

论著·基础研究

枸杞多糖对髓样分化因子 88 基因敲除小鼠 2 型糖尿病模型炎症因子的影响

王凌霄, 刘婷婷, 杨晓辉, 姚智卿, 蔡慧珍

宁夏医科大学公共卫生与管理学院, 银川 750004

[摘要] **目的**·研究枸杞多糖 (*Lycium barbarum* polysaccharide, LBP) 对髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, *MyD88*) 基因敲除 (*MyD88^{-/-}*) 小鼠 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 模型炎症因子的影响。**方法**·采用不同浓度 LBP (20、40、80 mg/kg) 干预 *MyD88^{-/-}* T2DM 小鼠, ELISA 法检测小鼠血清中白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-8、转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 及 IL-10 的水平。采用不同浓度 (25、50、100 μ g/mL) LBP 预处理小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 细胞, 然后用脂多糖诱导炎症状态, Western blotting 检测各组细胞核因子 κ B (NF- κ B) 的核转位变化, 以及 NF- κ B 抑制蛋白 (I κ B) 和磷酸化 I κ B 的蛋白水平。**结果**·LBP 能够降低 *MyD88^{-/-}* T2DM 小鼠血清 IL-1 β 和 TGF- β 1 的水平 (均 $P<0.05$)。体外实验表明, LBP 可以剂量依赖性地抑制巨噬细胞中由脂多糖诱发的 NF- κ B 核转位, 同时高剂量的 LBP 可以抑制 I κ B 磷酸化。**结论**·LBP 可以抑制 *MyD88^{-/-}* T2DM 小鼠部分促炎症因子, 这种调节作用可能与其弱化巨噬细胞 I κ B 磷酸化, 抑制 NF- κ B 核转位有关。

[关键词] 枸杞多糖; 髓样分化因子 88; 基因敲除; 2 型糖尿病; 巨噬细胞; 炎症因子; 核因子 κ B

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.02.006 **[中图分类号]** R151.3 **[文献标志码]** A

Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on inflammatory cytokines in type 2 diabetes mellitus model mice without myeloid differentiation factor 88 gene

WANG Ling-xiao, LIU Ting-ting, YANG Xiao-hui, YAO Zhi-qing, CAI Hui-zhen

School of Public Health & Management, NingXia Medical University, Yinchuan 750004, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on inflammatory cytokines in type 2 diabetes mellitus (T2DM) mice without myeloid differentiation factor 88 gene (*MyD88^{-/-}*). **Methods**·Levels of interleukin 1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), and IL-10 in serum were assessed by ELISA in the *MyD88^{-/-}* T2DM mice which had been administered with different doses of LBP (20, 40, and 80 mg/kg). Mouse macrophages Raw264.7 were stimulated by lipopolysaccharide (LPS) after treatment with different concentrations of LBP (25, 50, and 100 μ g/mL). Then Western blotting was used to detect nuclear translocation level of nuclear factor κ B (NF- κ B) and protein expressions of inhibitor of NF- κ B (I κ B) and p-I κ B. **Results**·Serum levels of IL-1 β and TGF- β 1 in *MyD88^{-/-}* T2DM mice were down-regulated by LBP ($P<0.05$). Cell experiment proved that nuclear migration of NF- κ B was dose-dependently inhibited by LBP, and the level of p-I κ B was reduced by high dose of LBP. **Conclusion**·LBP can reduce some proinflammatory cytokines in the *MyD88^{-/-}* T2DM mice, which may be related with its inhibitive effect on the phosphorylation of I κ B and nuclear migration of NF- κ B in the macrophages.

[Key words] *Lycium barbarum* polysaccharide (LBP); myeloid differentiation factor 88 (MyD88); gene knockout; type 2 diabetes mellitus (T2DM); macrophage; inflammatory cytokine; nuclear factor κ B (NF- κ B)

胰岛素抵抗是 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 发生的病理机制。流行病学调查以及动物实验已证实 T2DM 是一种慢性炎症性疾病^[1-2]。慢性炎症反应会增强胰岛素抵抗及胰岛 β 细胞损伤, 炎症因子参与了 T2DM 的发生及发展^[2-3]。研究^[2,4-5]证实白细胞介素 1 β (interleukin-

1 β , IL-1 β)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 8 (interleukin-8, IL-8) 等炎症因子可作用于胰岛 β 细胞, 导致 β 细胞凋亡, 抑制胰岛素信号转导, 促进糖尿病的发生; 转化生长因子 1 (transforming growth factor β 1, TGF- β 1) 水平在高血糖环境中会持续升高, 且诱导导

