

TLR4介导高游离脂肪酸血症诱导的胰岛素抵抗

苏娟 赵乃倩 刘晓玲

【摘要】 肥胖以高游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)血症、慢性炎症和胰岛素抵抗为特征,高FFA血症所诱导的机体慢性炎症反应是肥胖状态下机体胰岛素抵抗的重要原因,TLR4是FFAs借以影响炎症和代谢途径的关键性介质,FFAs活化TLR4炎症信号通路的可能机制包括:促进TLR4基因转录;抑制TLR4 mRNA降解;诱导TLR4募集入脂质筏。通过控制肥胖状态下的不良炎症反应,为防治肥胖相关炎症性疾病如糖尿病和缺血性心脑血管病等指明了新的研究方向。

【关键词】 肥胖症; 脂肪酸类,非酯化; Toll样受体4; 炎症反应; 胰岛素抵抗

High blood free fatty acid induced insulin resistance which is mediated by TLR4 SU Juan, ZHAO Nai-qian, LIU Xiao-ling. Department of Geriatrics, Shanxi Medical University Second Hospital, Taiyuan 030001, China
Corresponding author: ZHAO Nai-qian, Email: 407288101@qq.com

【Abstract】 Obesity is characterized by high blood free fatty acid hyperlipidemia, chronic inflammation and insulin resistance, chronic inflammatory response of the body, which is induced by FFAs, is an important reason for insulin resistance in obese state. The critical media is TLR4, by which FFAs influence inflammation and metabolic pathway. The possible mechanisms of free fatty acids-induced EC insulin resistance include promoting the transcription of TLR4 gene, inhibiting TLR4 mRNA degradation and inducing TLR4 recruitment into lipid rafts. It indicates a new research direction by controlling the adverse inflammatory in obese state, which is in order to the prevention of obesity related inflammatory diseases such as diabetes and ischemic cardiovascular and cerebrovascular diseases.

【Key words】 Obesity; Fatty acids, nonesterified; Toll-like receptor 4; Inflammatory response; Insulin resistance

随着传统生活方式向高热量饮食、静止少动生活方式的转变,肥胖已成为危害人类健康的全球性流行病。众多研究证实,肥胖以高游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)血症、慢性炎症和胰岛素抵抗为特征,高FFA血症所诱导的机体慢性炎症反应是肥胖状态下机体胰岛素抵抗的重要原因,但是高FFA血症诱导慢性炎症反应的分子机制尚未阐明。既往关于细菌性炎症的研究发现,Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)家族分子中的TLR4是细菌内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导细菌性炎症反应的关键性介质,并且LPS中所含的饱和脂肪酸月桂酸是LPS诱导细菌性炎症反应所必需的,提示TLR4可能在高FFA血症诱导慢性炎症反应的过程中发挥着重要作用。由此而展开的有关高FFA血症、TLR4与炎症反应之间病理生理联系的研究,从离体细胞培养及活体研究等多个层面证实了TLR4在饮食所致肥胖诱导机体炎症和胰岛素抵抗中的关键作用,为深入探索高FFA血症诱导慢性炎症反应的发病机制,控制肥胖状态下的不良炎症反应,防治肥胖相关炎症性疾病如糖尿病和缺血性心脑血管病等指明了新的研究方向。

