

脂多糖对 2 型糖尿病肾病患者单核细胞 TLR4 水平及 NF- κ B, Notch1 表达的影响

杨孟雪^{1,2}, 甘华¹, 沈清¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院肾内科, 重庆 400016; 2. 遵义医学院附属医院内分泌科, 贵州 遵义 563003)

[摘要] 目的: 探讨 2 型糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 患者外周血单核细胞 Toll 样受体 4 (toll-like receptor, TLR4) 的表达及脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 对其的影响, 以了解炎症性免疫反应在 DN 中的可能作用机制。**方法:** 收集 30 例 2 型 DN 尿毒症患者, 10 例早期 2 型 DN 患者和 20 例健康志愿者。采用外周血流式细胞术检测单核细胞 TLR4 的表达, 并分离其外周血单个核细胞 (PBMC), 用 LPS 干预 24 h, 收集 PBMC 和上清液。分别采用 Western 印迹检测 PBMC 内 TLR4, NF- κ B p65 和 Notch1 蛋白表达; 免疫荧光检测 NF- κ B p65 蛋白表达。ELISA 法检测外周血清及 LPS 干预后细胞上清液 IL-6 浓度。免疫比浊法检测血清 CRP 水平。**结果:** 2 型 DN 患者外周血单核细胞的 TLR4 荧光强度值、IL-6 和 CRP 水平均高于正常对照组 [TLR4 荧光强度值: 2 型 DN 尿毒症患者 2.8 ± 0.9 、早期 2 型 DN 患者 3.4 ± 0.7 、正常对照组 1.6 ± 0.7 ; IL-6: 2 型 DN 尿毒症患者 (84.8 ± 20.7) pg/mL、早期 2 型 DN 患者 (63.20 ± 14.4) pg/mL、正常对照组 (11.0 ± 2.0) pg/mL; CRP: 2 型 DN 尿毒症患者 (5.4 ± 2.8) mg/L; 早期 2 型 DN 患者 (3.7 ± 1.7) mg/L、正常对照组 (1.7 ± 0.7) mg/L, 均 $P < 0.01$], LPS 干预后 2 型 DN 患者 PBMC 的 TLR4, NF- κ B P65 蛋白表达和 IL-6 水平明显高于正常对照组 ($P < 0.05$), 早期 2 型 DN 患者 PBMC 以上指标水平均高于 DN 尿毒症患者, 且 2 型 DN 患者 NF- κ B p65 的表达存在核转移现象, 但与正常对照组比较 Notch1 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论:** DN 患者体内可能存在单核细胞功能紊乱, 这种功能紊乱可能与 TLR4/NF- κ B 信号通路的激活有关, 与 Notch1 信号通路无关。

[关键词] 2 型糖尿病; 糖尿病肾病; 单核细胞; Toll 样受体 4; NF- κ B

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.06.007

Effect of LPS on the level of TLR4 and on the expression of NF- κ B and Notch1 in monocytes from patients with type 2 diabetic nephropathy

YANG Mengxue^{1,2}, GAN Hua¹, SHEN Qing¹

(1. Department of Nephrology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016;
2. Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi Guizhou 563003, China)

ABSTRACT

Objective: To characterize the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) in monocytes of diabetic nephropathy (DN) patients and the response of TLR4 to lipopolysaccharide (LPS), and, further, to explore the potential effects of inflammatory immune response in DN.

收稿日期 (Date of reception): 2011-12-18

作者简介 (Biography): 杨孟雪, 博士研究生, 主要从事糖尿病及其并发症方面的研究。

通信作者 (Corresponding author): 甘华, Email: ganhuals@126.com

基金项目 (Foundation item): 重庆市卫生局重点项目 (2010-1-16)。This work was supported by the Key Project of Chongqing Municipal Health Bureau, P. R. China (2010-1-16).

Methods: Thirty DN patients with uremia, ten early-type 2 DN patients, and twenty healthy volunteers were enrolled for the determination of TLR4 expression in monocytes by using peripheral blood flow cytometry. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated and subjected to 1 μ g/mL LPS for 24 h. Monocytes were collected to assay NF- κ B p65 and Notch1 expression by Western blot, with immunofluorescence detection. Serum and supernatants were sampled for the determination of interleukin-6 (IL-6) concentration by using ELISA. Serum C-reactive protein (CRP) level was determined by using the immunoturbidimetry.

Results: Compared with the normal control, type 2 DN uremic patients had a significantly higher TLR4 fluorescence-blot intensities (FI), and serum CRP and IL-6 levels [TLR4 FI: DN uremia patients 2.8 ± 0.9 ; early type 2 DN patients 3.4 ± 0.7 ; healthy subjects 1.6 ± 0.7 . IL-6 concentration: DN uremia patients (84.8 ± 20.7) pg/mL; early type 2 DN patients (63.20 ± 14.4) pg/mL; healthy subjects (11.0 ± 2.0) pg/mL. CRP concentration: DN uremia patients (5.4 ± 2.8) mg/L; early type 2 DN patients (3.7 ± 1.7) mg/L; healthy subjects (1.7 ± 0.7) mg/L. $P < 0.01$ for any DN-group vs control]. In early type 2 DN patients, following exposure to LPS, PBMCs showed a significant up-regulation in TLR4 and NF- κ B p65 expression and a remarked increase in serum IL-6 level (all $P < 0.05$), and NF- κ B p65 transfer to the nucleus is enhanced. Notch1 protein expression was not significantly altered in any group.

