

高脂饮食喂养对大鼠脂肪组织中 TLR4 炎症信号通路的影响

曹艳丽 暴素青 范雨鑫 白淑亭 单忠艳

【摘要】 目的 探讨高脂饮食喂养对肥胖大鼠脂肪组织中 TLR4 炎症信号通路的影响。方法 将 20 只 SPF 级雄性 4 周龄 SD 大鼠随机分为正常饮食组 (NC, $n=10$) 和高脂饮食组 (HFD, $n=10$)。检测每组大鼠空腹血糖及胰岛素水平, 并计算 HOMA-IR; 应用 Real-time PCR 及 Western blot 方法检测脂肪组织中炎症信号通路 TLR4、TRAF6、IKK β 、TNF- α 、IL-6 的表达。结果 (1) 与 NC 组相比, HFD 组空腹胰岛素水平显著升高 [分别为 (14.64 ± 0.66) mIU/L vs. (31.71 ± 3.61) mIU/L, $P=0.005$]; HOMA-IR 值升高 (分别为 3.40 ± 0.15 vs. 7.59 ± 0.99 , $P=0.008$); 两组大鼠空腹血糖水平无明显统计学差异。(2) Real time PCR 结果显示, HFD 组脂肪组织中 TLR4、TRAF6、TNF- α 及 IL-6 mRNA 水平均明显升高, 分别为 NC 组的 1.85 倍 ($P=0.002$)、1.72 倍 ($P=0.031$)、3.82 倍 ($P=0.045$) 及 3.17 倍 ($P=0.003$)。(3) HFD 组大鼠炎症因子 TLR4、IKK β 及 TNF- α 蛋白水平亦明显升高, 分别为 NC 组的 1.62 倍 ($P=0.000$)、1.77 倍 ($P=0.003$) 及 3.02 倍 ($P=0.002$)。结论 高脂饮食可通过介导 TLR4 炎症信号通路活化, 使脂肪组织中炎症因子 TNF- α 、IL-6 表达升高, 进而导致胰岛素抵抗的发生。

【关键词】 Toll 样受体 4; 肿瘤坏死因子 α ; 炎症; 高脂饮食; 胰岛素敏感性

Expression of TLR4 inflammatory pathway in adipose tissue of rats induced by high-fat diet CAO Yan-li, BAO Su-qing, FAN Yu-xin, BAI Shu-ting, SHAN Zhong-yan. Department of Endocrinology and Metabolism, Institute of Endocrinology, Liaoning Provincial Key Laboratory of Endocrine Diseases, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China
Corresponding author: CAO Yan-li, Email: vanilla421@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore toll-like receptor 4 (TLR4) inflammatory pathway in adipose tissue of rats induced by high-fat diet. **Methods** 20 male Sprague-Dawley rats were divided into two groups: the standard diet (NC, $n=10$) group and the high-fat diet (HFD, $n=10$) group. Plasma glucose and fasting plasma insulin (FINS) levels were assessed. Insulin resistance was calculated by the homeostasis model assessment-insulin resistance index (HOMA-IR index). The levels of inflammation signaling pathway TLR4, TRAF6, IKK β , TNF- α , IL-6 were examined in adipose tissue. **Results** (1) In HFD group, there were significant increases in FINS [(14.64 ± 0.66) mIU/L vs. (31.71 ± 3.61) mIU/L, separately, $P=0.005$], HOMA-IR (3.40 ± 0.15 vs. 7.59 ± 0.99 , separately, $P=0.008$), compared to the NC group. (2) The levels of mRNA expression results of real-time PCR of TLR4 (1.85 fold, $P=0.002$), TRAF6 (1.72 fold, $P=0.031$), TNF- α (3.82 fold, $P=0.045$) and IL-6 (3.17 fold, $P=0.003$) levels were higher in HFD group than the NC group. (3) The protein levels of inflammation-related substances such as TLR4 (1.62 fold, $P=0.000$), IKK β (1.77 fold, $P=0.003$) as well as TNF- α (3.02 fold, $P=0.002$) examined in the HFD group were all higher than the NC group, and the differences were significant. **Conclusion** TLR4 signaling pathway increasing the degree of inflammatory cytokines TNF- α and IL-6, and thus attenuated insulin sensitivity in adipose tissue of high-fat diet rats.

