

PAD4 负向调控 TLR4/NF- κ B 信号通路缓解脂肪组织炎症

张新悦^{1,2}, 程怡^{1,2}, 郑文祥², 翟俏丽^{2#}, 相新新^{2#}

(1. 山东第二医科大学 临床医学院, 潍坊 261053; 2. 淄博市中心医院 转化医学中心, 淄博 255036)

摘要: 为了研究 4 型肽基精氨酸脱亚胺酶(peptidyl arginine deimidase type 4, PAD4)在炎症脂肪组织中的作用及机制, 分别提取 db/db[II 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)组]、db/m(T2DM 对照组)、ob/ob(肥胖组)和 ob/c(肥胖对照组)4 组小鼠皮下和内脏脂肪组织, 免疫组化技术检测 PAD4 在 T2DM 和肥胖小鼠皮下和内脏脂肪组织中的表达情况; LPS 刺激野生型小鼠原代腹腔巨噬细胞和小鼠巨噬细胞系 RAW264.7, qRT-PCR 和 Western blotting 检测两种细胞中 PAD4、炎性因子 TNF- α 和 IL-6 的表达以及 NF- κ B 信号通路的激活情况。结果显示, 与 db/m、ob/c 两组小鼠相比, db/db、ob/ob 两组小鼠中皮下和内脏脂肪组织、经 LPS 刺激的小鼠原代腹腔巨噬细胞和 RAW264.7 细胞中 PAD4 的表达均降低, 炎性因子 TNF- α 和 IL-6 的表达均明显升高; 同时 TLR4/NF- κ B 信号通路激活。该研究表明 PAD4 在炎症状态下(T2DM 和肥胖)的皮下和内脏脂肪组织中表达下降, 并与 TLR4/NF- κ B 信号通路激活呈负相关。

关键词: 肽基精氨酸脱亚胺酶; 炎症; 脂肪组织; II 型糖尿病; 肥胖

中图分类号: R589.2; R392.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(XXXX)XX-0001-12

II 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一种系统性炎症疾病, 这种慢性低度炎症反应以多种免疫细胞和炎性因子介导为主要特征^[1]。4 型肽基精氨酸脱亚胺酶(peptidyl arginine deimidase type 4, PAD4)属于 PAD 家族, 能催化蛋白质精氨酸残基转为瓜氨酸^[2]。蛋白质的瓜氨酸化属于翻译后修饰, 这一过程会对自身免疫性疾病等疾病产生影响^[3]。在既往的研究中发现 T2DM 患者中性粒细胞 PAD4 表达升高^[4], 中性粒细胞和巨噬细胞在 T2DM 和肥胖发生过程中参与了机体复杂的炎症反应, 其中巨噬细胞在脂肪组织的浸润使脂肪组织长期保持低度炎症状态^[5]。靶向炎症途径是预防和控制 T2DM 以及肥胖研究内容中的一个重要分支, 但 PAD4 在炎症反应中所发挥的作用目前尚不明确。基于此, 本研究探讨 PAD4 在 T2DM 和肥胖过程中可能存在的生物学功能和 PAD4 在脂肪组织巨噬细胞中的作用, 以及对脂肪组织炎症的影响及可能存在的机制。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 db/m、db/db、ob/c、ob/ob 和

C57BL/6J 小鼠购于北京唯尚立德生物科技有限公司。在淄博市中心医院转化医学中心的专用动物饲养房饲养小鼠, 环境温度约为 24 $^{\circ}$ C, 相对湿度约为 50%。选用 6 周龄雄性小鼠分组实验, 分为 T2DM 对照组 db/m 小鼠、T2DM 组 db/db 小鼠、肥胖对照组 ob/c 小鼠、肥胖小鼠 ob/ob、C57BL/6J 实验小鼠。每组 6 只, 保持在 12 h 光照/12 h 黑暗循环, 并可自由获得水和食物。所有实验均经淄博市中心医院伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂 高糖 DMEM 培养基、FBS 抗体、PAD4 抗体、TNF- α 抗体、IL-6 抗体、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)抗体、NF- κ B 抗体、p-NF- κ B 抗体购自 Abcam 公司, 总 RNA 抽提试剂盒、逆转录和 qRT-PCR 试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, β -actin 抗体购自天津三箭生物技术有限公司, PCR 引物由擎科公司合成。Cl-amidine 试剂购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物实验分组及造模取材 稳定喂养 db/m、ob/c、db/db、ob/ob、C57BL/6J 5 组实验小鼠(每组 6 只)1 周后注射麻醉并处死, 将脂肪组织和肝脏取出, 用于石蜡包埋和冷冻储存。

1.2.2 细胞培养 小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 购买自湖南丰晖生物公司, 培养体系为添加 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM/F12 培养基, 培养环境为 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂。

收稿日期: 2024-03-05

基金项目: 国家自然科学基金(81600695; 32201036); 山东省自然科学基金(ZR2021MC126)

作者简介: 张新悦(1996-), 女, 硕士生, 主要从事糖尿病、肥胖等代谢性疾病发病机制的相关研究

通信作者: 相新新(E-mail: xiangxinxin@bjmu.edu.cn); 翟俏丽(E-mail: zbszxyyzql@163.com); # 为共同通信作者

1.2.3 细胞提取、培养与 LPS 干预 处死小鼠并暴露其腹膜，抽取 8 mL PBS，注射至小鼠腹腔，静置 1 min，抽取腹腔灌洗液，离心后弃上清，重悬后再次离心，用含有 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基，在 37 °C，5% CO₂ 的细胞培养箱中分别培养小鼠原代腹腔巨噬细胞，每 3~4 天更换新鲜培养液。

1.2.4 免疫组织化学 将皮下和内脏脂肪组织的石蜡包埋切片脱蜡漂洗，5% BSA 封闭，加入 PAD4 抗体(1:100)，4 °C 孵育过夜，漂洗后加入二抗(1:100)，室温 1 h，漂洗后加入二氨基联苯胺显色液，在显微镜下观察。完全显色后，用超纯水洗，苏木素溶液染色，冲洗分化后，加入返蓝液，漂洗后将其依次放入 70% 乙醇、无水乙醇、正丁醇和二甲苯中，脱水，最后晾干封片，使用光学显微镜观察脂肪组织的形态和 PAD4 表达情况，并用 Image J 软件进行定量分析，对表达量进行比较。

1.2.5 Western blotting RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂提取 RAW264.7 细胞系、小鼠原代细胞总蛋白和 db/m、ob/c、db/db、ob/ob、C57BL/6J 5 组实验小鼠组织蛋白并检测蛋白浓度，进行 SDS-PAGE、转膜，5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h，PAD4、TNF- α 、IL-6、iNOS 的一抗 4 °C 过夜，次日回收一抗，洗膜缓冲液洗涤 3 次，每次 5 min；在室温下二抗孵育(1:3 000)，随后 ECL 化学发光，并用 Image J 软件定量分析蛋白质条带，计算相对表达量。

1.2.6 qRT-PCR Trizol 法提取细胞总 RNA，紫外分光光度法测定 RNA 的光密度[D(260 nm)]值和 D(280 nm)值，计算 RNA 含量，逆转录合成 cDNA，以 SYBR Green qPCR Master Mix 进行 qRT-PCR，引物序列见表 1。2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法比较目的基因相对丰度。