Conclusion: A disturbance in proinflammatory CD14⁺CD16⁺ monocytes occurs in type 2 DN patients. Such immunological dysfunction may be related to activation in NF- κ B/TLR4 signaling pathways, and have nothing to do with the Notch1 signaling pathway.

KEY WORDS

type 2 diabetes; diabetic nephropathy; monocyte; Toll-like receptor 4(TLR4); NF- κ B

正常人 Toll 样受体 (toll-like receptor, TLR)4 表达水平很低,但在配体脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 积聚的情况下,TLR4 表达明显上调,前期研究^[1]已证实糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 时有内毒素滞留。2型糖尿病 (T2DM) 患者^[2-4]和小鼠^[5-7]体内存在肠道屏障功能障碍,易形成肠源性内毒素血症。LPS 为炎症刺激物,可激活单核/巨噬细胞,促使细胞因子的表达,既往科研工作中常以 LPS 作为内毒素的替代品,它是 TLR4 的配体,但 DN 患者外周血单个核细胞 (PBMC) 表达 TLR4 水平如何及其对 LPS 的反应有何变化尚未明确。白细胞介素 (IL)-6 是由单核巨噬细胞产生的细胞因子,低浓度时主要调节炎症反应及促进组织修复,而高浓度时则引起连锁和放大反应,致使脏器结构和功能受损。TLR4/NF- κ B 及 Notch1 是与炎症密切相关的 2 条信号通路。本研究旨在探讨 2 型 DN 患者外周血单核细胞 TLR4 的表达及 TLR4 配体 LPS 对其单核细胞的影响,以了解炎症性免疫反应在 DN 中的可能作用机制。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集 2009 年 5 月至 2011 年 5 月重庆医科大学附属第一医院门诊健康志愿者 (正常对照组) 20 例,其中男性 10 例,女性 10 例,年龄 36~58 (49 ± 6) 岁,经检查体格健康,并排除糖尿病、高血压、冠心病及肾病等内分泌代谢性疾病病史,均无糖尿病家族史。同期收集我院肾内科及内分泌科 2 型 DN 尿毒症患者 30 例,其中男性 16 例,女性 14 例,年龄 36~65 (53 ± 7) 岁,病程 1~7 (4.5 ± 1.6) 年,同期收集早期 2 型 DN 患者 10 例,其中男性 6 例,女性 4 例,年龄 45~67 (54 ± 7) 岁,病程 1~7 (4.4 ± 1.9) 年。糖尿病诊断均符合 1999 年世界卫生组织 (WHO) 糖尿病诊断和分型标准,且谷氨酸脱羧酶抗体 (GADA) 水平 < 1.0 , 25 羟维生素 D3 [25(OH)D3] 为 21~29 ng/mL,空腹血糖低于 7.0 mmol/L, HbA1c 低于 6.5% 者予以纳入。2 型 DN 患者诊断均符合 2007 年美国糖尿病协会 (ADA) 的 DN 诊断标准。2 型 DN 尿毒症患者符合慢性肾衰竭 (尿毒症期) 的诊断标准: 血肌酐 $> 707 \mu\text{mol/L}$ 或内生肌酐清除率 $< 10 \text{ mL/min}$,且病情稳定,未接受透析

治疗(3组入选者基本情况见表1)。排除标准:1型及继发性糖尿病;急性感染性疾病;心、肝功能不良;近3个月发生糖尿病急性并发症及感染;妊娠、哺乳;其他肾病、结缔组织病和自身免疫性疾病;肿瘤、心脑血管意外、哮喘、使用对研究有影响的药物等。所有入选者为汉族彼此间无亲缘关系的人群。本研究获得患者本人同意及重庆医科大学

伦理委员会批准。

3组患者年龄、性别、体质指数、HbA1c、空腹血糖、血脂、血压和外周血白细胞和单核细胞绝对计数、GADA差异均无统计学意义($P > 0.05$);DN患者血肌酐、尿素氮、24h尿白蛋白排出量(UALB)、IL-6及hsCRP水平高于正常对照人群,尤以DN尿毒症患者升高明显($P < 0.01$,表1)。

表1 3组一般情况比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Baseline clinical characteristics of the subjects ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	男/女	年龄/岁	病程/年	体质指数/(kg/m ²)	糖化血红蛋白/%	空腹血糖/(mmol/L)	收缩压/mmHg
正常对照组	20	10/10	49 ± 6		23.1 ± 1.9	5.6 ± 0.5	5.5 ± 0.9	134 ± 6
早期DN组	10	6/4	54 ± 7	4.4 ± 1.9	22.0 ± 2.2	5.8 ± 0.4	6.1 ± 0.8	131 ± 7
DN尿毒症组	30	16/14	53 ± 7	4.5 ± 1.6	23.6 ± 4.2	5.7 ± 0.6	5.8 ± 0.7	140 ± 9 [*]
P		0.845	0.069		0.37	0.424	0.115	0.006