一、由TLR4介导细菌性炎症反应得到的启示

早在1901年,Williamson等^[1]即报道了水杨酸钠治疗有助

于改善糖尿和糖尿病,提示糖尿病和炎症之间可能存在着某种潜在的联系。1957年,Reid等^[2]的研究显示,使用阿司匹林治疗的糖尿病患者,其口服糖耐量得到了不同程度的改善,进一步证实了抗感染治疗对糖尿病的有益影响。此后,由于Randle发现葡萄糖脂肪酸循环,首次阐述了脂肪酸与胰岛素抵抗之间的因果关系,使得有关炎症和糖尿病之间联系的研究也因而中断^[3]。随着肥胖及与之相伴的脂质代谢紊乱在导致胰岛素抵抗中的重要作用逐渐为人们所认识,针对与肥胖和脂质代谢紊乱有密切关系的脂肪组织进行了大量研究。研究发现,脂肪组织不仅是脂肪的储存场所,更是一个内分泌器官,除了分泌能量调节激素瘦素、脂联素和抵抗素外,还释放促炎症反应细胞因子TNF- α 和IL-6。脂肪组织释放炎症细胞因子的发现,再次引起了研究者对炎症和糖尿病之间关系的关注。Lang等^[4]对一组体重正常的SD大鼠持续静脉输注TNF- α ,然后采用正常血糖高胰岛素钳夹试验评价其外周胰岛素敏感性。结果发现,持续静脉输注TNF- α 可引起SD大鼠周围器官的胰岛素抵抗。在多种肥胖动物模型中均发现,脂肪组织中TNF- α 表达增加^[5]。进一步的研究在分子水平上证实了TNF- α 通过促进IRS-1丝氨酸磷酸化介导外周胰岛素抵抗^[5]。Yuan等^[6]的研究显示,在肥胖的啮齿类动物中,FFAs可激活IKK β /NF- κ B这一公认的炎症信号通路,而大剂量水杨酸盐治疗可抑制IKK β /NF- κ B信号通路,改善FFAs诱导的胰岛素抵抗。这一研究也为Williamson和Reid初期关于炎症和糖尿病之间联系的发现提供了一个确切

的分子解释。Hirosumi 等^[7]证实, 炎性细胞因子和 FFAs 可激活 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK), JNK 进而损伤胰岛素信号转导和介导肥胖相关胰岛素抵抗。以上研究提示, 肥胖时高 FFA 血症诱导的炎症反应是联接肥胖和胰岛素抵抗的中间环节, 但是高 FFA 血症究竟是通过怎样的分子机制诱导机体炎症反应的呢?

FFAs-炎症反应-胰岛素抵抗关系研究中出现的 FFAs、炎性细胞因子及 IKK β /NF- κ B 炎症信号通路使人们联想到了细菌性炎症的发生机制。大量研究证明, 在细菌性炎症的发生过程中, 细菌性内毒素 LPS 与细胞膜上的 TLR4 受体复合物(包括 CD14 和辅助蛋白 MD2) 结合, 继而依次吸引衔接蛋白髓细胞分化因子 88 (MyD88) 和白细胞介素 1 受体相关激酶 (IRAK), 形成新的有活性的复合物, 激活 IKK β 和 NF- κ B, 诱导众多炎症介质表达, 启动先天免疫反应。其中, TLR4 在机体的巨噬细胞、脂肪细胞、肝细胞和骨骼肌细胞上均有表达, 可以识别 LPS、透明质酸、oxLDL 和热休克蛋白等众多的外源性和内源性配体, 在许多传染源和应激原引起的先天免疫反应中发挥重要作用^[8-9]。在细菌性炎症反应中, TLR4 是 LPS 受体复合物中的关键性组分, 而决定 LPS 生物活性的脂质 A 中所含的饱和脂肪酸月桂酸是 LPS 激活 TLR4 受体复合物诱导细菌性炎症反应所必需的, 切除脂质 A 中的这些饱和脂肪酸将导致内毒素活性完全丧失, 因此饱和脂肪酸和 TLR4 是细菌性炎症反应信号通路中两个必不可少的组成成分^[10-13]。以上述研究为基础, Shi 等^[14]提出了他们的研究假设, 即在饮食所致肥胖中, 高 FFA 血症也可能是通过激活 TLR4, 诱导致炎细胞因子和趋化细胞因子从免疫和非免疫细胞中释放, 进而促进肥胖个体胰岛素抵抗形成的。

二、TLR4 介导高 FFA 血症诱导的慢性炎症反应

为了证实他们的推测, Shi 等^[14]进行了一系列离体与活体研究。由于既往研究显示, 肥胖个体脂肪组织中有巨噬细胞浸润, 浸润的巨噬细胞激活脂肪细胞使之表现出巨噬细胞样特性, 分泌炎性细胞因子, 作为信号级联放大的组成部分, 激活慢性炎症状态, 诱导机体胰岛素抵抗^[15], 所以他们首先研究了脂肪酸对巨噬细胞的影响。研究显示, 饱和脂肪酸 (C14:0、C16:0、和 C18:0) 以剂量依赖的方式激活 TLR4 表达正常巨噬细胞的 IKK β /NF- κ B 通路, 诱导巨噬细胞产生 TNF- α 和 IL-6, 而不饱和脂肪酸的此种作用较弱, ω -3 多不饱和脂肪酸则无此效应。相反, 以脂肪酸处理由 TLR4^{-/-}小鼠分离出的腹膜巨噬细胞, TLR4^{-/-}巨噬细胞生成的炎性细胞因子显著减少。随后, 他们又对脂肪细胞进行了研究。研究发现, 在肥胖和糖尿病小鼠的脂肪细胞中 TLR4 表达水平上调, 同时 FFAs 可诱导此种脂肪细胞炎性细胞因子表达。与此相反, 在 TLR4^{-/-}小鼠的脂肪细胞中, FFAs 诱导的 TNF- α 和 IL-6 表达显著钝化。这些体外研究提示, TLR4 可能是 FFAs 和炎症的连接点, 可能因此介导了 FFAs 诱导的炎症信号通路激活和胰岛素抵抗, 但是这一联系是否在活体中也存在尚有待证实。