表 1 引物序列

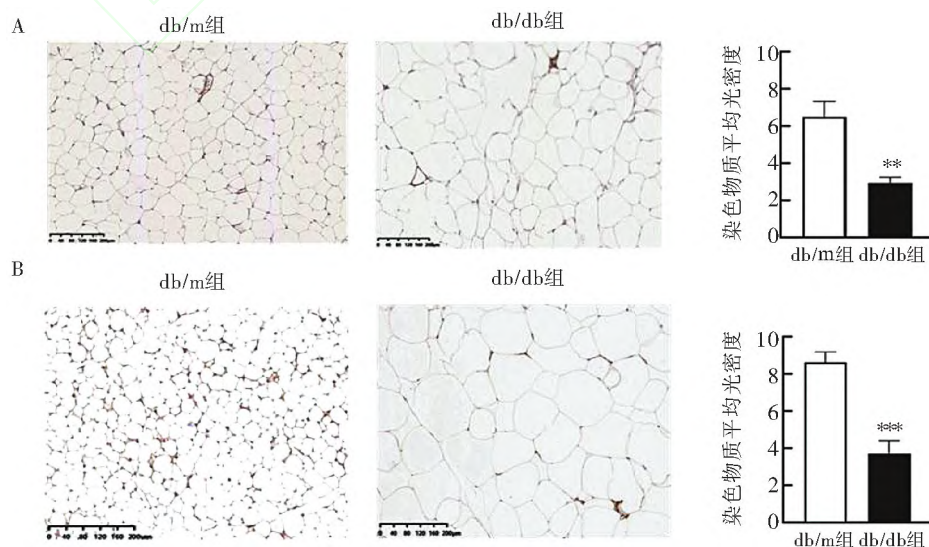
基因	引物序列
IL-6	正向 5-TGTGCAATGGCAATTCTGAT-3'
	反向 5-GGTACTCCAGAAGACCAGAGGA-3'
PAD4	正向 5- CTGCTGGAGTAACCGCTATT -3'
	反向 5- TGTGACCCGAAAGCTCTA -3'
iNOS	正向 5-GGTATGCTGTGTTTGGCCTT-3'
	反向 5-GCAGCCTCTTGTCTTTGACC-3'
TNF- α	正向 5- CCTGTAGCCCACGTCGTAG -3'
	反向 5- GGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'
β -actin	正向 5- GGCTGTATTCCCCTCCATCG -3'
	反向 5- CCAGTTGGTAACAATGCCATGT -3'

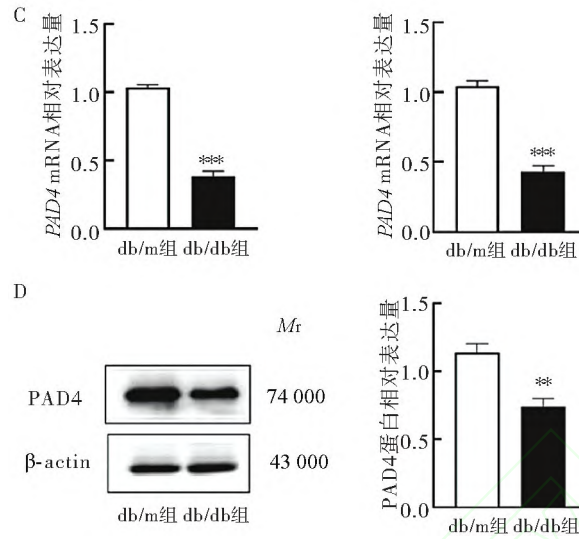
1.3 统计学处理 采用 SPSS 26.0、GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析和图表绘制。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用两独立样本 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析，检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 糖尿病小鼠的脂肪组织中 PAD4 表达降低

提取 6 周龄雄性 db/db 和 db/m 小鼠的皮下和内脏脂肪组织切片并进行免疫组化染色，结果显示，与 db/m 小鼠相比，db/db 小鼠的皮下脂肪组织和内脏脂肪组织中 PAD4 的表达量显著减少($P < 0.01$ ，图 1A、B)。与 db/m 小鼠相比，PAD4 在 db/db 小鼠的皮下和内脏脂肪组织中的 mRNA 表达水平显著降低($P < 0.001$ ，图 1C)。同时，PAD4 在 db/db 小鼠皮下脂肪组织中的蛋白表达量也显著降低($P < 0.01$ ，图 1D)。这些结果说明，PAD4 在糖尿病小鼠的脂肪组织中表达降低。



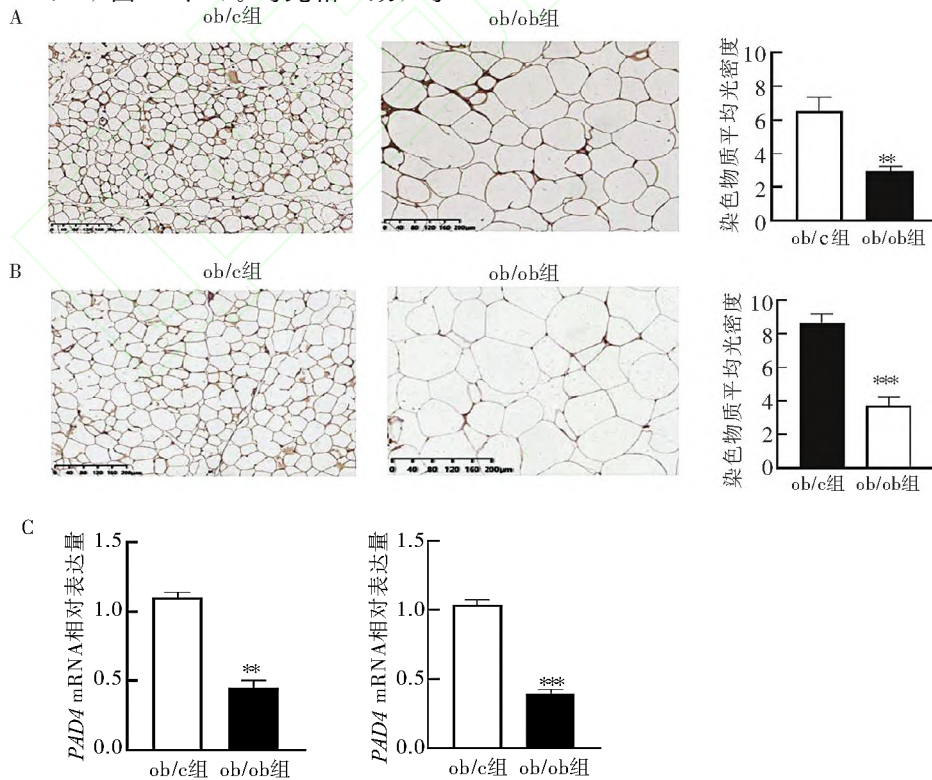


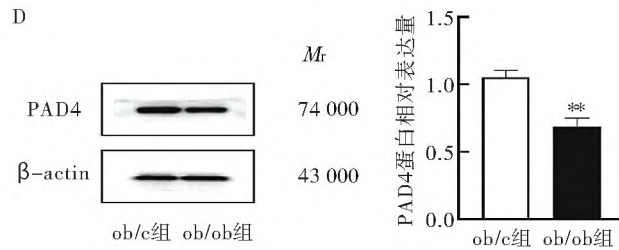
注：A. db/m 和 db/db 小鼠皮下脂肪组织 PAD4 免疫组化染色结果与定量分析($\times 200$, $n=6$)；B. db/m 和 db/db 小鼠内脏脂肪组织 PAD4 免疫组化染色结果与定量分析($\times 200$, $n=6$)；C. db/m 和 db/db 小鼠皮下、内脏脂肪组织中 PAD4 的 mRNA 表达水平及定量分析($n=6$)；D. db/m 和 db/db 小鼠皮下脂肪组织中 PAD4 的蛋白表达水平及定量分析($n=6$)。与对照组比较，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ 。

图 1 糖尿病小鼠脂肪组织中 PAD4 表达水平

2.2 肥胖小鼠脂肪组织中 PAD4 表达降低 提取 6 周龄雄性 ob/ob 肥胖小鼠和 6 周龄雄性 ob/c 对照小鼠的脂肪组织，免疫组化结果显示，ob/ob 肥胖小鼠的皮下脂肪和内脏脂肪组织中 PAD4 的表达量显著减少($P<0.01$ ，图 2A、B)。与此相一致，与

ob/c 相比，PAD4 在肥胖小鼠的脂肪组织中的 mRNA 和蛋白表达水平显著下降($P<0.001$ ，图 2C~F)。这些结果说明，和糖尿病小鼠相同，肥胖小鼠的脂肪组织中 PAD4 的表达降低。