组别	舒张压/(mmHg)	甘油三酯/(mmol/L)	总胆固醇/(mmol/L)	高密度脂蛋白/(mmol/L)	低密度脂蛋白/(mmol/L)	血尿素氮/(mmol/L)	血肌酐/(μmol/L)	血白细胞/(×10 ⁹ /L)
正常对照组	76 ± 9	1.6 ± 0.5	4.2 ± 0.6	2.6 ± 0.6	1.2 ± 0.5	5.6 ± 0.7	69.0 ± 9.1	5.9 ± 0.7
早期DN组	79 ± 5	1.5 ± 0.7	4.4 ± 0.9	2.2 ± 0.6 [′]	1.1 ± 0.3	5.8 ± 1.3	65.5 ± 13.7	5.9 ± 1.9
DN尿毒症组	80 ± 10	1.5 ± 0.5	4.6 ± 0.9	2.6 ± 0.6	1.1 ± 0.5	17.6 ± 4.3 ^{***}	740.3 ± 130.4 ^{***}	5.8 ± 1.0
P	0.294	0.757	0.063	0.094	0.868	< 0.01	< 0.01	0.9

组别	中性粒细胞/(×10 ⁹ /L)	单核细胞/(×10 ⁹ /L)	24h尿白蛋白排出量/(mg/L)	25羟维生素D3/(ng/mL)	谷氨酸脱羧酶抗体	C反应蛋白/(mg/L)	IL-6/(pg/mL)
正常对照组	3.0 ± 0.4	0.3 ± 0.06	17.2 ± 2.6	45.1 ± 7.2	0.3 ± 0.1	1.7 ± 0.7	11.0 ± 2.0
早期DN组	2.8 ± 0.7	0.3 ± 0.1	172.0 ± 53.9 ^{**}	25.3 ± 2.9 ^{**}	0.4 ± 0.1	3.7 ± 1.7 ^{**}	63.2 ± 14.4 ^{**}
DN尿毒症组	3.3 ± 0.6	0.3 ± 0.07	1719.3 ± 373.1 ^{***}	23.9 ± 2.6 ^{**}	0.4 ± 0.1	5.4 ± 2.8 ^{***}	84.8 ± 20.7 ^{***}
P	0.063	0.769	< 0.01	< 0.01	0.218	< 0.01	< 0.01

与正常对照组比较, [′] $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与早期DN组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{***} $P < 0.01$ 。

1.2 主要试剂与材料

RPMI-1640培养基、胎牛血清均购自美国Gibco公司,人淋巴细胞分离液及脂多糖(LPS)均购自美国Sigma公司。PE标记的抗人CD14和FITC标记的抗人TLR4抗体均购自英国AbD Serotec公司,兔多克隆NF-κB p65抗体和羊多克隆Notch1抗体均购自美国Santa Cruz公司。兔抗小鼠和羊抗小鼠β-actin抗体均购自北京四正柏公司。山羊抗兔和兔抗山羊二抗均购自北京中杉金桥公司,IL-6的ELISA检测试剂盒由美国Biosource公司提供。GADA测定:采用美国BioMerica公司试剂盒,用酶联免疫法测定。HbA1c测定:采用化学发光法,应用Diastar糖化血红蛋白分析仪检测。血常规应用XE-2100全自动分析仪检测。空腹血糖、血脂、肾功能及hsCRP的测定:空腹抽取静脉血,采用奥林帕斯全自动生化分析仪检测。24hUALB采用放射免疫法测定。

1.3 方法

1.3.1 血标本的采集及PBMC的分离和培养

采集研究对象晨起空腹静脉血,患者取舒适体位,取肘前静脉无菌采血20mL后立即将3mL标本送我院检验科检测血常规、肝肾功能、血脂等指标,1.5mL血标本室温静置30min后,血液不抗凝,3000r/min,低温离心15min,取上层血清,置-80℃冰箱保存待用。剩余静脉血置于肝素抗凝的试管中,用于流式检测及PBMC的分离。Ficoll淋巴细胞分离液密度梯度离心分离出PBMC,采用无血清培养液洗涤两次,加入完全RPMI-1640培养基(含10%的热失活胎牛血清,青霉素及链霉素各1000U/mL)制成细胞悬液,混匀后进行细胞计数及台盼蓝鉴定细胞活力(至少大于95%)。调整细胞浓度为 2×10^5 个/mL接种至24孔板,每孔总体积1mL,然后置于37℃、5%CO₂孵箱中培养,用于后续实验。

1.3.2 实验分组

将分离的PBMC接种培养于24孔板中,培养液为RPMI-1640培养基(含10%的热失活胎牛血清,青霉素及链霉素各100 U/mL)。培养24 h后每组均加入终浓度为1 μ g/mL的LPS干预24 h(每个样本做2个复孔)。LPS干预24 h后收集PBMC和培养液。LPS的浓度选择参考文献[8-10]。