[基金项目] 国家自然科学基金 (81460494); 宁夏高等学校科学研究项目 (NGY2013072); 2017 年宁夏医科大学青年学术骨干人才后备培养项目 (National Natural Science Foundation of China, 81460494; Scientific Research Project of Higher Schools in NingXia, NGY2013072; Project for Youth Academic Backbone of NingXia Medical University in 2017)。

[作者简介] 王凌霄 (1992—), 女, 硕士生, 电子信箱: wanglingxiao92@163.com。

[通信作者] 蔡慧珍, 电子信箱: xingcao_c@sina.com。



常纤维生长导致糖尿病肾病的发生^[6]；而抑炎因子白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 则可通过保护胰腺细胞, 修复胰岛素信号通路, 抑制 IL-6 生成而延缓糖尿病的发生^[7]。

枸杞多糖 (*Lycium barbarum polysaccharide*, LBP) 是枸杞的主要活性成分之一。前期的人群试验发现, LBP 能够抑制 T2DM^[8] 或代谢综合征^[9] 患者的肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平, 促进胰岛素分泌^[10-12]。为研究 LBP 抑制 TNF- α 的机制, 本课题组利用髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, *MyD88*) 基因敲除 (*MyD88*^{-/-}) 小鼠建立了 T2DM 模型, 以观察 *MyD88* 非依赖性通路在该过程中的作用。*MyD88* 是 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 信号通路中的一个关键接头分子。TLR 可以通过 *MyD88* 依赖性通路及非依赖性通路激活核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 介导的炎症反应的发生^[13], 并在胰岛素抵抗及 T2DM 的发生中发挥重要作用^[14]。而前期研究^[15] 发现, 给予低水平的 LBP (20 mg/kg) 能够抑制 *MyD88*^{-/-} 小鼠非依赖性通路上的 Toll/IL-1R 结构域衔接蛋白 (Toll/IL-1R-domain-containing adaptor inducing interferon- β , *TRIF*)、*TRIF* 相关接头分子 (*TRIF*-related adaptor molecule, *TRAM*)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factors 6, *TRAF6*)、受体相互作用蛋白 1 (receptor-interacting protein 1, *RIPI*) 的基因表达, 对其蛋白表达及血清 TNF- α 水平变化无明显影响。

为进一步研究 LBP 对 *MyD88*^{-/-} T2DM 小鼠 IL-1 β 等其他炎症因子和 IL-10 抑炎因子的作用, 本研究继续采用 *MyD88*^{-/-} 小鼠建立的 T2DM 动物模型, 提高干预剂量浓度, 以观察 LBP 对其血清炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TGF- β 1 和抑炎因子 IL-10 的作用; 并利用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 细胞, 建立炎症模型, 观察 LBP 对 NF- κ B 的核转位和 NF- κ B 抑制蛋白 (inhibitor of NF- κ B, I κ B) 磷酸化的作用, 探讨 LBP 影响炎症因子生成的初步机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞和试剂

48 只 SPF 级雌性 *MyD88*^{-/-} 小鼠, 6 周龄, 体质量 (16 \pm 1) g, 购自南京大学模式动物研究所 [生产许可证号为 SCXK (苏) 2015-0001], 于宁夏医科大学实验动物中心饲养 [使用许可证号为 SYXK (宁) 2015-0001]。Raw264.7 细胞系由中国科学院上海细胞库提供。高脂饲

料 (北京华卓康生物科技股份有限公司), IL-1 β 、IL-6、IL-10、TGF- β 1 的 ELISA 试剂盒 (Ebioscience, 美国), IL-8 ELISA 试剂盒 (欣博盛生物科技有限公司), 二甲双胍 (北京中惠药业), DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (Biological Industries, 以色列), 胰蛋白酶 (Gibco, 美国)。NF- κ B、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、磷酸化 I κ B (p-I κ B)、I κ B 及肌动蛋白抗体 (Abcam, 英国)。LBP 为实验室自提^[16-18], 纯度为 77.38%, 其中蛋白含量约为总质量的 20.78%。

1.2 仪器与设备

酶标仪 (Thermo, 美国), 电泳仪、电转仪 (BIO-RAD, 美国), 化学发光成像仪 (Azure, 美国), 台式冷冻离心机 (Eppendorf, 德国), 血糖仪、血糖试纸 (长沙三诺生物传感股份有限公司)。