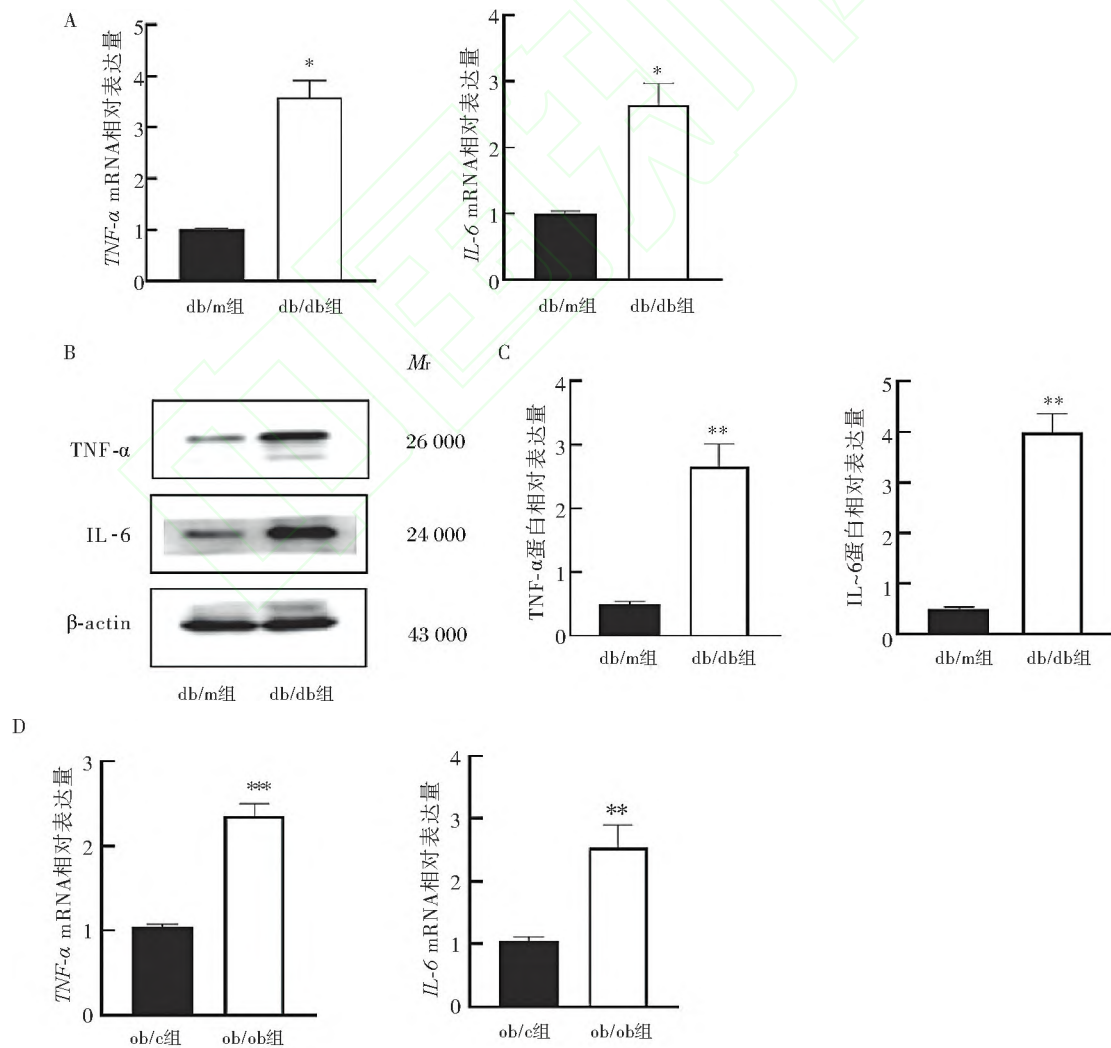


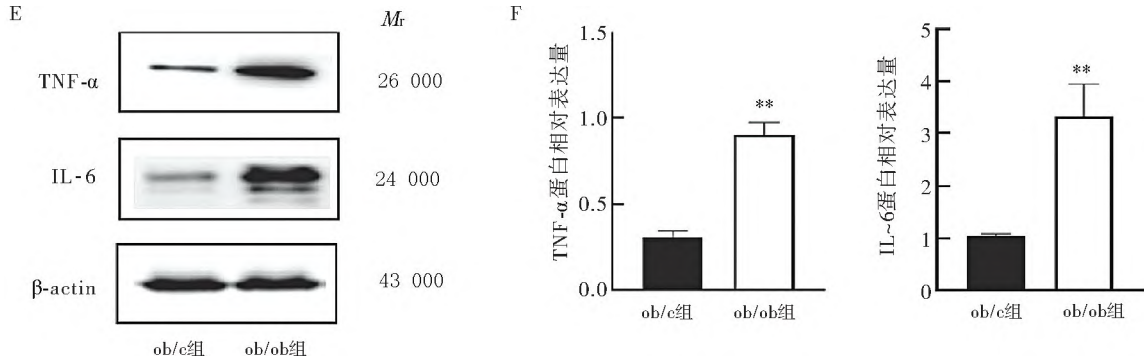
注: A. ob/c、ob/ob 小鼠皮下脂肪组织 PAD4 免疫组化染色结果及定量分析($\times 200$, $n=6$); B. ob/c、ob/ob 小鼠内脏脂肪组织 PAD4 免疫组化染色结果及定量分析($\times 200$, $n=6$); C. ob/c 和 ob/ob 小鼠皮下、内脏脂肪组织中 PAD4 的 mRNA 表达水平的定量分析($n=6$); D. ob/c 和 ob/ob 小鼠皮下脂肪组织中 PAD4 的蛋白表达水平、定量分析($n=6$)。与对照组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 2 肥胖小鼠脂肪组织中 PAD4 表达水平

2.3 肥胖小鼠和糖尿病小鼠脂肪组织炎症因子水平升高 既往的研究中都将糖尿病和肥胖视为 1 种慢性炎症^[6], 鉴于此, 本研究提取 db/db 小鼠、db/m 小鼠、ob/ob 小鼠和 ob/c 小鼠的皮下脂肪组织, 结果显示, 与 db/m、ob/c 小鼠相比, db/db、ob/

ob 小鼠皮下脂肪组织的促炎因子 TNF- α 、IL-6 分子的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高($P<0.05$, 图 3)。这些结果表明, 无论是肥胖小鼠还是糖尿病小鼠的脂肪组织均处于炎症浸润的状态。