【Key words】 Toll-like receptor 4; Tumor necrosis factor-alpha; Inflammation; Diet, high-fat; Insulin sensitivity

肥胖症易引发胰岛素抵抗、糖尿病、心血管系统

疾病等, 严重地威胁着人类的健康及生活质量。越来越多的证据表明^[1-2], 肥胖相关的胰岛素抵抗是一种慢性低度炎症性疾病。脂肪组织不仅是一个能量储存库, 同时也是重要的内分泌器官, 在调节能量代谢及胰岛素敏感性等相关炎症反应中起着重要的作用^[3-4]。

研究表明, Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs)

作为一类天然的病原模式识别受体,在调节机体免疫系统中发挥核心作用,并与慢性炎症性疾病的发生密切相关^[5]。在 TLRs 家族中,TLR4 是人类发现的第一个 Toll 样受体蛋白,几乎分布于所有的细胞系。研究发现,在营养性肥胖、动脉粥样硬化、糖尿病及心肌梗死等非细菌性炎症性疾病的发生发展中,均与 TLR4 密切相关^[6-7]。

高脂饮食可使肠道吸收脂多糖增多,游离脂肪酸水平增加,这时 TLR4 可被脂多糖及游离脂肪酸激活,参与机体慢性炎症和胰岛素抵抗的发生^[8]。但目前 TLR4 炎症信号通路在脂肪组织炎症反应中的作用及机制,尚不清楚。因此本研究通过给大鼠喂养高脂饮食,观察大鼠脂肪组织中 TLR4 炎症信号通路的改变。

材料与方法

1. 主要试剂:小鼠抗大鼠 TLR4 一抗购自 Abcam 公司;兔抗大鼠 IKK β 一抗购自 Cell Signal Technology 公司;羊抗大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 一抗购自 Santa Cruz 公司;内参兔抗小鼠 β -actin 一抗购自 Santa Cruz 公司;全蛋白提取试剂盒购自凯基公司;RNA later 购于 QIAGEN 公司;Trizol、cDNA 反转录试剂盒及 SYBR Select Master Mix 均购于 Invitrogen 公司;引物由 TaKaRa (大连宝生物公司)设计并合成;胰岛素测定碘 (¹²⁵I) 放免试剂盒购自北京原子高科公司。

2. 动物喂养及标本获取:SPF 级健康 4 周龄雄性 SD 大鼠 20 只,体质量 85~108 g,购自北京华阜康动物饲养公司。实验前适应性喂养 1 周后,随机分为正常饮食组 (NC, $n=10$) 和高脂饮食组 (HFD, $n=10$)。大鼠饲养与中国医科大学动物饲养中心,每笼 5 只,温度控制在 (22 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$,湿度控制在 55%~60%,明暗交替周期为 12 h。NC 组基础饲料由中国医科大学实验动物中心提供,热量比:蛋白质 28.58%、脂肪 9.59%、碳水化合物 61.83%。HFD 组高脂饲料热量比:蛋白质 15%,脂肪 60%,碳水化合物 25%,经钴源辐照后使用。喂养期间自由摄食和饮水,每周固定时间称重,记录大鼠生长曲线。喂养 16 周后,NC 组和 HFD 组大鼠体重出现明显差异 ($P<0.05$)。此实验的所用过程均按照国家卫生研究所实验动物使用规章进行。

大鼠禁食 14 h,称重,10%水合氯醛 (0.3 mg/kg) 腹腔注射麻醉,心尖取血,立即 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温离心,分离血清置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存备用。迅速取出附睾周脂肪组织,剔除血管及其他结缔组织,称重(计算脂肪系数)。分两部分处理:(1)将组织切为长宽高均 ≤ 0.5 cm,放于 RNA later 中,为下一步 Real-time PCR 做准备;(2)一部分置于冻存管后放入液氮中,过夜后移至 -80 $^{\circ}\text{C}$

冰箱中冻存备用。

3. 大鼠空腹血糖 (FBG)、空腹胰岛素 (FINS)、游离脂肪酸 (FFA) 测定:尾静脉采血测定三组大鼠空腹血糖 (罗氏血糖仪);利用碘 (¹²⁵I) 放免试剂盒 (RIA) 测定基础胰岛素水平,并计算 HOMA-IR 指数 (homeostasis model assessment-insulin resistance index),计算公式 $\text{FBG (mmol/L)} \times \text{FINS (mIU/L)} / 22.5$ 。采用酶学方法检测血清中游离脂肪酸水平 (Hitachi 7600-020 自动化化学分析仪)。