1.3 动物实验

48 只 *MyD88*^{-/-} 小鼠适应性喂养 1 周后, 随机取 8 只作为正常对照组, 给予维持饲料饲养。其余小鼠采用高脂饲料喂养 (脂肪、碳水化合物、蛋白质供能比分别为 45%、35%、20%, 由北京华卓康生物科技股份有限公司提供), 1 个月后采用链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 低剂量 (80 mg/kg) 连续腹腔注射 5 d 建立 T2DM 模型, 注射结束后 3 d, 监测小鼠血糖 (尾静脉取血)。由于 *MyD88*^{-/-} 小鼠为免疫缺陷鼠, 综合考虑小鼠的状态和 LBP 的降糖效应, 设置空腹血糖 ≥ 11.1 mmol/L 视为造模成功。将造模成功的模型小鼠随机分为模型组、二甲双胍组 (40 mg/kg)、低 LBP 组 (20 mg/kg)、中 LBP 组 (40 mg/kg)、高 LBP 组 (80 mg/kg), 每组 8 只小鼠; 继续采用高脂饲料喂养, 并采用等体积不同质量浓度的相应药物按剂量每日灌胃给药, 正常对照组及模型组均灌胃给予等体积的无菌饮用水, 干预 3 个月。分别于干预前后记录各组小鼠的体质量和血糖值。

末次给药后 1 h, 采用摘眼球取血法收集小鼠血液。ELISA 法测定小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TGF- β 1 和 IL-10 水平。

1.4 体外实验

1.4.1 检测 NF- κ B 的核转位 将 Raw264.7 细胞用含 10% 热灭活胎牛血清的高糖 DMEM 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 环境下培养。待细胞长至 90% 贴壁时, 用 0.25% 胰酶消化, 将细胞接种于 15 个 60 mm 细胞培养皿中, 约 5.2×10^6 /皿。设立空白对照组、LPS 组、LBP 干预组 (分别设低、中、

高 3 个浓度组, 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$), 每组 3 个皿。空白对照组加入 2 mL DMEM 完全培养基; LPS 组加入 2 mL 含 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 的完全培养基培养 30 min; LBP 干预组分别用含不同浓度 LBP 的完全培养基预孵育细胞 1 h 后, 再加入 LPS (终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$) 培养 30 min。分别收取细胞核蛋白和细胞质蛋白, Western blotting 检测 NF- κB 核转位的变化。

1.4.2 检测 p-I κB 、I κB 蛋白的表达 将 Raw264.7 细胞接种至 60 mm 培养皿后, 采用 1.4.1 的方法进行分组, 仅将 LPS 处理时间改为 5 min。收取细胞蛋白, Western blotting 检测各组细胞 p-I κB 、I κB 蛋白的表达水平。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计处理。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 LBP 干预前后小鼠体质量和血糖的变化

药物干预前各组小鼠体质量间差异无统计学意义 (表 1)。干预 3 个月后, 正常对照组小鼠体质量较干预前显著增加 ($P<0.05$), 其余各组小鼠体质量与干预前相比差异无统计学意义 (均 $P>0.05$)。且干预后正常对照组小鼠的体质量高于其他各组 (均 $P<0.05$), 而其他各组之间体质量差异无统计学意义 ($P>0.05$) (表 1)。

表 1 LBP 干预前后小鼠的体质量 (g)
Tab 1 Weights of mice before and after LBP intervention (g)

组别	干预前	干预后
正常对照组	20.78 \pm 0.78	22.67 \pm 1.22 ^①
模型组	19.86 \pm 1.25	19.71 \pm 2.29 ^②
二甲双胍组	19.63 \pm 1.19	20.50 \pm 1.73 ^③
低 LBP 组	19.94 \pm 1.37	19.63 \pm 1.19 ^④
中 LBP 组	19.56 \pm 1.27	19.75 \pm 1.83 ^⑤
高 LBP 组	20.38 \pm 2.15	20.33 \pm 1.72 ^⑥

注: ^① $P=0.001$, 与本组干预前比较; ^② $P=0.002$, ^③ $P=0.046$, ^④ $P=0.001$, ^⑤ $P=0.015$, 与正常对照组比较。

药物干预前各组小鼠血糖值均显著高于正常对照组 (均 $P<0.05$)。采用二甲双胍干预后小鼠血糖较模型组显著下降 ($P<0.05$), 但各浓度 LBP 干预对 *MyD88*^{-/-} 小鼠的血糖无明显影响 (表 2)。

表 2 LBP 干预前后 *MyD88*^{-/-} T2DM 小鼠血糖值 (mmol/L)

Tab 2 Blood glucose values of *MyD88*^{-/-} T2DM mice before and after LBP intervention (mmol/L)