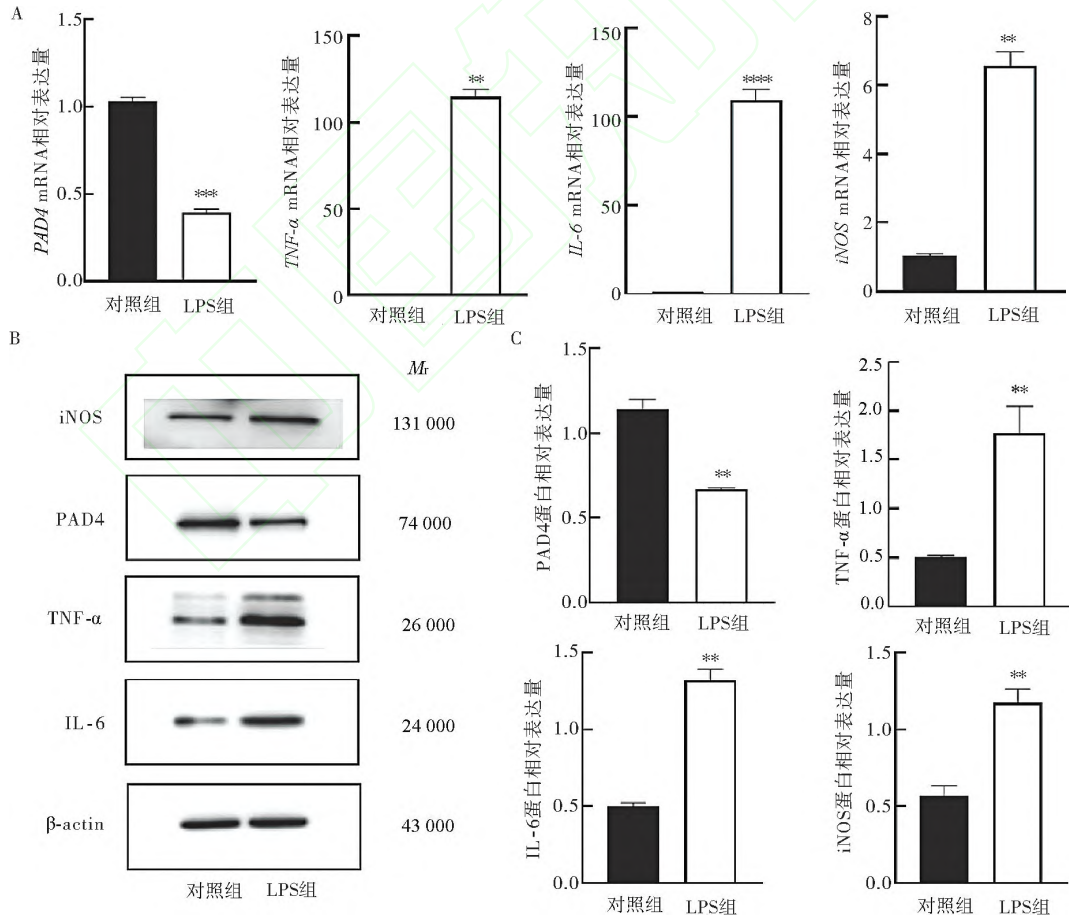


注: A. db/m 和 db/db 小鼠的皮下脂肪组织中 *TNF-α*、*IL-6* 的 mRNA 表达的定量分析($n=6$); B. db/m 和 db/db 小鼠的皮下脂肪组织中 *TNF-α*、*IL-6* 的蛋白表达水平($n=6$); C. db/m 和 db/db 小鼠的皮下脂肪组织中 *TNF-α*、*IL-6* 蛋白表达的统计分析; D. ob/c 和 ob/ob 小鼠的皮下脂肪组织中 *TNF-α*、*IL-6* 的 mRNA 表达的定量分析($n=6$); E. ob/c 和 ob/ob 小鼠的皮下脂肪组织中 *TNF-α*、*IL-6* 的蛋白表达水平($n=6$); F. ob/c 和 ob/ob 小鼠的皮下脂肪组织中 *TNF-α*、*IL-6* 的蛋白表达的统计分析。与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 3 肥胖小鼠和糖尿病小鼠脂肪组织 *TNF-α*、*IL-6* 表达水平

2.4 LPS 刺激的原代腹腔巨噬细胞中 PAD4 表达降低、促炎因子表达升高 在肥胖和糖尿病介导的脂肪组织炎症中,巨噬细胞发挥着重要作用。因此,本研究提取了 6 周龄野生型小鼠的腹腔巨噬细胞,并用 LPS($1 \mu\text{g/mL}$)刺激 6 h。结果显示,与空

白组相比,LPS 刺激组中 PAD4 的 mRNA 及蛋白表达均显著降低($P<0.01$,图 4),而炎症因子 *TNF-α*、*IL-6*、*iNOS* 的 mRNA 和蛋白表达均显著增加($P<0.05$,图 4)。

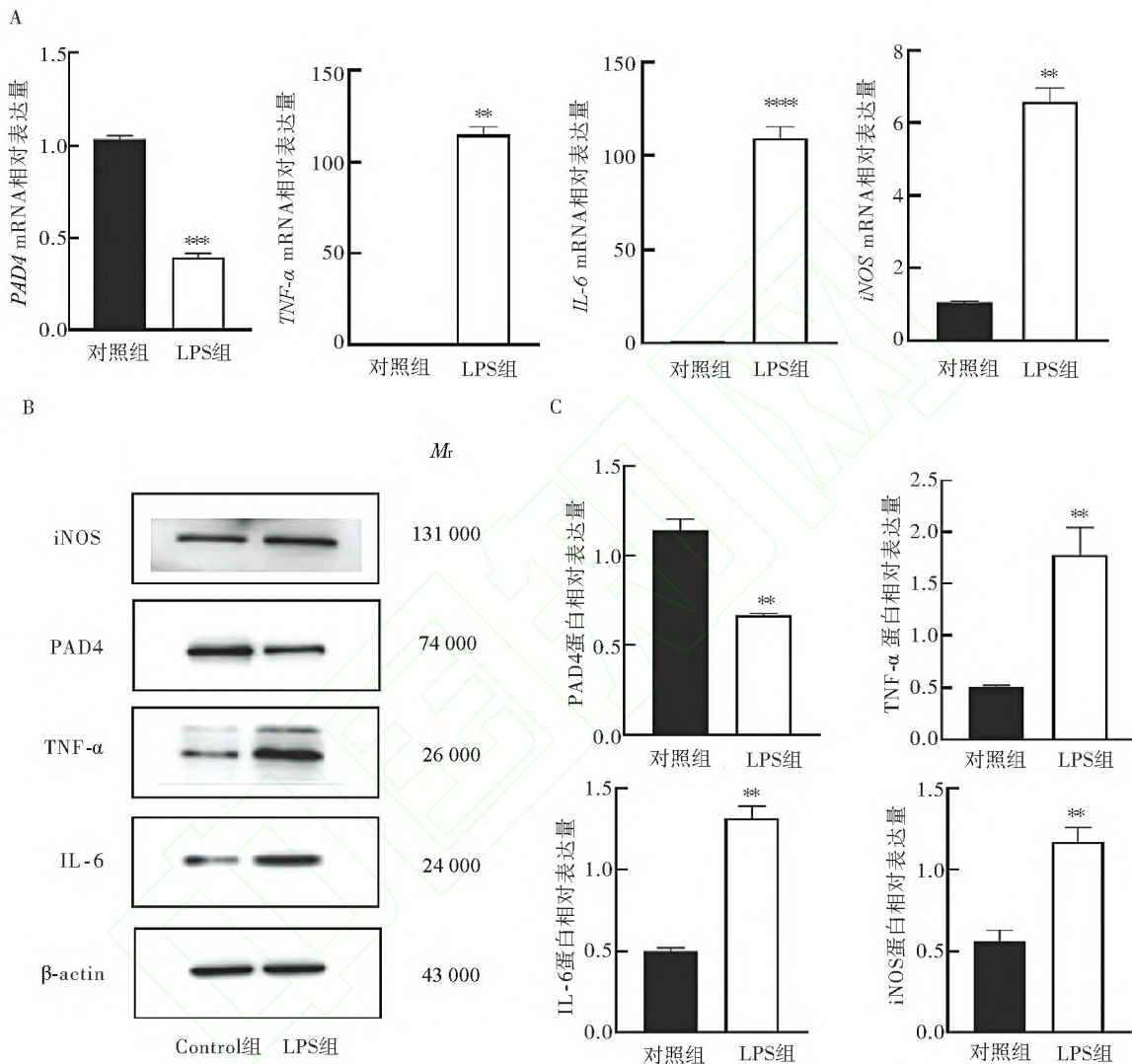


注: A. 原代腹腔巨噬细胞中 *PAD4*、*TNF-α*、*IL-6*、*iNOS* 的 mRNA 表达水平统计分析($n=3$); B. 原代腹腔巨噬细胞中 *PAD4*、*TNF-α*、*IL-6*、*iNOS* 的蛋白表达水平($n=3$); C. 原代腹腔巨噬细胞中 *PAD4*、*TNF-α*、*IL-6*、*iNOS* 的蛋白表达水平统计分析。与对照组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图 4 LPS 刺激前后原代腹腔巨噬细胞中 *PAD4*、*TNF-α*、*IL-6*、*iNOS* 表达水平变化

2.5 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中 PAD4 表达降低、促炎因子表达升高 与原代腹腔巨噬细胞的结果相一致, RAW264.7 细胞系经 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激 6 h 后, 与空白组相比, 经 LPS 刺激的 RAW264.7 中 PAD4 的 mRNA 和蛋白表达水平均