于是, Shi 等^[14]以野生型小鼠和 TLR4^{-/-}小鼠为研究对象, 采用静脉输注脂肪乳升高血循环中 FFA 水平的活体研究方法, 观察 FFAs 对两种小鼠炎症反应及胰岛素抵抗的影响。研究发现, 静脉输注脂肪乳 8 h 后, 在野生型小鼠脂肪细胞中, FFAs

在激活 NF- κ B 核转位的同时伴有编码炎症细胞因子 TNF- α 和 IL-6 基因的激活, 而在 TLR4^{-/-}小鼠脂肪细胞中, FFAs 的这些致炎效应则显著减低。同时, 正常血糖高胰岛素钳夹试验结果显示, 脂肪乳输注诱导野生型小鼠出现外周胰岛素抵抗, 伴有肌肉组织中 IRS-1307 丝氨酸磷酸化增加, 但是在 TLR4^{-/-}小鼠中, 脂肪乳输注不仅不使其外周胰岛素敏感性显著降低, 而且 TLR4 基因缺陷可使肌肉组织中胰岛素刺激的 IRS-1 酪氨酸磷酸化恢复正常。这些研究结果提示, 在 FFAs 诱导机体胰岛素抵抗形成的过程中, TLR4 具有不可缺少的作用。此外, TLR4 的生理作用在长期高脂饲养的雌性 TLR4^{-/-}小鼠中进一步得到了证实。研究显示, 尽管长期高脂饲养雌性 TLR4^{-/-}小鼠的摄食和肥胖均有所增加, 但是 TLR4 基因缺陷可预防高脂饮食诱导的胰岛素抵抗及减少高脂饲养引起的脂肪组织和肝脏组织中 TNF- α 、IL-6、SOCS3、MCP-1 和巨噬细胞标志 F4/80 表达增加^[14]。可见, 无论是离体研究还是活体研究、急性实验还是慢性实验均证实了 TLR4 是 FFAs 借以影响炎症和代谢途径的关键性介质。

三、FFAs-TLR4-慢性炎症反应关系研究中有待解决的问题

虽然 Shi 等的研究揭示了联接 FFAs、慢性炎症反应的分子机制, 但是这一研究同时也提出了几个值得注意的问题。首先, 尽管静脉输注脂肪乳后, TLR4^{-/-}小鼠的炎症反应和胰岛素抵抗显著减低了, 但是 FFAs 的致炎效应、致胰岛素抵抗效应并没有完全消除而只是减弱了、减缓了, 说明 FFAs 的致炎效应、致胰岛素抵抗效应可能还存在着其他机制, 如可能尚有其他的 FFAs 结合受体促进了炎症介质的释放和胰岛素抵抗的形成等。此外, TLR4 基因缺陷小鼠对胰岛素抵抗的保护作用可能由脂肪组织外机制参与作用, 也可能是由于肌肉中缺乏 TLR4 所致, 而肌肉组织中 TLR4 的激活可直接抑制胰岛素 PI3K 信号通路导致骨骼肌对胰岛素介导的糖原储存及葡萄糖氧化减少。其次, TLR4^{-/-}小鼠在长期高脂饲养过程中出现了摄食增加和肥胖, 提示中枢神经系统 (CNS) 对机体代谢具有潜在的调节作用。其可能的机制为, 当过高的 FFAs 激活 TLR4 时, CNS 中 TLR4 信号转导产生限制营养摄入的作用, 而在缺乏 TLR4 的情况下, CNS 将错误地以为机体处于营养缺乏状态, 因而刺激暴食和肥胖。这一可能的机制也为感染性疾病时伴有食欲减退提供了一个较为合理的解释, 值得深入研究。最后, 令人感到迷惑不解的是, 在长期高脂饲养的雌性 TLR4^{-/-}小鼠中, TLR4 基因缺陷既可减少炎症因子表达又可预防高脂饮食诱导的胰岛素抵抗, 但是在雄性 TLR4^{-/-}小鼠中却仅有炎症因子表达的减少和钝化^[14], 并不显著改善饮食诱导的胰岛素抵抗。究竟是什么机制导致了这种差异有待进一步研究。