组别	干预前	干预后
正常对照组	7.22 \pm 0.65	8.63 \pm 0.92
模型组	14.86 \pm 3.42 ^①	21.76 \pm 6.71 ^{②③}
二甲双胍组	15.45 \pm 2.99 ^④	11.78 \pm 2.03 ^{⑤⑥}
低 LBP 组	15.44 \pm 2.52 ^⑦	25.70 \pm 2.47 ^{⑧⑨⑩}
中 LBP 组	15.56 \pm 3.45 ^⑪	23.44 \pm 5.20 ^{⑫⑬}
高 LBP 组	14.75 \pm 2.04 ^⑭	19.37 \pm 8.45 ^⑮

注: ^① $P=0.000$, 与正常对照组比较; ^② $P=0.000$, 与模型组比较; ^③ $P=0.000$, ^④ $P=0.005$, 与二甲双胍组比较; ^⑤ $P=0.039$, ^⑥ $P=0.012$, ^⑦ $P=0.000$, ^⑧ $P=0.003$, 与本组干预前比较。

2.2 LBP 对小鼠血清促炎症因子的影响

模型组血清 IL-8 和 TGF- β 1 水平与正常对照组相比显著升高 (均 $P<0.05$), IL-1 β 和 IL-6 水平略有升高, 但差异无统计学意义 (均 $P>0.05$); 二甲双胍干预后小鼠血清 TGF- β 1 水平下降, 其余细胞因子与模型组相比差异无统计学意义 (均 $P>0.05$)。采用 LBP 干预后, 低、中 LBP 组的小鼠血清 IL-1 β 和 TGF- β 1 与模型组、正常对照组相比下降, 且差异有统计学意义 ($P<0.05$); 高 LBP 组 IL-6 水平高于二甲双胍组, 与模型组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$); 3 个 LBP 组的 IL-8 水平均低于二甲双胍组, 与模型组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$) (表 3)。

表 3 LBP 干预后 *MyD88*^{-/-} T2DM 小鼠血清促炎症因子的表达水平 (pg/mL)
Tab 3 Levels of pro-inflammatory factors in *MyD88*^{-/-} T2DM mice after LBP intervention (pg/mL)

组别	IL-1 β	IL-6	IL-8	TGF- β 1
正常对照组	11.99 \pm 1.02	32.13 \pm 5.83	195.50 \pm 7.25	213.68 \pm 18.43
模型组	14.49 \pm 2.11	43.19 \pm 11.61	251.44 \pm 29.74 ^①	255.86 \pm 25.33 ^{②③}
二甲双胍组	16.92 \pm 1.34 ^④	39.58 \pm 6.51	286.96 \pm 37.63 ^⑤	220.70 \pm 26.05 ^⑥
低 LBP 组	9.32 \pm 1.18 ^{⑦⑧}	47.53 \pm 11.46	244.88 \pm 9.07 ^{⑨⑩}	130.48 \pm 12.54 ^{⑪⑫}
中 LBP 组	7.16 \pm 1.32 ^{⑬⑭}	51.86 \pm 4.25 ^⑮	243.63 \pm 20.11 ^{⑯⑰}	88.41 \pm 6.83 ^{⑱⑲}
高 LBP 组	14.56 \pm 3.54	54.75 \pm 10.82 ^⑳	233.94 \pm 24.67 ^{㉑㉒}	233.36 \pm 28.36

注: IL-1 β 中, ^① $P=0.007$, ^② $P=0.008$, 与正常对照组比较; ^③ $P=0.005$, ^④ $P=0.000$, 与模型组比较; ^⑤ $P=0.000$, 与二甲双胍组比较。IL-6 中, ^⑥ $P=0.010$, ^⑦ $P=0.004$, 与正常对照组比较; ^⑧ $P=0.028$, 与二甲双胍组比较。IL-8 中, ^⑨ $P=0.003$, ^⑩ $P=0.000$, ^⑪ $P=0.008$, ^⑫ $P=0.015$, ^⑬ $P=0.032$, 与正常对照组比较; ^⑭ $P=0.030$, ^⑮ $P=0.035$, ^⑯ $P=0.008$, 与二甲双胍组比较。TGF- β 1 中, ^⑰ $P=0.015$, ^⑱ $P=0.000$, 与正常对照组比较; ^⑲ $P=0.036$, ^⑳ $P=0.000$, 与模型组比较; ^㉑ $P=0.036$, ^㉒ $P=0.000$, 与二甲双胍组比较。