1.3.3 流式细胞术检测单核细胞TLR4的表达

取EDTA抗凝的外周全血150 μ L加入流式管底,预留1管作为空白对照管,不加荧光抗体,其余各管分别加入相应的抗体(CD14-PE和TLR4-FITC各10 μ L),振荡混匀后避光,室温孵育30 min;在上述液体内分别加入红细胞裂解液1 mL,混匀10 min;然后每管中加入1 mL PBS+1%BSA液,置之于离心机中,以1600 r/min离心5 min,倒弃上清液,重复洗涤细胞2次;每管内加入多聚甲醛固定10 min;流式细胞仪上检测TLR4的荧光强度值。同时使用同型对照确保抗体的特异性。

1.3.4 Western印迹检测NF- κ B p65和Notch1的蛋白表达

冰上裂解细胞,4 $^{\circ}$ C 12000 r/min离心5 min,留取上清用BCA法测定蛋白浓度。总蛋白上样于12% SDS-PAGE电泳分离,电转移至PVDF膜上,以含5%脱脂奶粉的TBST封闭90 min后,分别加入兔抗人NF- κ B p65抗体(1:400)和羊抗人Notch1抗体(1:400),兔抗小鼠和羊抗小鼠 β -actin抗体(1:5000),4 $^{\circ}$ C过夜,洗膜,分别加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和兔抗山羊IgG(1:1500),室温孵育2 h,洗膜,显影,定影,扫描仪成像,自动成像系统分析。

1.3.5 荧光显微镜下观察单个核细胞NF- κ B p65蛋白表达

干预前和干预结束后,PBS清洗细胞,4%多聚甲醛固定,牛血清封闭,0.3% TritonX-100透膜处理5 min,1:200一抗(兔抗人NF- κ B p65抗体)40 $^{\circ}$ C孵育过夜,1:100荧光二抗(FITC标记的山羊抗兔IgG)孵育1 h,DAPI孵育10 min,荧光显微镜摄像。

1.3.6 细胞因子检测

ELISA法检测血清和上清液IL-6的水平,按照IL-6 ELISA试剂盒(购自美国Biosource公司)操作说明进行操作,测定外周血及经过LPS干预后,单核细胞上清液中IL-6的水平,450 nm波长测量各孔的光密度值,IL-6含量计算结果以pg/mL表示。试剂

的批内分析和批间分析变异系数均<10%,所有样本设3个复孔。

1.4 统计学处理

所有资料使用SPSS13.0统计软件进行数据处理。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两个连续变量的关系作Spearman's相关分析;3组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 单核细胞表面TLR4表达的流式分析结果

早期DN和DN尿毒症组的单核细胞TLR4的荧光强度值较正常对照组显著升高(DN尿毒症组 2.8 ± 0.9 ;早期DN组 3.4 ± 0.7 ;正常对照组 1.6 ± 0.7 , $P<0.01$),且DN尿毒症患者高于早期DN患者(图1)。

2.2 LPS干预后PBMC的TLR4, NF- κ B p65, Notch1的Western印迹结果

经过LPS干预24 h后,2型DN患者PBMC的TLR4和NF- κ B p65表达均高于正常对照组,且早期DN患者明显高于DN尿毒症患者,差异具有统计学意义($P<0.05$,图2)。但Notch1蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 LPS干预后单核细胞中NF- κ B p65免疫荧光检测结果

NF- κ B p65蛋白正常主要定位于PBMC胞质,胞核无表达。从图3可看出LPS干预前DN患者PBMC胞质有少量NF- κ B p65表达,细胞核内不表达NF- κ B p65(图3A),经过LPS干预后DN患者PBMC胞质和胞核内均有NF- κ B p65的表达,且表达量较前明显增强,提示NF- κ B p65处于激活状态,存在核转移现象(图3B),但正常对照组LPS干预前后差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 LPS干预后PBMC上清液的IL-6水平

经过LPS干预24 h后, DN患者PBMC分泌的IL-6水平较正常对照组[(47.27 ± 18.92) pg/mL]明显升高,且DN早期患者明显高于DN尿毒症患者,差异具有统计学意义[143.30 ± 47.22] pg/mL vs (79.79 ± 22.15) pg/mL, $P<0.01$]。

