛素抵抗的形成。慢性炎症通过直接干扰胰岛素信号通路重要组成部分的正常功能,从而抑制了胰岛素敏感性^[10,11]。TLR4在先天免疫系统中发挥了重要的作用^[12]。TLR4是细胞表面受体,它能通过诱导信号级联激酶和转录因子的激活对病原体产生先天免疫应答。这些级联导致了促炎症因子、趋化因子、类花生酸和活性氧的产生及所有先天免疫的效应器。值得注意的是,TLR4表达于许多胰岛素靶组织的细胞表面,因此,TLR4的激活可以直接通过促炎症激酶和活性氧的激活,和间接地通过细胞因子信号级联和全身的促炎症因子,胰岛素减敏因子的释放,抑制胰岛素的作用^[13]。有研究证明TLR4信号转导可能也成为骨骼肌慢性炎症和胰岛素抵抗发展的基础^[14]。

本实验利用LPS使TLR4高表达,发现了炎症因子的表达也随之增高了;再加入PMB,使TLR4低表达,炎症因子的表达明显降低。与此同时检测细胞培养液中的葡萄糖浓度,LPS组明显高于对照组,骨骼肌细胞对葡萄糖的摄取减少了,也就是说TLR4高表达抑制了骨骼肌细胞胰岛素刺激状态下的葡萄糖转运,因此可以认为胰岛素的敏感性降低了,最终会产生胰岛素抵抗,而PMB组葡萄糖浓度与对照组没有差别,可以认为TLR4低表达时,对骨骼肌细胞胰岛素刺激状态下的葡萄糖转运没有影响,胰岛素敏感性增强^[15]。用Western blot检测TLR4,MyD88,CRP表达时,对照组中三者的表达在LPS组与PMB组是没有明显差异的,这与Olga等^[16]的报道一致,故没有表示出来。因此,可以认为,TLR4调控了炎症因子的表达,引起胰岛素敏感性的改变,影响了胰岛素抵抗的发生。但其具体作用机制及方式尚需要进一步研究证实。根据本实验我们发现可以通过减少TLR4的表达或是抑制TLR4的信号通路,来增强有胰岛素抵抗个体的胰岛素敏感性,这为代谢性疾病的治疗提供一个新方向。

参考文献(References)

[1] Medzhitov R, Presto HP, Janeway CA . A human homologue of the drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity[J].Nature,1997,388(3):394-397

[2] Janeway CA,Medzhitov R. Innate immune recognition [J]. Annu Rev Immunol,2002,20(5):197-216

[3] Jin MS, Lee JO. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes[J].Immunity, 2008,29(2):182-191

[4] Poggi M, Bastelica D, Gual P,et al. C3H/HeJmice carrying a Toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet[J]. Diabetologia,2007, 50(6):1267-1276

[5] Saberi M, Woods NB, de Luca C, et al. Hematopoietic cell-speci?c deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice[J].Cell Metabolism,2009,10(5): 419-429

[6] Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, et al.TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance [J]. Journal of Clinical Investigation, 2006,116(11):3015-3025

[7] Suganami T, Mieda T, Itoh M, et al. Ogawa.Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 354,(1):45-49

[8] Tsukumo DML, Carvalho FMA, Carnevali JBC, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance[J].Diabetes,2007,56(8):1986-1998

[9] Reyna SM, Ghosh S, Tantiwong P,et al. Elevated Toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin resistant subjects[J]. Diabetes, 2008, 57(10):2595-2602

[10] Hotamisligil GS, Erbay E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases [J]. Nature Reviews Immunology,2008, 8(12): 923-934

[11] Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation [J]. Journal of Clinical Investigation, 2008,118(9):2992-3002

[12] Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009,388(4):621-625

(下转第 214 页)

- [17] Sorenson RC, Primo-Parmo SL, CamPer SA, et al. The Genetic mapping and Gene Structure of Mouse Paraaxonase/Arylesterase [J]. Genomics, 1995, 30(3): 431-438
- [18] Horke S, Witte I, Wilgenbus P, et al. Paraaxonase-2 Reduces Oxidative Stress in Vascular Cells and Decreases Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Caspase Activation [J]. Circulation, 2007, 115 (15): 2055-2064
- [19] Hegele RA, Connelly PW, Scherer SW, et al. Paraaxonase-2 Gene (PON2)G148 Variant Associated with Elevated Fasting Plasma Glucose in Noninsulin Dependent Diabetes Mellitus[J]. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1997, 82(10): 3373-3377
- [20] Ferretti G, Bacchetti T, Busni D, et al. Protective Effect of Paraaxonase Activity in High-Density Lipoproteins against Erythrocyte Membranes Peroxidation: A Comparison between Healthy Subjects and Type 1 Diabetic Patients [J]. Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(6): 2957-2962
- [21] Robertson KS, Hawe E, Miller GJ, et al. Talmud PJ, Humphries SE. Human paraaxonase gene cluster polymorphisms as predictors of coronary heart disease risk in the prospective Northwick Park Heart Study II [J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1639(3): 203-212
- [22] Pinizzotto M, Castillo E, Fiaux M, et al. Paraaxonase2 polymorphisms are associated with nephropathy in Type II diabetes [J]. Diabetologia, 2001, 44: 104-107
- [23] Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, et al. Low paraaxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy[J]. Clinical Science, 2000, 98: 355-363
- [24] Sanghera DK, Aston CE, Saha N, et al. DNA Polymorphisms in Two Paraaxonase Genes (PON1 and PON2) Are Associated with the Risk of Coronary Heart Disease[J]. Am. J. Hum. Genet, 1998, 62: 36-44
- [25] Leus FR, Zwart M, Kastelein JP, et al. PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients [J]. Atherosclerosis, 2001, 154 (3): 641-649
- [26] 邵海琴,周新,李霞,等. PON2 基因 Cys-Ser311 多态性与冠心病的关系[J].中国老年学杂志,2004,24(1):30-31.
- Shao Hai-qin, Zhou Xin, Li Xia, et al. Association of PON2 gene Cys-Ser311 polymorphism with coronary heart disease [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2004, 24(1): 30-31

(上接第 203 页)

- [13] Jane JK, Dorothy DS. TLR4 and insulin resistance[J]. Gastroenterology Research and Practice,2010, 2010(8):1-11
- [14] Wei Y, Chen K, Whaley-Connell A, et al. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species [J]. American Journal of Physiology, 2008,294(3):673-680
- [15] 穆颖,季爱玲,刘寒强等. 原代培养骨骼肌细胞胰岛素抵抗模型的建立[J].现代生物医学进展, 2008, 8(3) :433-436
- Mu Ying, Ji Ai-Ling,Liu Han-qiang, et al. Establishment of Insulin Resistance Model in Primary Culture Skeletal Muscle Cell [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2008,8(3):433-436
- [16] Olga IV, Kahraman T, Tamara TT, et al. Inducible Toll-like Receptor and NF- κ B Regulatory Pathway Expression in Human Adipose Tissue[J].Obesity, 2008,16(5):932-937