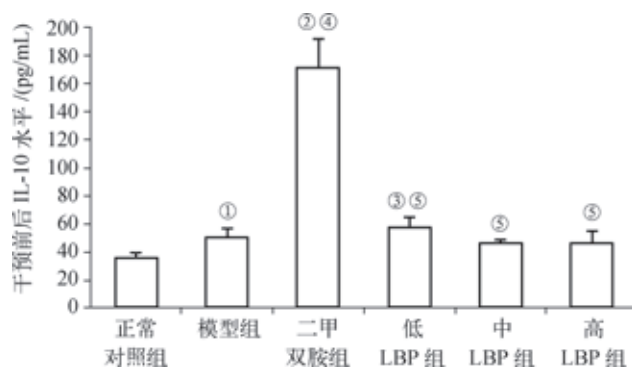
2.3 LBP 对小鼠血清抗炎症因子的影响

模型组 IL-10 水平与正常对照组相比显著升高 ($P<0.05$)。二甲双胍干预后小鼠血清 IL-10 水平较模型组

明显升高 ($P<0.05$)。LBP 干预后 IL-10 水平均显著低于二甲双胍组 (均 $P<0.05$)，与模型组比较，差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$) (图 1)。

2.4 LBP 对 Raw264.7 细胞 NF-κB 核转位的影响

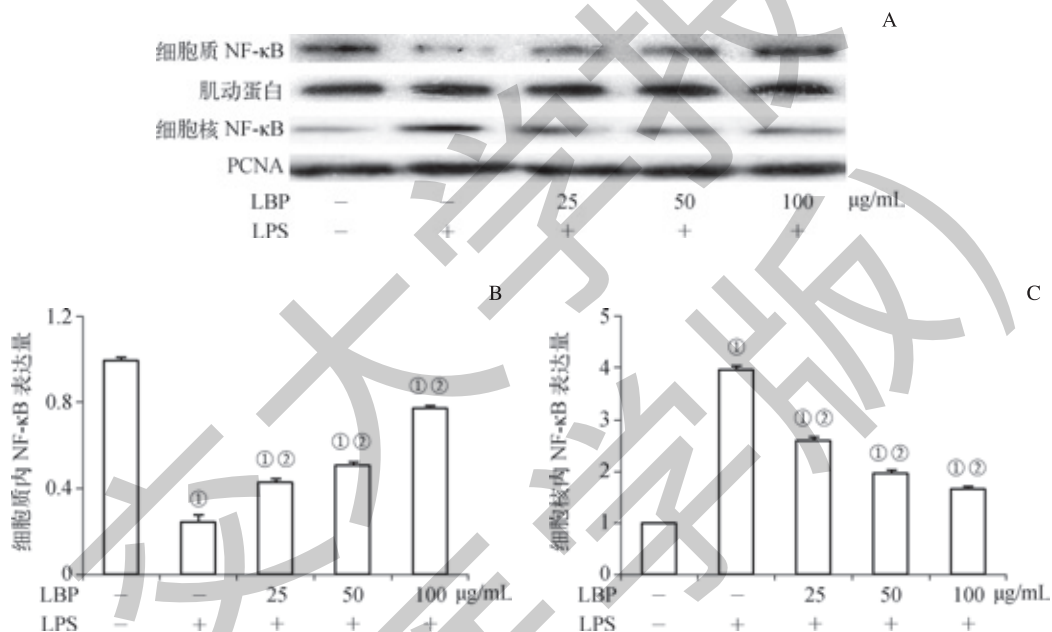
用 LPS 刺激 Raw264.7 细胞后，细胞质内 NF-κB 水平较空白对照组明显降低 ($P<0.05$)，同时胞核内 NF-κB 表达明显增多 ($P<0.05$)，表明 LPS 可促进细胞质内 NF-κB 向胞核内移动。LBP 干预后，细胞质内 NF-κB 水平明显增加，而胞核内水平显著降低，且呈现剂量依赖关系。这表明 LBP 能够抑制 NF-κB 的核转位 (图 2)。



注：① $P=0.043$ ，② $P=0.000$ ，③ $P=0.005$ ，与正常对照组比较；④ $P=0.000$ ，与模型组比较；⑤ $P=0.000$ ，与二甲双胍组比较。

图 1 LBP 干预前后小鼠血清抗炎因子水平

Fig 1 Levels of anti-inflammatory factors in mice before and after LBP intervention



注：A. 蛋白条带；B. 细胞质内 NF-κB 蛋白相对水平；C. 细胞核内 NF-κB 蛋白相对水平。① $P=0.000$ ，与空白对照组比较；② $P=0.000$ ，与 LPS 模型组比较。