显著下降($P < 0.01$, 图 5)而促炎因子 TNF- α 、IL-6、iNOS 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著增加($P < 0.01$, 图 5)。上述结果说明, 在体外炎症浸润的巨噬细胞中 PAD4 表达含量下降。

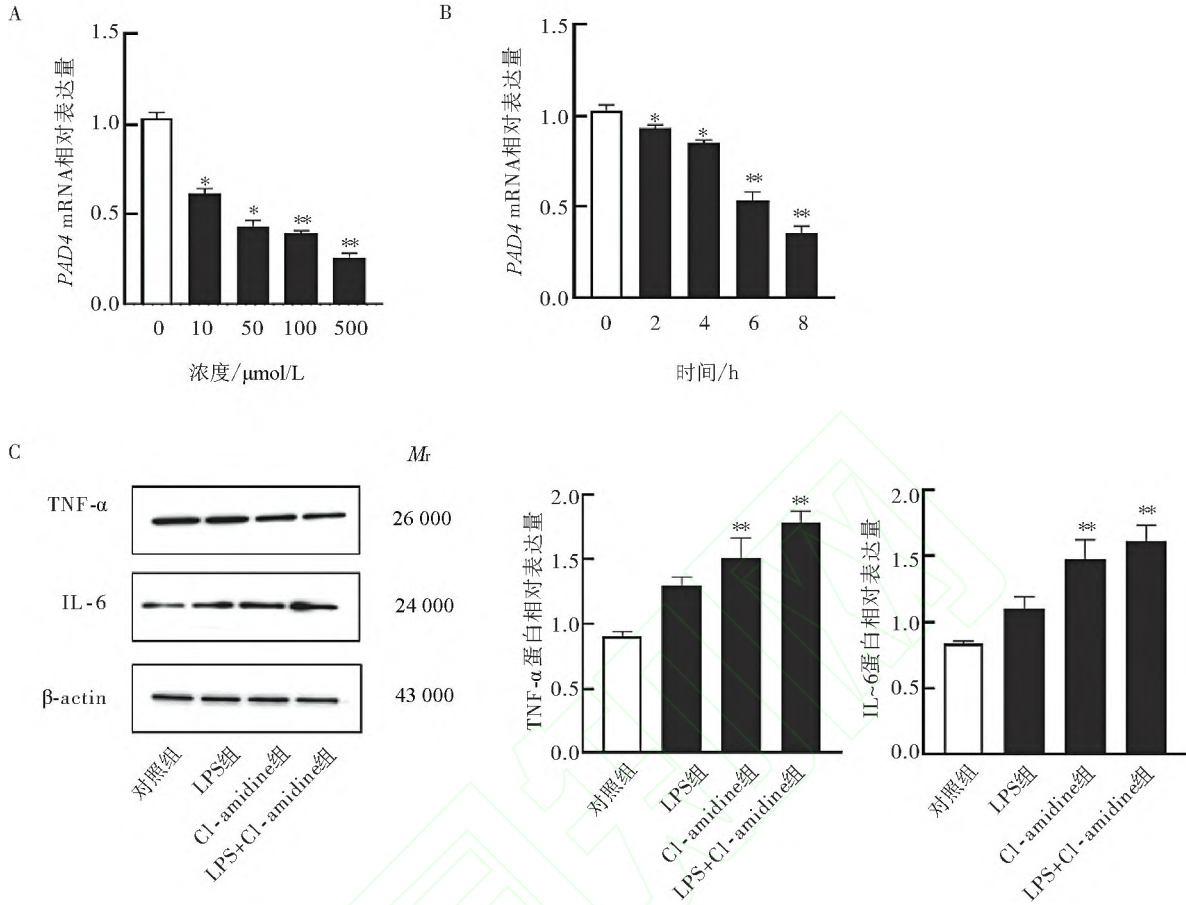


注: A. RAW264.7 细胞中 PAD4、TNF- α 、IL-6、iNOS 的 mRNA 表达水平统计分析($n=3$); B. RAW264.7 细胞中 PAD4、TNF- α 、IL-6、iNOS 的蛋白表达水平($n=3$); C. RAW264.7 细胞中 PAD4、TNF- α 、IL-6、iNOS 的蛋白表达水平统计分析。与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图 5 LPS 刺激前后原代腹腔巨噬细胞中 PAD4、TNF- α 、IL-6、iNOS 表达水平变化

2.6 抑制 PAD4 会促使促炎因子表达升高 为了明确 PAD4 表达量与炎性因子表达量之间的联系, 本研究进一步使用 PAD4 的抑制剂 Cl-amidine 阻断 PAD4 信号。结果显示, 在 Cl-amidine 浓度为 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 作用时间为 6 h 时, RAW264.7 细胞中

PAD4 的表达被显著抑制($P < 0.05$, 图 6A、B), 并且 PAD4 表达抑制后, 炎性因子 TNF- α 和 IL-6 的表达显著升高($P < 0.05$, 图 6C)。以上结果说明, 在巨噬细胞中 PAD4 可能抑制了炎性因子 TNF- α 、IL-6 的表达。

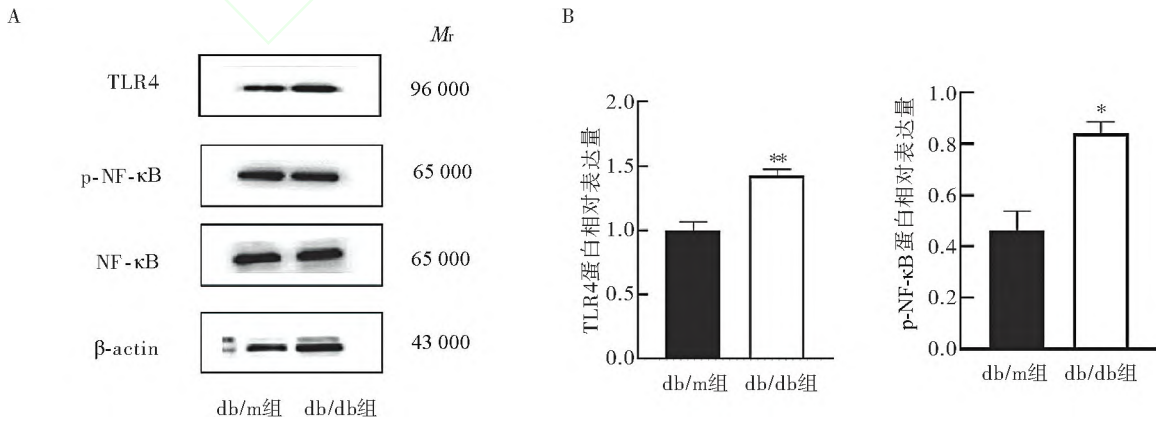


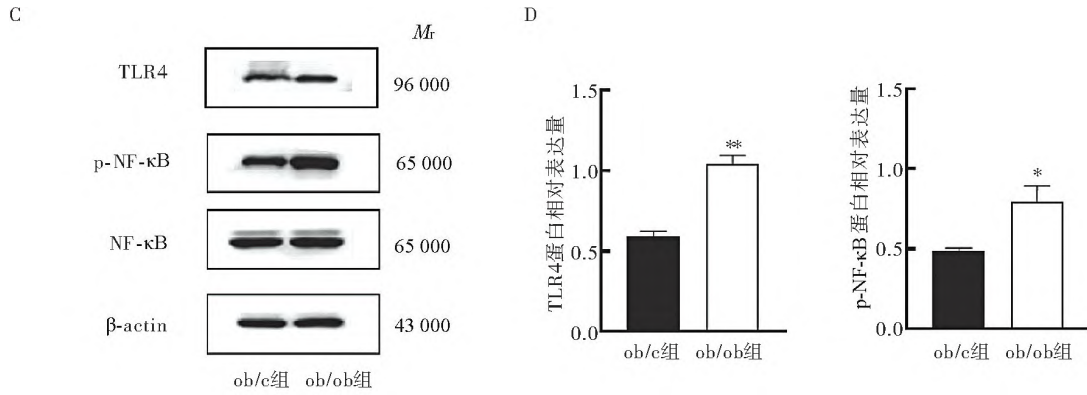
注：A. Cl-amidine 浓度梯度实验 ($n=3$)；B. Cl-amidine 时间梯度实验 ($n=3$)；C. LPS 刺激、Cl-amidine 处理和 LPS 协同 Cl-amidine 处理 RAW264.7 细胞中 TNF- α 、IL-6 的蛋白表达水平及统计分析 ($n=3$)。与对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 6 Cl-amidine 处理 RAW264.7 细胞后 PAD4、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 水平比较