4. Real-time PCR 方法测定脂肪组织中炎症信号通路中 TLR4、TRAF6 (TNF receptor associated factor 6)、TNF- α 及白细胞介素-6 (IL-6) mRNA 表达:称取 100 mg 脂肪组织,剪碎并充分匀浆,采用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 说明书抽提总 RNA,应用 Tecan infinite M200 多功能酶标仪测定 RNA 纯度 (纯度在 1.8~2.0) 及浓度,取总 RNA 200 ng 进行逆转录 (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Invitrogen)。

目的基因和内参 (GAPDH) 的引物序列由 TaKaRa 公司设计并合成 (表 1)。按照 SYBR Select Master Mix 试剂盒 (Life technology 公司) 说明书,采用 Light Cycler 480 荧光定量 PCR 仪进行实时定量 PCR 反应。反应体系 20 μl ,反应条件 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 预变性,95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min 变性,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,45 个循环。结果通过 LightCycler480 1.5 软件分析,以 GAPDH 表达作为内参照,目的基因与 GAPDH 表达的比值作为目的基因表达量。

表 1 不同基因引物序列

基因	引物序列
TLR4	Forward: 5'-CCGCTCTGGCATCATCTTCA-3'
	Reverse: 5'-CCCACTCGAGGTAGGTGTTTCTG-3'
TRAF6	Forward: 5'-TCTCCCTGCCTTCAATTGTT-3'
	Reverse: 5'-AGGCTGGCGATTTTGTGTTT-3'
TNF- α	Forward: 5'-GGCGTGTTCATCCGTTCTC-3'
	Reverse: 5'-CTTCAGCGTCTCGTGTGTTTCT-3'
IL-6	Forward: 5'-ATTGTATGAACAGCGATGATGCAC-3'
	Reverse: 5'-CCAGGTAGAAACGGAATCCAGA-3'
GAPDH	Forward: 5'-GCAAGTTCAACGGCACAG-3'
	Reverse: 5'-GCCAGTAGACTCCACGACAT-3'

5. Western blot 方法检测脂肪组织中炎症信号通路蛋白 TLR4、IKK β 及 TNF- α 表达水平:剪取约 100 mg 附睾周脂肪组织依次加入适量的裂解液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂及 PMSF (KGP 250 kit),匀浆 (8 min \times 2 次),匀浆后置于冰浴中 30 min,离心后取管底清液,BCA 法测定蛋白浓度,定量,加入等体的 SDS-PAGE 样品缓冲液,于 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min,放于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

表2 高脂饮食对大鼠机体生理及代谢指标变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	食物摄取量 ($\text{g} \cdot \text{鼠}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	体质量 (g)	FINS (mIU/L)	FBG (mmol/L)	HOMA-IR	FFAs (mmol/L)
NC组	10	158.89±9.86	487.01±8.20	14.64±0.66	5.26±0.22	3.40±0.15	0.37±0.03
HFD组	10	137.57±10.71	520.02±9.35 ^a	31.71±3.61 ^b	5.33±0.67	7.59±0.99 ^b	0.81±0.11 ^a

注: 与NC组比较, ^a $P < 0.05$; 与NC组比较, ^b $P < 0.01$

待所有样品获得后加样进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 其后转移至 PVDF 膜, 用 TBST 洗膜 (3 次, 每次 5 min), 用含 5% BSA TBST 缓冲液室温封闭 1 h, 加一抗 4 °C 过夜孵育, 洗膜, 二抗孵育 1 h, 洗膜, 用增强型化学发光法 (ECL) 显色, 利用成像检测系统观察 (AlphaView 1.3), 利用 Image-pro Plus 6.0 图像处理软件定量分析, 以 β -actin 表达作为内参照, 目的蛋白表达与 β -actin 表达的比值作为目的蛋白表达量。

6. 统计学处理: 所有统计资料用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。数据进行正态性检验后以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间差异比较采用独立样本 t 检验分析, 设定 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 高脂饮食对大鼠生理及代谢指标的影响: 为了评估高脂饮食对大鼠代谢指标的改变, 分别给予 NC 组和 HFD 组喂养正常饮食和高脂饮食 16 周, 观察 NC 组和 HFD 组大鼠体重、摄食量、FBG、FINS、HOMA-IR 及游离脂肪酸水平的变化 (表 2)。研究发现两组大鼠食物摄取量无明显差异, HFD 组大鼠平均体重明显高于 NC 组 ($P=0.02$), HFD 组血清 FINS 水平及 HOMA-IR 值均明显高于 NC 组 ($P=0.005$, $P=0.008$), HFD 组游离脂肪酸的水平亦高于 NC 组 ($P=0.013$), 但两组大鼠空腹血糖水平无统计学差异。