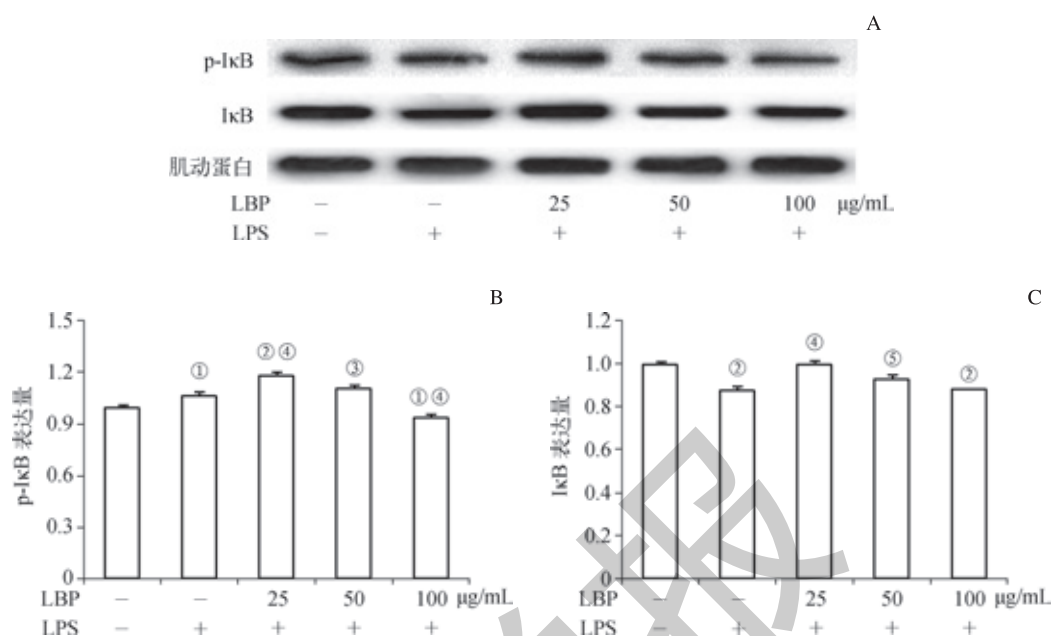
图 2 细胞质和细胞核内 NF-κB 蛋白相对水平

Fig 2 Relative levels of NF-κB protein in the cytoplasm and nucleus

2.5 LBP 对 Raw264.7 细胞内 p-IκB、IκB 蛋白水平的影响

进一步检测 Raw264.7 细胞内 p-IκB、IκB 蛋白水平发现，LPS 能够促使 IκB 发生磷酸化，从而降低细胞内游离

IκB 的水平。采用 LBP 干预后，25 μg/mL LBP 可以增强 LPS 的促 IκB 磷酸化作用，但游离 IκB 水平亦显著高于 LPS 组 (均 $P<0.05$)；而 100 μg/mL LBP 干预组则显著抑制了 LPS 的促 IκB 磷酸化作用 (均 $P<0.05$) (图 3)。



注: A. 蛋白条带; B. p-IκB 蛋白相对水平; C. IκB 蛋白相对水平。① $P=0.019$, ② $P=0.000$, ③ $P=0.001$, 与空白对照组比较; ④ $P=0.000$, ⑤ $P=0.004$, 与 LPS 组比较。

图 3 p-IκB 和 IκB 蛋白相对水平

Fig 3 Relative levels of p-IκB and IκB proteins

3 讨论

MyD88 在传递上游信息和多种疾病的发生发展中具有重要的作用。有研究表明特异性敲除 *MyD88* 基因, 可以负向调节肥胖的形成。如向宇飞^[19]发现高脂饲料喂养的 *MyD88*^{-/-} 小鼠血糖迅速升高, 虽然其具有腹型肥胖的突出特点, 但体重质量改变不明显。本次研究造模前后 *MyD88*^{-/-} 小鼠体质量变化不明显, 仅血糖升高, 进一步证实敲除 *MyD88* 基因对肥胖有负向调节作用。LBP 干预后血糖无改变, 说明在本次研究的剂量浓度和作用时间下, LBP 对于 *MyD88*^{-/-} T2DM 小鼠无降血糖的作用。

MyD88 介导的信号途径在高脂饮食诱导全身性炎症反应及代谢性炎症疾病发生发展的过程中具有重要地位^[20]。它可以介导 MyD88 依赖性通路诱导 NF-κB 的表达, 刺激炎症因子的生成。*MyD88* 基因敲除后, 小鼠的 TNF-α 和 IL-1β 分泌水平降低^[21], 胰岛体积显著缩小, 胰岛质量亦减少^[22]。高脂饲料喂养, 其 TNF-α、IL-6 和 IL-17 水平升高^[19]。采用 STZ 腹腔注射普食喂养的 *MyD88*^{-/-} 小鼠会表现出比正常小鼠更加严重的胰腺和肝脏损伤^[14]。本研究采用高脂饲料喂养加小剂量 STZ 造模后, 模型组小鼠的血清 IL-8 和 TGF-β1 升高。采用二甲双胍干预后, 小鼠血清 TGF-β1 下降, IL-1β、IL-6 和 IL-8 与模型组相比无明显变化。这可能与二甲双胍抗炎的机制^[23-25]有关。由于小鼠的 *MyD88* 基因被敲除, 二甲双胍