2.7 糖尿病和肥胖小鼠的脂肪组织中 TLR4/NF- κ B 信号通路被激活 研究表明，巨噬细胞通过模式识别受体感知信号^[7]，LPS 可被 TLR 识别，并激活 NF- κ B 等转录因子^[8-9]。结果显示，与对照组

相比，db/db 和 ob/ob 小鼠的皮下脂肪组织中 TLR4 的蛋白表达量显著增高，NF- κ B 信号通路被激活 ($P<0.05$ ，图 7)。



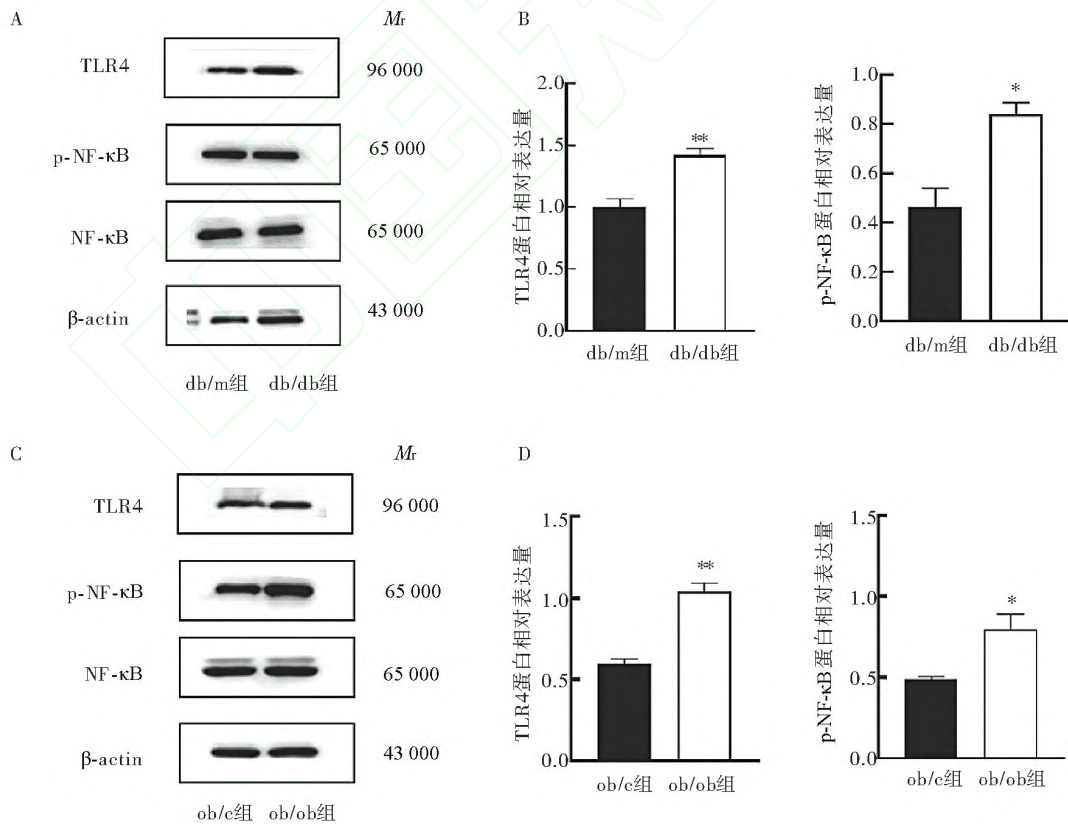


注: A. db/m 和 db/db 小鼠皮下脂肪组织中 TLR4、p-NF-κB、NF-κB 的蛋白表达水平 ($n=6$); B. db/m 和 db/db 小鼠皮下脂肪组织中 TLR4、p-NF-κB、NF-κB 的蛋白表达的定量分析; C. ob/c 和 ob/ob 小鼠的皮下脂肪组织中 TLR4、p-NF-κB、NF-κB 的蛋白表达水平 ($n=6$); D. ob/c 和 ob/ob 小鼠的皮下脂肪组织中 TLR4、p-NF-κB、NF-κB 蛋白表达的定量分析。与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 7 糖尿病和肥胖小鼠的脂肪组织中 TLR4/NF-κB 信号通路的激活情况。

2.8 LPS 刺激巨噬细胞中 TLR4/NF-κB 信号通路被激活 本研究还探讨了 LPS 刺激小鼠原代腹腔巨噬细胞和 RAW264.7 细胞系与 TLR4/NF-κB 信号通路之间的联系。结果显示, LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) 刺激原代巨噬细胞 ($P<0.05$, 图 8A、B) 和 RAW 264.7

细胞 ($P<0.05$, 图 8C、D) 6 h 后, 两种细胞中 TLR4 水平与 NF-κB 磷酸化水平均显著上升, PAD4 的表达均与 TLR4/NF-κB 信号通路激活呈负向调控。