四、FFAs 活化 TLR4 炎症信号通路的可能机制

1. 促进 TLR4 基因转录: 低氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 是调节低氧状态下一系列必需基因表达的转录因子, HIF-1 α 是其转录调控功能的主要调节及活性亚基。低氧是炎症过程中经常伴随的一种现象, 提示 HIF-1 可能会对 TLR4 的表达产生影响。Kim 等^[16]的研究发现, 低氧状态下巨噬细胞 TLR4 mRNA 和蛋白水平显著增加; 以 HIF-1 α

siRNA 转染使 HIF-1 α 基因沉默, 巨噬细胞 TLR4 mRNA 和蛋白表达显著降低; 以 HIF-1 α 质粒转染使 HIF-1 α 基因过表达, 巨噬细胞 TLR4 mRNA 和蛋白表达显著增加; 染色质免疫沉淀分析显示, HIF-1 α 可与 TLR4 启动子区相结合。此外, 在低氧状态下, HIF-1 还可增加小胶质细胞、BV-2 细胞及胰腺癌细胞的 TLR4 表达^[17-18], 进一步证实 TLR4 是受 HIF-1 调控的靶基因。Sakamoto 等^[19-20]的研究显示, 常氧状态下, 巨噬细胞通过 MT1-MMP/FIH-1/Mint3/HIF-1 信号通路调控 HIF-1 转录激活功能, MT1-MMP 活化是这一信号通路的始动因素, 而 Boden 等^[21]的研究显示, 高 FFA 血症可诱导主动脉组织 MT1-MMP 表达, 提示 FFAs 可能通过 MT1-MMP/FIH-1/Mint3/HIF-1 信号通路促进 TLR4 基因转录, 进而活化 TLR4 炎症信号通路。

2. 稳定 TLR4 mRNA: Powers 等^[22]的研究发现, 在经历失血性休克/复苏恢复后的大鼠肺泡巨噬细胞中细胞表面 TLR4 表达显著增加, 这一效应可被抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸所抑制; 在体外以 H₂O₂ 处理 RAW264.7 巨噬细胞同样引起细胞表面 TLR4 表达增加, 证实缺血/再灌注期间产生的氧化应激可诱导巨噬细胞表面 TLR4 表达增加, 从而增强巨噬细胞对 LPS 的反应性。Lin 等^[23-24]的研究发现, LPS 可显著增加人主动脉平滑肌细胞 TLR4 表达, 其机制与 LPS 激活血管平滑肌细胞中的 NADPH 氧化酶, 导致血管局部 ROS 生成增加, 进而激活 MAPK 信号通路, 促使 HuR (一种 RNA 结合蛋白) 由细胞核转运至细胞质, 细胞质中的 HuR 与 TLR4 mRNA 结合, 保护 TLR4 mRNA 免受外切酶体降解, 稳定 TLR4 mRNA, 延长 TLR4 mRNA 半衰期 ($t_{1/2}$) 有关。众多研究显示, 高 FFA 血症可激活血管局部 NADPH 氧化酶, 引起血管局部氧化应激, 因此, FFAs 可能通过稳定 TLR4 mRNA 活化 TLR4 炎症信号通路。

3. 诱导 TLR4 募集入脂质筏: Wong 等^[25]采用 RAW264.7 巨噬细胞和 Ba/F3 细胞研究了 LPS 和月桂酸作用下氧化应激和 TLR4 炎症信号通路激活之间的关系。研究证实, TLR4 激活发生在细胞膜脂质筏中, LPS 和月桂酸可诱导 TLR4 募集入脂质筏并在其中形成同源二聚体, 进而激活 NF- κ B 促进炎症基因表达, 而 LPS 和月桂酸诱导的 NADPH 氧化酶依赖的 ROS 生成介导了这一过程。高 FFA 血症可激活血管局部 NADPH 氧化酶, 因此, FFAs 可能通过诱导 TLR4 募集入脂质筏活化 TLR4 炎症信号通路。