2. 高脂饮食对大鼠脂肪组织中 TLR4 相关炎症信号通路影响: 分别予以正常饮食和高脂喂养 16 周后, 分别应用 Real time PCR 方法和 Western blot 方法测定了两组大鼠脂肪组织中 TLR4 信号通路中关键因子的 mRNA 和蛋白水平。结果表明, 在 HFD 组中, TLR4、TRAF6、TNF- α 及 IL-6 mRNA 水平均明显升高, 分别为 NC 组 1.85 倍 ($P=0.002$, 图 1A)、1.72 倍 ($P=0.031$, 图 1B)、3.82 倍 ($P=0.045$, 图 1C) 及 3.17 倍 ($P=0.003$, 图 1D); HFD 组 TLR4 蛋白水平约为 NC 组的 1.62 倍 ($P=0.000$, 图 2A), 炎症相关蛋白 IKK β 水平是 NC 组的 1.77 倍 ($P=0.003$, 图 2B), TNF- α 蛋白水平为 NC 组的 3.02 倍 ($P=0.002$, 图 2C)。

讨 论

本研究表明, 高脂饮食能够激活 TLR4 信号通路,

增加了炎症细胞因子 TNF- α 及 IL-6 表达, 加重了脂肪组织中炎症应答, 最终减弱了胰岛素敏感性。

脂肪组织作为一个重要的内分泌器官, 可分泌多种细胞因子, 如 TNF- α 、IL-6、抵抗素及脂联素等, 在肥胖和胰岛素抵抗的发生发展中发挥了极其重要的作用。脂肪组织处炎症因子过表达干扰了正常状态下胰岛素信号的应答^[9-10]。近年来研究发现, 脂肪细胞分泌的 TNF- α 即脂源性 TNF- α 在肥胖相关胰岛素抵抗的发生中起到了重要的作用, TNF- α 可通过诱导胰岛素受体底物-1 (IRS-1) 在丝氨酸残端发生磷酸化, 抑制酪氨酸残端磷酸化^[11], 降低 GLUT4 的表达^[12], 从而诱发胰岛素抵抗的发生。同样, 脂肪组织中 IL-6 的高表达与胰岛素抵抗的发生亦密切相关^[13]。本研究结果观察到与其相一致的结果, 高脂饮食诱导的肥胖大鼠, 脂肪组织中炎症因子 TNF- α 、IL-6 表达升高, 与胰岛素抵抗表达一致。

本研究发现高脂饮食喂养肥胖大鼠脂肪组织中 TLR4 高表达, 以及其下游炎症通路关键分子 TRAF6、IKK β 表达升高, 因此高脂饮食可能通过 TLR4 炎症通路, 使脂肪组织中炎症因子表达升高, 引起了肥胖相关胰岛素抵抗的发生。TLR4 是一种位于细胞膜表面的病原模式识别受体, 能够识别脂多糖, 饱和脂肪酸^[14]。TLR4 的结构分为 3 个区域^[15]: 胞外域 (富含亮氨酸重复序列即 LRR 域)、跨膜域与胞内域 (此域高度保守, 与 IL-1 受体家族同源域, 即 Toll/IL-1 受体域: TIR)。TLR4 活化主要可激活了下游两条通路^[16]: MyD88 依赖性通路和 MyD88 非依赖性通路。一旦受到刺激, TLR4 就会募集 MyD88 胞内衔接分子, 胞内的 TIR 域与 MyD88 的羧基端结合, 与此同时 MyD88 的氨基端再与 IL-1 受体相关激酶 4 (IRAK-4) 氨基端结合, 激活 IRAK, 并介导了其自身磷酸化, 磷酸化的 IRAK-4 进一步介导了 IRAK-1 磷酸化, 激活的 IRAK 再激活肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF-6), 磷酸化的 IRAK-1 和 TRAF-6 共同激活了丝裂原活化蛋白激酶家族中的 NF- κ B 抑制物激酶 (IKKs) 复合体, 使 NF- κ B 抑制物 (IKK β) 磷酸化而降解, 最终导致 NF- κ B 转录因子激活, 转入细胞核中诱导特定基因的表达。