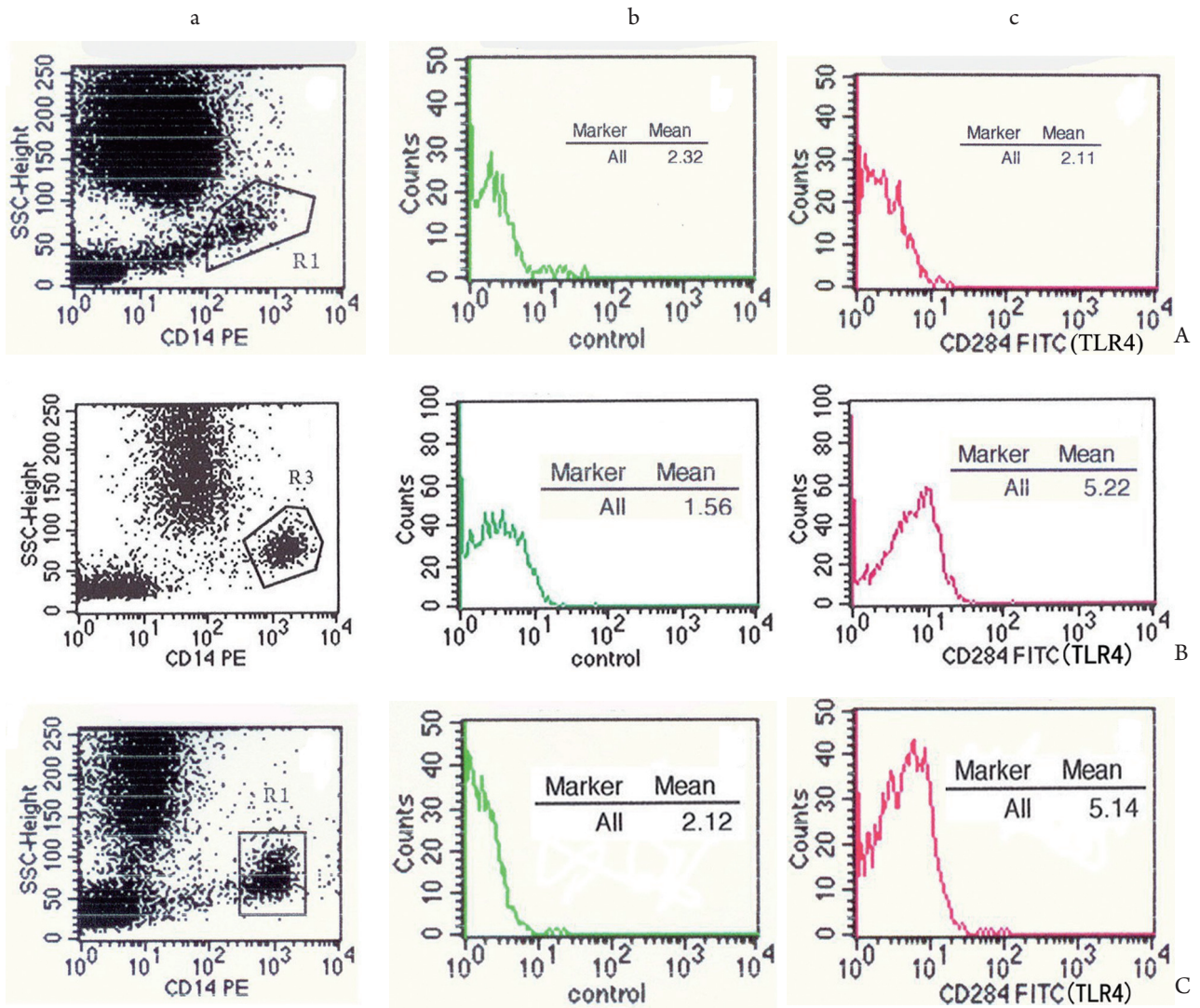


图 1 单核细胞表面 TLR4 表达的流式细胞图。A: 正常对照组; B: 早期 DN 组; C: DN 尿毒症组。a: 在流式细胞仪上, 根据颗粒度 (SSC) 以及细胞大小 (FSC), 以方框圈定待测的单核细胞; b: 匹配的同型对照曲线; c: CD14 阳性单核细胞 TLR4 的表达曲线。

Figure 1 Flow cytometry chart of TLR4 expression in monocytes. A: Healthy control group; B: Early-type 2 diabetes (T2DM) group; C: Diabetic nephropathy (DN) uremic group. a: Identification of monocytes displayed in a representative FSC/SSC dot plot; b: Curve of isotype matched control antibody; c: Curve of TLR4 expression in CD14-positive monocytes.

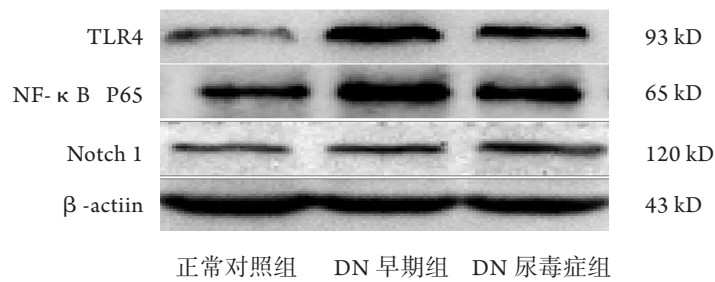


图 2 LPS 干预后 NF-κB p65 和 Notch1 蛋白的表达。

Figure 2 Effect of LPS on expression of monocytic NF-κB p65 and Notch1 protein.