激活 AMP 依赖的蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 后无法对 MyD88 依赖性途径产生抑制, 这可能是二甲双胍对 *MyD88*^{-/-} 小鼠血清炎症因子的抑制作用较弱的原因。本次研究中给予 *MyD88*^{-/-} T2DM 小鼠 LBP 干预后, 低、中 LBP 组的 IL-1β、IL-8 和 TGF-β1 水平较二甲双胍组明显降低, 同时 IL-1β 和 TGF-β1 较模型组也显著降低。说明 LBP 可以降低 *MyD88*^{-/-} T2DM 小鼠血清中的 IL-1β 和 TGF-β1 水平, 对 IL-8 也有一定的抑制作用。

IL-10 是一种抗炎因子, 主要由单核细胞、淋巴细胞产生。IL-10 在机体免疫系统中主要具有免疫调节和抗炎作用, 可以通过活化巨噬细胞起到抑制其他促炎症因子的作用^[26]。有研究^[7]证明, IL-10 可通过保护胰腺细胞, 修复胰岛素信号通路, 抑制 IL-6 生成而延缓糖尿病的发生。在本实验中, 给予 LBP 干预后小鼠血清 IL-10 水平较正常对照组升高, 但与模型组相比没有明显差异, 说明 LBP 对抗炎症因子 IL-10 水平作用不显著。

在前期 LBP 对 *MyD88*^{-/-} 小鼠非依赖性通路影响的研究^[15]中, 我们发现 LBP 能够影响 MyD88 非依赖性通路上的 *Tram*、*Trif*、*Traf6*、*Rip1* 的基因表达, 但对其蛋白表达无影响。那么 LBP 是如何影响 *MyD88*^{-/-} T2DM 小鼠的其他炎症因子和抗炎因子的水平呢? NF-κB 是细胞因子诱导的主要转录因子, 可以调控多种炎症因子的转录过程。在静息状态下, NF-κB 位于细胞质中, 与 IκB 结合呈

非活性状态。当受到外界刺激(如 LPS 的作用)时, I κ B 被磷酸化, NF- κ B 被激活, NF- κ B 从细胞质转位进入细胞核, 进而与转录的目的基因结合, 促进目的基因(如炎症因子)的转录^[27-28]。在经典的通路中, 多条信号通路最终汇聚并激活 I κ B 激酶(IKK)复合体, 导致 I κ B 蛋白位点特异性磷酸化并降解, 从而释放出 NF- κ B。因此利用体外试验, 我们研究了 LBP 对 NF- κ B 核转位的作用和对 p-I κ B、I κ B 蛋白表达的影响。研究表明, 经 LPS 诱导后细胞质内 NF- κ B 转移进入细胞核数量增加。在给予 LBP 干预后, NF- κ B 由细胞质转移进入细胞核的转移率明显降低; 低浓度 LBP 干预组细胞内 p-I κ B 与 I κ B 表达量均

较 LPS 组细胞内表达量明显增加, 但随着 LBP 浓度增加 p-I κ B 与 I κ B 表达量又逐渐减少。这提示随浓度的增加, LBP 能够显著抑制 LPS 诱导的 p-I κ B 增加, 减少 NF- κ B 的核转位, 进而抑制其下游因子的基因转录, 发挥抑制炎症的作用。