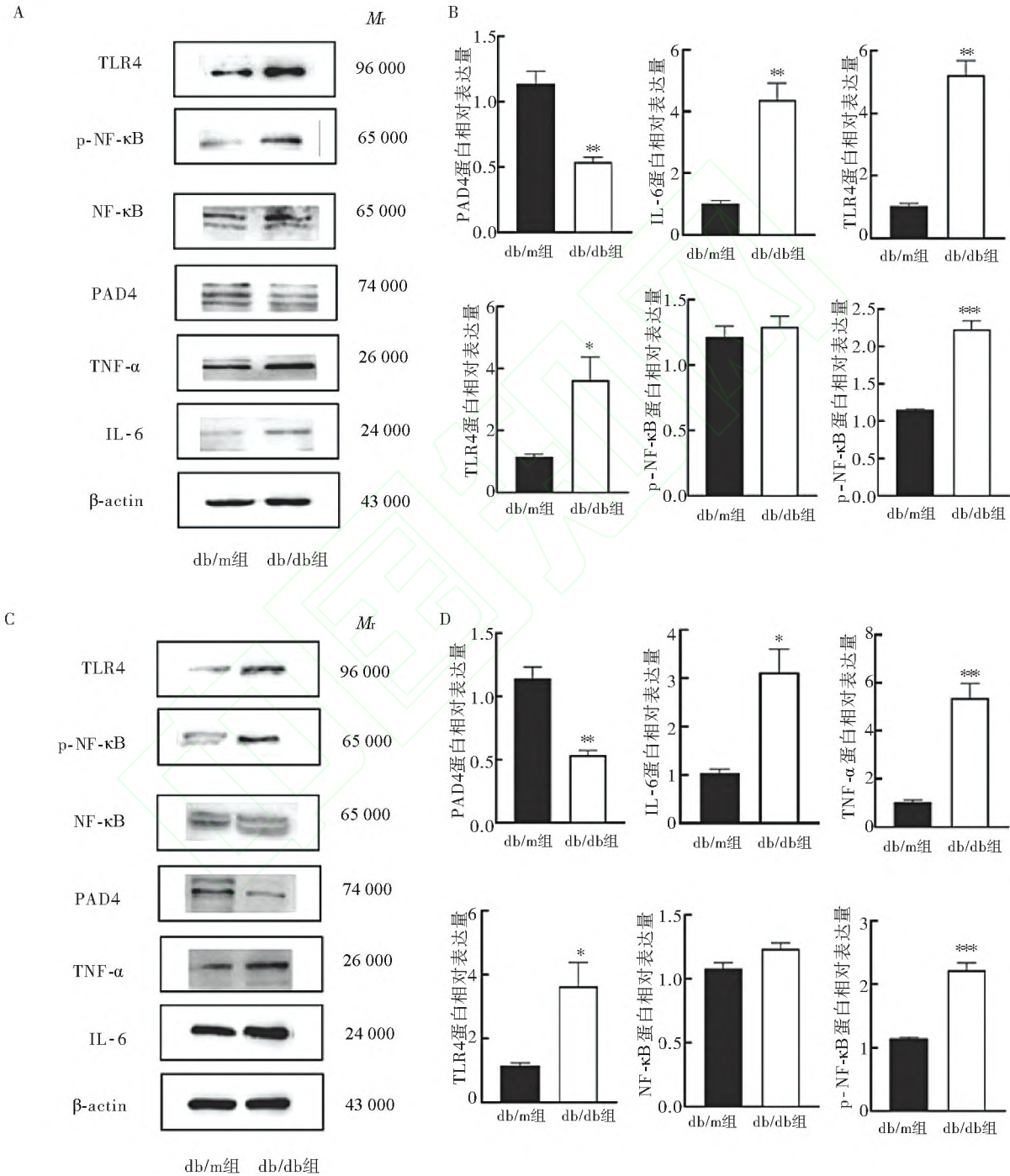


注: A. 原代腹腔巨噬细胞中 TLR4、p-NF-κB、NF-κB 的蛋白表达水平 ($n=3$); B. 原代腹腔巨噬细胞中 TLR4、p-NF-κB、NF-κB 蛋白表达的统计分析; C. RAW264.7 细胞中 TLR4、p-NF-κB、NF-κB 的蛋白表达水平 ($n=3$); D. RAW264.7 细胞中 TLR4、p-NF-κB、NF-κB 的蛋白表达统计分析。与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 8 LPS 处理前后原代腹腔巨噬细胞中 TLR4/NF-κB 信号通路的激活情况

2.9 糖尿病小鼠脂肪组织的巨噬细胞 PAD4 表达与促炎因子和 TLR4/NF-κB 信号通路激活呈负相关 本研究进一步提取并培养 db/db 和 db/m 小鼠的皮下和内脏脂肪组织的巨噬细胞, 结果显示, 与 db/m 小鼠相比, db/db 小鼠的皮下脂肪组织的巨

噬细胞 ($P < 0.01$, 图 9A、B) 和内脏脂肪组织的巨噬细胞 ($P < 0.01$, 图 9C、D) 中 PAD4 蛋白表达量显著下降, 促炎因子 TNF-α、IL-6 显著升高, TLR4/NF-κB 信号通路显著激活 ($P < 0.05$, 图 9)。



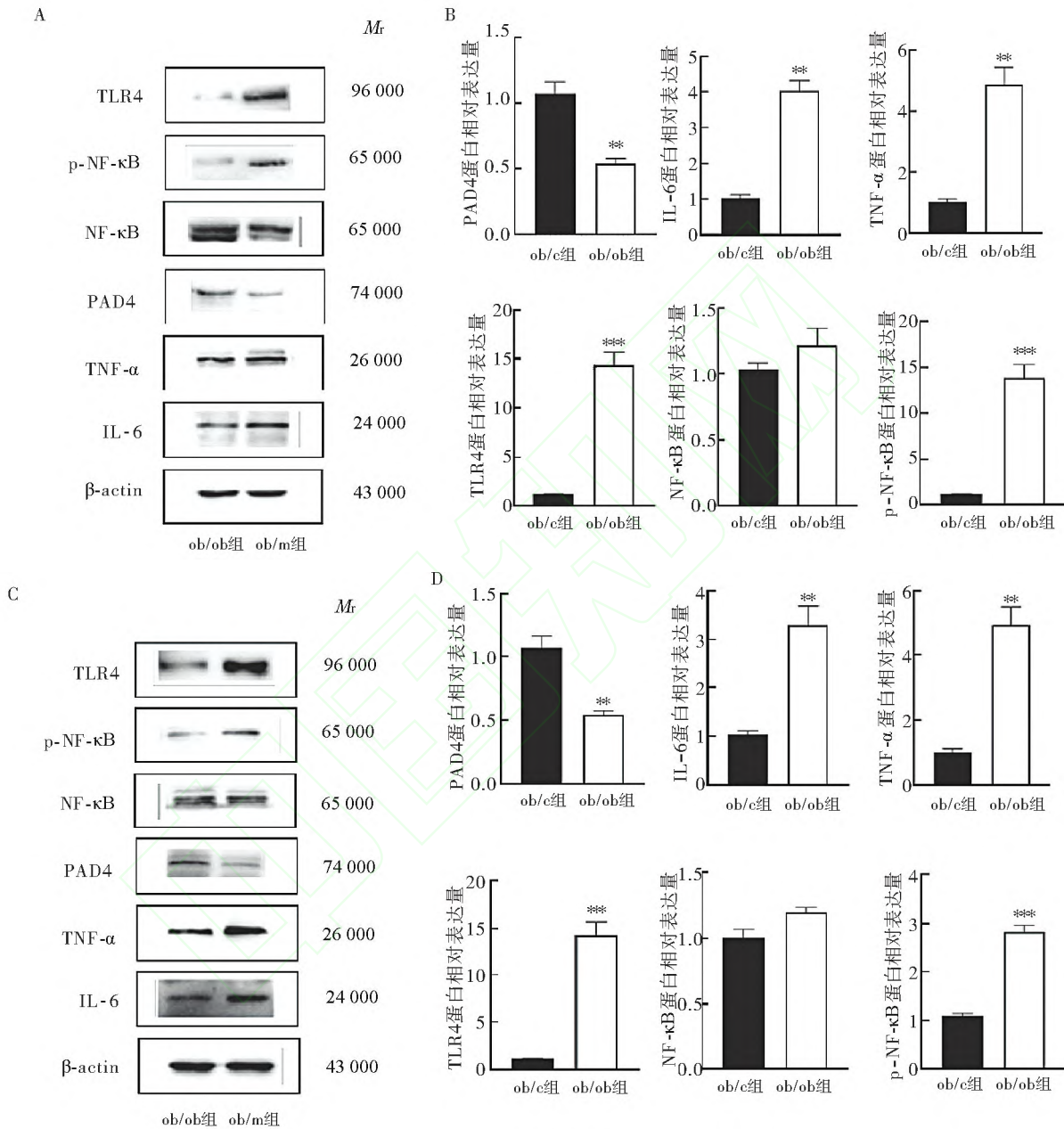
注: A. db/m 和 db/db 小鼠皮下脂肪组织巨噬细胞 PAD4、TLR4、NF-κB、p-NF-κB、TNF-α 和 IL-6 的蛋白表达 ($n=3$); B. db/m 和 db/db 小鼠皮下脂肪组织巨噬细胞 PAD4、TLR4、NF-κB、p-NF-κB、TNF-α 和 IL-6 蛋白表达的定量分析; C. db/m 和 db/db 小鼠内脏脂肪组织巨噬细胞 PAD4、TLR4、NF-κB、p-NF-κB、TNF-α 和 IL-6 的蛋白表达 ($n=3$); D. db/m 和 db/db 小鼠内脏脂肪组织巨噬细胞 PAD4、TLR4、NF-κB、p-NF-κB、TNF-α 和 IL-6 蛋白表达的定量分析。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 9 糖尿病小鼠脂肪组织的巨噬细胞中 PAD4、iNOS 和 IL-6 的表达及 TLR4/NF-κB 信号通路的激活情况

2.10 肥胖小鼠脂肪组织的巨噬细胞 PAD4 表达与促炎因子和 TLR4/NF-κB 信号通路激活呈负相关

与 ob/c 小鼠相比, ob/ob 小鼠皮下脂肪组织的巨噬细胞 ($P < 0.01$, 图 10 A、B) 和内脏脂肪组织

的巨噬细胞 ($P < 0.01$, 图 10 C、D) 中 PAD4 蛋白表达量显著下降, 促炎因子 TNF- α 、IL-6 显著升高, TLR4/NF- κ B 信号通路显著激活 ($P < 0.01$, 图 10)。