综上所述, 研究证实, FFAs 可通过 TLR4 触发炎症反应并进而最终导致胰岛素抵抗。这一发现提示, 肥胖状态下 FFAs 经由 TLR4 诱导 IKK β /NF- κ B 激活可能是肥胖相关炎症性疾病慢性炎症反应的起源和本质, 在肥胖个体胰岛素抵抗的防治中, 无论是抑制 TLR4、TNF- α 、IKK、JNK 和 SOCS3 表达还是降低 FFAs 水平可能均有助于胰岛素敏感性的改善, 因而这一发现在肥胖和肥胖相关炎症性疾病发病机制、防治研究领域具有重要意义。

参 考 文 献

[1] Williamson RT, Lond MD. On the treatment of glycosuria and diabetes mellitus with sodium salicylate. *BMJ*, 1901, 1: 760-762.
[2] Reid J, Macdougall AI, Andrews MM. Aspirin and diabetes mellitus. *Br Med J*, 1957, 2: 1071-1074.

[3] Randle PJ, Garland PB, Hales CN, et al. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*, 1963, 1: 785-789.
[4] Lang CH, Dobrescu C, Bagby GJ. Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology*, 1992, 130: 43-52.
[5] Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*, 1994, 43: 1271-1278.
[6] Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*, 2001, 293: 1673-1677.
[7] Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 2002, 420: 333-336.
[8] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 2003, 21: 335-376.
[9] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006, 124: 783-801.
[10] Kitchens RL, Ulevitch RJ, Munford RS. Lipopolysaccharide (LPS) partial structures inhibit responses to LPS in a human macrophage cell line without inhibiting LPS uptake by a CD14-mediated pathway. *J Exp Med*, 1992, 176: 485-494.
[11] Munford RS, Hall CL. Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme. *Science*, 1986, 234: 203-205.
[12] Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, et al. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, 2001, 276: 16683-16689.
[13] Lee JY, Plakidas A, Lee WH, et al. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res*, 2003, 44: 479-486.
[14] Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, 2006, 116: 3015-3025.
[15] Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*, 2005, 115: 1111-1119.
[16] Kim SY, Choi YJ, Joung SM, et al. Hypoxic stress up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in macrophages via hypoxia-inducible factor. *Immunology*, 2010, 129: 516-524.
[17] Yao L, Kan EM, Lu J, et al. Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: role of TLR4 in hypoxic microglia. *J Neuroinflammation*, 2013.
[18] Fan P, Zhang JJ, Wang B, et al. Hypoxia-inducible factor-1 up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in pancreatic cancer cells under hypoxic conditions. *Pancreatology*, 2012, 12: 170-178.
[19] Sakamoto T, Seiki M. Mint3 enhances the activity of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in macrophages by suppressing the activity of factor inhibiting HIF-1. *J Biol Chem*, 2009, 284: 30350-30359.
[20] Sakamoto T, Seiki M. A membrane protease regulates energy production in macrophages by activating hypoxia-inducible factor-1 via a non-proteolytic mechanism. *J Biol Chem*, 2010, 285: 29951-29964.
[21] Boden G, Song W, Pashko L, et al. In vivo effects of insulin and free fatty acids on matrix metalloproteinases in rat aorta. *Diabetes*, 2008, 57: 476-483.
[22] Powers KA, Szász K, Khadaroo RG, et al. Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages. *J Exp Med*, 2006, 203: 1951-1961.
[23] Lin FY, Chen YH, Tasi JS, et al. Endotoxin induces toll-like receptor 4 expression in vascular smooth muscle cells via NADPH oxidase

- activation and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 2630-2637.
- [24] Lin FY, Chen YH, Lin YW, et al. The role of human antigen R, an RNA-binding protein, in mediating the stabilization of toll-like receptor 4 mRNA induced by endotoxin: a novel mechanism involved in vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 2622-2629.
- [25] Wong SW, Kwon MJ, Choi AM, et al. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *J Biol Chem*, 2009, 284: 27384-27392.

(收稿日期: 2013-10-25)

(本文编辑: 戚红丹)

苏娟, 赵乃倩, 刘晓玲. TLR4 介导高游离脂肪酸血症诱导的胰岛素抵抗 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7 (22): 10308-10311.