综合以上结果表明, LBP 可以使 *MyD88*^{-/-} T2DM 小鼠部分促炎症因子水平降低, 且 LBP 在 Raw264.7 细胞中可抑制炎症状态下 I κ B 磷酸化, 减少 NF- κ B 的核转位。由此我们推测, LBP 对 *MyD88*^{-/-} T2DM 小鼠体内炎症因子的调节作用可能与其弱化巨噬细胞 I κ B 磷酸化、抑制 NF- κ B 由细胞质向细胞核内转移有关。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Koutoungelos K, Papageorgiou CC, Paptis AE, et al. Cytokines, diabetes mellitus and psychopathology: a challenging combination[J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2014, 35(2): 159-169.
- [2] Park YJ, Warnock GL, Ziliang AO, et al. Dual role of interleukin-1 β in islet amyloid formation and its β -cell toxicity: implications for type 2 diabetes and islet transplantation[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2017, 19(5): 682-694.
- [3] Esser N, Paquot N, Scheen AJ. Anti-inflammatory agents to treat or prevent type 2 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular disease[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2015, 24(3): 283-307.
- [4] Giacomelli R, Ruscitti P, Alvaro S, et al. IL-1 β at the crossroad between rheumatoid arthritis and type 2 diabetes: may we kill two birds with one stone?[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2016, 12(8): 849-855.
- [5] 崔思远, 李芳. IL-6 与 2 型糖尿病关系的研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2012, 24(11): 1051-1054.
- [6] Kim D, Kang JM, Park SH, et al. Diabetes aggravates post-ischaemic renal fibrosis through persistent activation of TGF- β 1 and Shh Signalling[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 16782.
- [7] Wang Z, Shen X, Feng W, et al. Analysis of inflammatory mediators in prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes patients[J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016: 7965317.
- [8] 蔡慧珍, 刘福康, 芦慧霞, 等. 枸杞多糖对 2 型糖尿病病人的短期干预[J]. *食品科学*, 2012, 33(13): 259-262.
- [9] 张娜, 李琳, 高向晖, 等. 宁夏枸杞对代谢综合征患者 TNF- α 、NF- κ B 和 iNOS 水平的影响[J]. *中华疾病控制杂志*, 2014, 18(4): 286-289.
- [10] Cai H, Liu F, Zuo P, et al. Practical application of antidiabetic efficacy of *Lycium barbarum* polysaccharide in patients with type 2 diabetes[J]. *Med Chem*, 2015, 11(4): 383-390.
- [11] 蔡慧珍, 刘福康, 孙桂菊. 枸杞多糖对 β -TC6 细胞胰岛素分泌及相关基因的影响[J]. *江苏医药*, 2013, 39(4): 391-393.
- [12] 刘磊, 李青旺, 赵蕊, 等. 枸杞多糖对糖尿病小鼠胰岛细胞形态与功能的影响[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2008(3): 93-94.
- [13] 余益本, 王建平. TLR 信号通路研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(12): 1331-1334.
- [14] 朱亚军. Toll 样受体家族与高脂血症和胰岛素抵抗的相关性研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2014.
- [15] 刘婷婷, 王凌霄, 杨晓辉, 等. MyD88 非依赖性信号通路在枸杞多糖抑制糖尿病小鼠肿瘤坏死因子 α 中的作用[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2018, 47(1): 35-40.
- [16] 高春燕. 枸杞多糖的提取分离技术及其特性研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2006.
- [17] 许金霞. 枸杞多糖的制备及其活化巨噬细胞机理的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [18] 刘源才, 孙细珍, 许银, 等. 枸杞多糖组成及含量测定方法的改进[J]. *食品科学*, 2013, 34(12): 292-295.
- [19] 向宇飞. 糖尿病人群及高脂饮食肥胖小鼠的免疫代谢学研究[D]. 长沙: 中南大学, 2011.
- [20] 虞敏佳. MyD88 在特定细胞型中对肥胖相关炎症疾病进展的作用[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [21] Shen H, Wu N, Wang Y, et al. *MyD88* gene knockout attenuates paraquat-induced acute lung injury[J]. *Toxicol Lett*, 2017, 269: 41-46.
- [22] Bollyky PL, Bice JB, Sweet IR, et al. The Toll-like receptor signaling molecule Myd88 contributes to pancreatic β -cell homeostasis in response to injury[J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5063.
- [23] Borowska M, Dworacka M, Wesolowska A, et al. The impact of pharmacotherapy of type 2 diabetes mellitus on IL-1 β , IL-6 and IL-10 secretion[J]. *Pharmacology*, 2016, 97(3-4): 189-194.
- [24] 秦凤, 李春亮, 张惠莉. 二甲双胍对 2 型糖尿病模型大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2017(12): 1909-1914.
- [25] Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin[J]. *Diabetologia*, 2017, 60(9): 1577-1585.
- [26] Sharma AK, Raikwar SK, Kurmi MK, et al. Gemfibrozil and its combination with metformin on pleiotropic effect on IL-10 and adiponectin and anti-atherogenic treatment in insulin resistant type 2 diabetes mellitus rats[J]. *Inflammopharmacology*, 2013, 21(2): 137-145.
- [27] Albert S, Baldwin J. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights[J]. *Annu Rev Immunol*, 1996, 14: 649-683.
- [28] Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(8): 695-708.

[收稿日期] 2018-09-13

[本文编辑] 瞿麟平