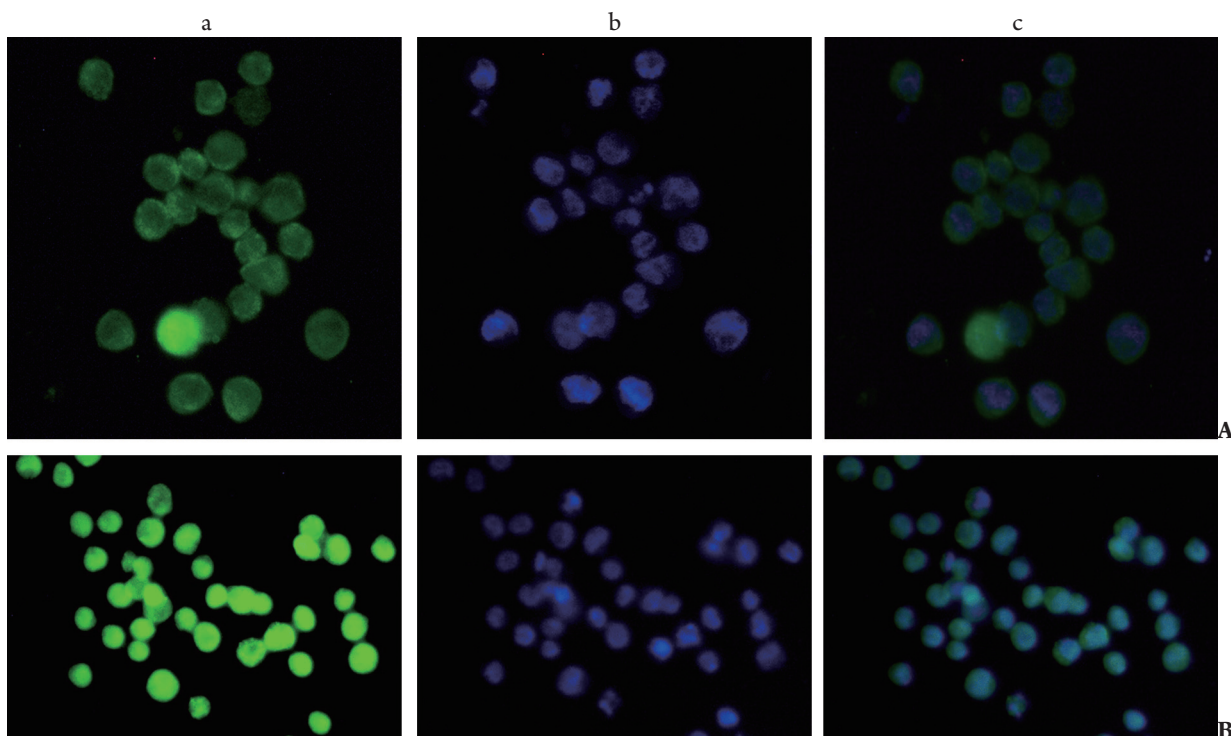


图 3 免疫荧光检测 LPS 对 PBMC 中 NF- κ B p65 的影响 ($\times 200$)。A: LPS 干预前 DN 组 NF- κ B p65 表达; B: LPS 干预后 DN 组 NF- κ B p65 表达。a: NF- κ B p65 蛋白表达, FITC 标记呈绿色; b: DAPI 染核呈蓝色; c: Merge 图片。

Figure 3 Effects of LPS on NF- κ B p65 protein expression in PBMC by immunofluorescence microscopy ($\times 200$). A: DN group before LPS-treated; B: DN group after LPS -treated. a: NF- κ B p65(FITC, green); b: DAPI dyes the nucleus(blue); c: Merge picture.

3 讨论

在临床工作中笔者发现有一部分 DN 患者血糖、血压、血脂控制得很好但仍阻挡不了 DN 的发生发展。所以, DN 的发病机制除了与氧化应激、肾素-血管紧张素系统、糖脂代谢紊乱等因素有关外,可能还与其他因素有关,如:遗传变异、单核/巨噬细胞的促炎作用、慢性微炎症状态、TLR 途径、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)水平增高等。前期研究^[1]发现 T2DM 和 2 型 DN 尿毒症患者体内内毒素水平较正常对照人群明显升高,这与近年来的研究^[2-4]结果一致。在这种内毒素微环境中生长的单核/巨噬可能存在功能障碍。在 DM 的相关体外研究^[11-15]中发现:来自 T1DM 和 T2DM 的单核细胞具有前炎症特性,表达炎症因子的能力增强。本研究同样也发现 DN 患者血清 IL-6 和 CRP 水平均高于正常对照组,且与 PBMC 的 TLR4 表达呈正相关($r=0.442$ 和 0.445 ; 均 $P<0.01$),表明 TLR4 的异常表达可能与 DN 的微炎症状态相关。这与前人研究结果^[16-17]类似。

既往研究表明:在 T1DM 和 T2DM 并发糖尿病视网膜病变(DR)患者体内单核细胞 TLR4 的表达是增高的,DR 的发展可能与炎症机制有关^[18]。DR 和