综上, 本研究表明了高脂饮食可促使 TLR4 炎症通路激活, 使脂肪组织中炎症因子 TNF- α 、IL-6 表达

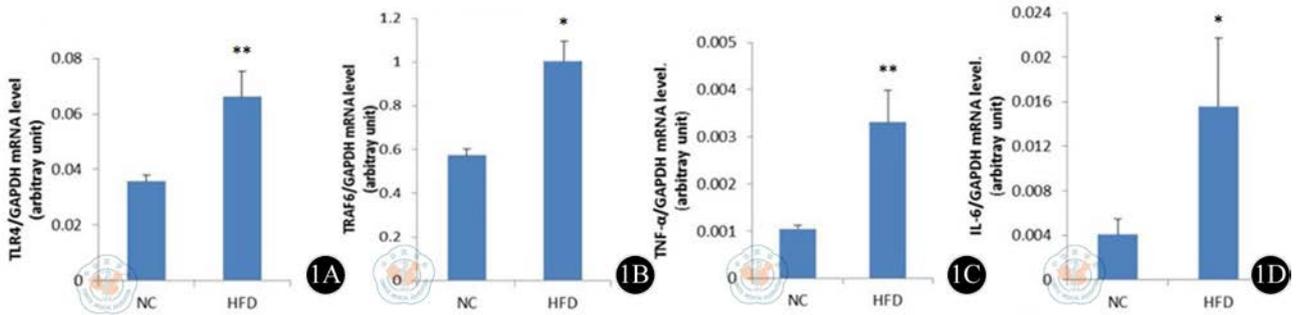


图1 NC组与HFD组大鼠脂肪组织中TLR4、TRAF6、TNF-α及IL-6 mRNA水平比较,与NC组比较,* $P<0.05$;与NC组比较,** $P<0.01$

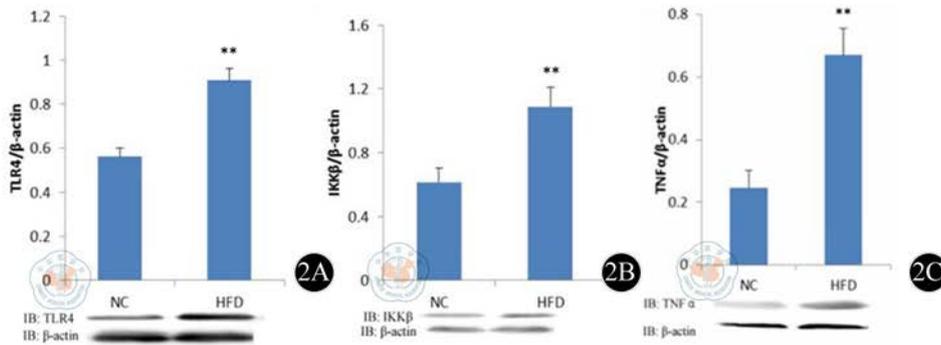


图2 NC组与HFD组大鼠脂肪组织中TLR4、IKKβ及TNF-α蛋白水平表达水平,与NC组比较,** $P<0.001$

升高,进而导致肥胖相关炎症、胰岛素抵抗的发生。这将为肥胖相关炎症、胰岛素抵抗的诊治提供新的诊治思路。

参 考 文 献

[1] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 2006, 444: 860-867.

[2] Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 2003, 112: 1796-1808.

[3] de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett*, 2008, 582: 97-105.

[4] Talukdar S, Oh da Y, Bandyopadhyay G, et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med*, 2012, 18: 1407-1412.

[5] Szatmary Z. Molecular biology of toll-like receptors. *Gen Physiol Biophys*, 2012, 31: 357-366.

[6] Erridge C. Diet, commensals and the intestine as sources of pathogen-associated molecular patterns in atherosclerosis, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis*, 2011, 216: 1-6.

[7] Kim F, Pham M, Luttrell I, et al. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res*, 2007, 100: 1589-1596.

[8] Pal D, Dasgupta S, Kundu R, et al. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med*, 2012.

[9] Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7: 885-896.

[10] Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, et al. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*, 1997, 389: 610-614.

[11] Ishizuka K, Usui I, Kanatani Y, et al. Chronic tumor necrosis factor-alpha treatment causes insulin resistance via insulin receptor substrate-1 serine phosphorylation and suppressor of cytokine signaling-3 induction in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*, 2007, 148: 2994-3003.

[12] Fernández-Veledo S, Hernandez R, Teruel T, et al. Ceramide mediates TNF-alpha-induced insulin resistance on GLUT4 gene expression in brown adipocytes. *Arch Physiol Biochem*, 2006, 112: 13-22.

[13] Li Y, Ding L, Hassan W, et al. Adipokines and hepatic insulin resistance. *J Diabetes Res*, 2013, 2013: 170532.

[14] Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des*, 2009, 15: 1546-1558.

[15] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 2001, 1: 135-145.

[16] O'Neill LA. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18: 3-9.

(收稿日期: 2013-06-17)

(本文编辑: 戚红丹)