DN 同属于 DM 的微血管病变,存在共同的发病机制。在关于 DM 并发症的研究中还发现:TLR4 表达的上调参与了动脉粥样硬化、DM 周围神经病变及 DM 眼底病变的发生^[19-21]。

尿毒症患者免疫功能通常处于低反应性状态,有文献^[22]报道患者 PBMC 对 LPS 刺激反应性低下,也即是说尿毒症患者 PBMC 受到 LPS 刺激后产生细胞因子的能力减弱。而本观察结果似乎与此相反。结合 PBMC 的 TLR4 和 IL-6 水平,笔者发现 DN 患者不但 TLR4 蛋白表达及分泌的炎症细胞因子(IL-6)水平升高,且患者 PBMC 对 TLRs 配体 LPS 的刺激敏感性增加,表现为 LPS 干预后早期 DN 和 DN 尿毒症患者 PBMC 的 TLR4 和 NF- κ B p65 蛋白表达和分泌 IL-6 水平较正常对照组显著升高,但 DN 尿毒症患者 PBMC 对 LPS 刺激反应性低于早期 DN 患者,且与 LPS 干预前研究对象的 PBMC 的 TLR4 蛋白表达趋势吻合,说明随着病情的加重 DN 尿毒症患者的免疫功能可能也有下降趋势,只是所处阶段不同,程度不同。从另一个角度来看,其与之前的文献^[13]并不矛盾,可能与以下几方面原因有关:1)病程短,入选的 2 型 DN 尿毒症患者的病程仅 4 年左右;2)合并了 DM,DM 患者易合并大血管的动脉粥样硬化;

3) 病情相对稳定, Ando 等^[22]报道的尿毒症患者多数病情较重。

TLR4/ NF- κ B 及 Notch1 是与炎症密切相关的 2 条信号通路。单核细胞表达 TLR4 和 NF- κ B 及 Notch1, 但在 DN 患者单核细胞受到炎症刺激时对 Notch 信号通路有少影响少见报道, 且目前对于 TLR4/ NF- κ B 与 DN 关系的直接研究也相对较少, 对 TLR4/ NF- κ B 与 DN 关系的认识多来自于对糖尿病本身及糖尿病其他并发症方面的研究。Dasu 等^[23]研究表明在 T1DM 和 T2DM 患者的 PBMC 中存在 TLR4 的表达升高并且与炎症反应有关。TLRs 可激活 NF- κ B 等转录因子, 引起多种与免疫有关的细胞因子及趋化因子的分泌, 如 IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 和 TNF- α 等^[24]。研究^[25]表明: TLR4 可能在 LPS 的作用下导致 NF- κ B 的核转位及相应免疫细胞的激活而发生转录, 释放促炎症细胞因子(及协同刺激分子), 导致细胞增殖和凋亡。Notch 信号通路可影响外周免疫细胞(包括单核细胞/巨噬细胞)的增殖、分化和凋亡。研究^[26]表明: 其在外周免疫反应中同样发挥重要作用。

本研究发现: LPS 干预前 DN 患者单个核细胞胞质有少量 NF- κ B p65 表达, 细胞核内不表达 NF- κ B p65, 经过 LPS 干预后 DN 患者细胞胞质和细胞核内均有 NF- κ B p65 的表达, 且表达量较前明显增强, 且存在核转移现象, 提示 NF- κ B 处于激活状态; 与 Hormann 等^[27]的研究结果一致。本研究还发现 LPS 干预后 Notch1 蛋白表达无改变, 说明 DN 的微炎症状态可能与 NF- κ B 信号通路有关, 而与 Notch1 通路无关。

DN 是 DM 患者主要的微血管病变之一。据国外统计资料表明: DN 已跃升为终末期肾功能衰竭(ESRF)首位病因, 目前我国 DN 发病率亦呈上升趋势。由于 DN 患者机体存在极其复杂的代谢、免疫功能紊乱, 一旦发展到 ESRF, 往往比其他肾脏疾病的治疗更加棘手。因此, 进一步探索其发病机制, 以便制定更加有效的防治措施, 已成为当前糖尿病和肾脏病学界十分热点的课题。

总之, 本研究初步探讨了 DN 患者早期和晚期单核细胞微炎症状态及其与 TLR4, NF- κ B p65 和 Notch1 蛋白表达的关系。但这只是在小样本人群中进行的研究, 难免存在局限性。因此, 后续研究将针对以上途径, 深入地探讨 DN 患者单核细胞与微炎症的关系及炎症调节的机制, 也可从细胞分子水平进一步研究炎症性免疫对共孵育的单核/巨噬细胞和肾脏固有细胞损伤的影响, 以便为 DN 的预防和治疗提供新线索。

参考文献

1. Yang M, Gan H, Shen Q, et al. Proinflammatory CD14+CD16+ monocytes are associated with microinflammation in patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy uremia[J]. *Inflammation*, 2012,35(1):388-396.
2. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance[J]. *Diabetes*, 2007,56(7):1761-1772.
3. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia[J]. *Diabetologia*, 2007,50(11):2374-2383.
4. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia induced inflammation in high fat diet induced obesity and diabetes in mice[J]. *Diabetes*, 2008,57(6):1470-1481.
5. Burcelin R, Luche E, Serino M, et al. The gut microbiota ecology: a new opportunity for the treatment of metabolic diseases? [J]. *Front Biosci*, 2009,14:5107-5117.
6. Vrieze A, Holleman F, Zoetendal EG, et al. The environment within: how gut microbiota, may influence metabolism and boay composition[J]. *Diabetologia*, 2010,53(4):606-613.
7. Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, et al. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007,292(3):E740-747.
8. Du T, Zhou ZG, You S, et al. Modulation of monocyte hyperresponsiveness to TLR ligands by 1,25-dihydroxy-vitamin D3 from LADA and T2DM[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2009,83(2): 208-214.
9. Pramanik R, Asplin JR, Lindeman C, et al. Lipopolysaccharide negatively modulates vitamin D action by down-regulating expression of vitamin D-induced VDR in human monocytic THP-1 cells [J]. *Cell Immunol*, 2004, 232(1/2):137-143.
10. Sadeghi K, Wessner B, Laggner U, et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns[J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(2):361-370.
11. Sridevi D, Mohan RD, Jason R, et al. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008,93(2):578-583.
12. Bruno F, Jean PB. The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2009,62(5):305-311.
13. Madhumita JB, Marie EM, Hyunjin S, et al. Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires

- monocytes and promotes inflammation in Type 2 diabetes[J]. *J Immunol*,2011,186(2):1162-1172.
14. Herder C, Brunner EJ, Rathmann W, et al. Elevated levels of the anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist precede the onset of type 2 diabetes: the Whitehall II study[J]. *Diabet Care*,2009,32(3):421-423.
 15. Marc YD, Steven ES. Type 2 diabetes as an inflammatory disease[J]. *Nat Rev Immunol*,2011,11:98-107.
 16. 殷俊, 林宣, 何汉武. 2型糖尿病肾病患者外周血单个核细胞Toll样受体4的表达及TNF- α 水平的研究[J]. *临床内科杂志*,2009,26(5):318-320.
YIN Jun, LIN Xuan, HE Hanwu. Expression of Toll-like receptor 4 and level of TNF- α in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes patients with nephropathy[J]. *Journal of Clinical Internal Medicine*,2009,26(5):318-320.
 17. 李曼丽, 甘华, 譙林. 糖尿病肾病尿毒症患者外周血单核细胞TLR4的表达及其与血浆MCP-1浓度的关系[J]. *中国免疫学杂志*,2009,25(9):848-850.
LI Manli, GAN Hua, QIAO Lin. The expression of TLR4 on peripheral blood monocytes from uremic patients with diabetic nephropathy and its relation with plasma MCP-1 concentration[J]. *Chinese Journal of Immunology*,2009,25(9):848-850.
 18. Montemari A, Di Renzo L, Cacciamani A, et al. Toll-like receptor 4 is elevated in human monocytes of diabetic patients and is associated with the progression of diabetic retinopathy[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,2009,50:1340.
 19. Hodgkinson CP, Laxton RC, Patel K, et al. Advanced glycation end-product of low density lipoprotein activates the toll-like 4 receptor pathway implications for diabetic atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2008, 8(12):2275-2281.
 20. Rudofsky G Jr, Reismann P, Witte S, et al. Asp299Gly and Thr399Ile genotypes of the TLR4 gene are associated with a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes[J]. *Diabet Care*,2004,27(1):179-183.
 21. Buraczynska M, Baranowicz GI, Tarach J, et al. Toll-like receptor 4 gene polymorphism and early onset of diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes[J]. *Hum Immunol*,2009, 70(2):121-124.
 22. Ando M, Shibuya A, Tsuchiya K, et al. Reduced expression of Toll-like receptor 4 contributes to impaired cytokine response of monocytes in uremic patients[J]. *Kidney Int*,2006,70(2): 358-362.
 23. Dasu MR, Devarai S, Park S, et al. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects[J]. *Diabet Care*,2010,33(4):861-868.
 24. 曹雪涛. 免疫学前言进展[M]. 北京: 人民卫生出版社,2009:143.
CAO Xuetao. Progress of immunology[M]. Beijing: The People's Medical Publishing House, 2009:143.
 25. Mourad Z, Youssef E, Amarjit SN, et al. Poly(ADP-Ribose) polymerase-1 is a determining factor in crm1-mediated nuclear export and retention of p65 NF- κ B upon TLR4 stimulation[J]. *J Immunol*,2010,185(3):1894-1902.
 26. Baldi A, De Falco M, De Luca L, et al. Characterization of tissue specific expression of Notch-1 in human tissues[J]. *Biol Cell*, 2004,96(4):303-311.
 27. Hofmann MA, Schiekofer S, Kanitz M, et al. Insufficient glycemic control increases nuclear factor-kappa B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with type 1 diabetes[J]. *Diabet Care*,1998,21(8):1310-1316.

(本文编辑 彭敏宁)