注: A. ob/c 和 ob/ob 小鼠皮下脂肪组织巨噬细胞 PAD4、TLR4、NF- κ B、p-NF- κ B、iNOS 和 IL-6 的蛋白表达 ($n=3$); B. ob/c 和 ob/ob 皮下脂肪组织巨噬细胞 PAD4、TLR4、NF- κ B、p-NF- κ B、iNOS 和 IL-6 蛋白表达的定量分析; C. ob/c 和 ob/ob 小鼠内脏脂肪组织巨噬细胞 PAD4、TLR4、NF- κ B、p-NF- κ B、iNOS 和 IL-6 的蛋白表达 ($n=3$); D. ob/c 和 ob/ob 小鼠内脏脂肪组织巨噬细胞 PAD4、TLR4、NF- κ B、p-NF- κ B、iNOS 和 IL-6 蛋白表达的定量分析。与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 10 肥胖小鼠脂肪组织的巨噬细胞中 PAD4、iNOS 和 IL-6 的表达及 TLR4/NF- κ B 信号通路的激活情况

3 讨论

PAD4 可催化蛋白质精氨酸残基转为瓜氨酸

酸^[3]。蛋白质的瓜氨酸化属于翻译后修饰, PAD4 被证实可对自身免疫性疾病和肿瘤等疾病产生影响^[10-11], 如 PAD4 可以瓜氨酸化与类风湿性关节炎

相关的自身蛋白,从而诱导抗瓜氨酸蛋白抗体的产生,并导致炎症和关节损伤^[12]。PAD4在多种肿瘤组织中高度表达,促进肿瘤进展,如在肝细胞癌中介导低氧诱导因子1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α)的瓜氨酸化拮抗HIF-1 α 泛素化和蛋白水解^[13]。在直肠癌中驱动中性粒细胞胞外诱捕网促进肿瘤进展^[14]。在肺癌中PAD4可能通过介导上皮-间充质转化促进肿瘤细胞的转移^[15]。脂肪组织巨噬细胞(adipose tissue macrophages, ATM)在参与组织重塑和调节炎症反应等方面发挥重要作用^[16]。肥胖状态下ATM极化为M1型巨噬细胞,损害胰岛素信号传导^[16-18],以及LPS会在肥胖状态下诱导慢性炎症状态,并促进胰岛素抵抗,同时,巨噬细胞暴露于LPS后能引起巨噬细胞的炎症极化,细胞中TNF- α 等炎症因子的表达增多^[19]。因此肥胖介导的脂肪组织也被视为1种免疫炎症组织。

中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NET)中PAD4可被显著激活^[11]。研究表明,糖尿病患者中性粒细胞中PAD4的表达升高,PAD4在NET形成过程中发挥关键作用。因此,为了进一步研究PAD4在糖尿病发病过程中的作用,本研究对糖尿病和肥胖小鼠脂肪组织中PAD4的表达情况进行分析。免疫组化结果提示,受到机体营养过剩的影响,糖尿病和肥胖小鼠脂肪细胞中脂质大量蓄积,皮下和内脏脂肪组织中炎症因子TNF- α 、IL-6等表达升高,而PAD4的表达均降低。qRT-PCR和Western blotting的结果也进一步对免疫组化的结果得到了验证。综合上述结果,机体能量代谢异常时,脂肪组织内会发生炎症反应,炎症状态下脂肪组织中PAD4的表达产生了一定的变化。

接下来,本研究探讨了巨噬细胞炎症状态下的PAD4表达水平。分别对野生型小鼠的原代腹腔巨噬细胞和RAW264.7细胞系给予LPS刺激,qRT-PCR结果和Western blotting的结果均显示,LPS组中PAD4的mRNA和蛋白表达水平均降低。随后巨噬细胞中炎症因子的表达结果表明,LPS刺激后的巨噬细胞中TNF- α 、IL-6、iNOS的表达水平均增加。综合上述结果,实验表明,脂肪组织处于低度炎症状态时,脂肪组织巨噬细胞极化为M1型巨噬细胞,在M1型巨噬细胞中PAD4的表达降低,促炎因子表达升高。

Cl-amidine是有效的PAD家族抑制剂^[20]。因此,Cl-amidine作用于RAW264.7细胞后,细胞中

TNF- α 、IL-6的表达水平升高得更加明显。此实验表明,在巨噬细胞中PAD4可能抑制了炎症因子的表达。

TLR被证实在炎症、免疫、过敏等方面发挥重要作用^[7]。LPS可被细胞膜上的TLR4识别,接下来启动信号级联反应,NF- κ B等转录因子被激活,扩大炎症反应,引起细胞和组织损伤^[8,9],从而分泌促炎因子^[21-23]。

本研究对脂肪组织炎症的信号通路进行了研究,糖尿病和肥胖小鼠脂肪组织Western blotting结果显示,在脂肪组织炎症中TLR4/NF- κ B信号通路被激活,并进一步促进脂肪组织中炎症反应的发展。接下来,本研究进一步对小鼠原代腹腔巨噬细胞和RAW264.7细胞系中信号通路的表达情况进行检测,结果显示,PAD4调控炎症因子的表达与TLR4/NF- κ B信号通路的激活有关,并且PAD4的表达与TLR4/NF- κ B信号通路的激活呈负相关。

但是,本研究中还存在一定的局限性。关于PAD4对炎症因子的表达情况的影响,没有将PAD4过表达后再观察炎症因子的表达情况;另外PAD4作为一种介导蛋白质瓜氨酸化的酶,没有对巨噬细胞中PAD4介导的蛋白质瓜氨酸化进行深入研究。因此,未来研究应着重通过基因编辑技术和蛋白质组学方法,在时空维度上同步解析PAD4的酶活性调控网络及其下游瓜氨酸化修饰效应,为全面揭示PAD4在炎症反应中的调控机制提供更充分的实验依据。

参考文献

- [1] Lee YS, Olefsky J. Chronic tissue inflammation and metabolic disease[J]. *Genes Dev*, 2021, 35(5/6): 307-328.
- [2] Mondal S, Thompson PR. Protein arginine deiminases (PADs): biochemistry and chemical biology of protein citrullination[J]. *Acc Chem Res*, 2019, 52(3): 818-832.
- [3] Alghamdi M, Al Ghamdi KA, Khan RH, *et al.* An interplay of structure and intrinsic disorder in the functionality of peptidylarginine deiminases, a family of key autoimmunity-related enzymes[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(23): 4635-4662.
- [4] Yang SF, Wang SS, Chen L, *et al.* Neutrophil extracellular traps delay diabetic wound healing by inducing endothelial-to-mesenchymal transition *via* the hippo pathway[J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(1): 347-361.
- [5] Ying W, Fu WX, Lee YS, *et al.* The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and β -cell abnormalities [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16(2): 81-90.
- [6] Kawai T, Autieri MV, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2021, 320(3): C375-C391.
- [7] McElwee JL, Mohanan S, Griffith OL, *et al.* Identification

- of PAD12 as a potential breast cancer biomarker and therapeutic target[J]. *BMC Cancer*, 2012, 12: 500.
- [8] Lendeckel U, Venz S, Wolke C. Macrophages: shapes and functions[J]. *ChemTexts*, 2022, 8(2): 12.
- [9] Verma S, Reddy P, Sowdhamini R. Integrated approaches for the recognition of small molecule inhibitors for Toll-like receptor 4 [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2023, 21: 3680-3689.
- [10] Zhu D, Lu Y, Wang YM, *et al.* PAD4 and its inhibitors in cancer progression and prognosis[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(11): 2414.
- [11] Liu XS, Arfman T, Wichapong K, *et al.* PAD4 takes charge during neutrophil activation: impact of PAD4 mediated NET formation on immune-mediated disease[J]. *J Thromb Haemost*, 2021, 19(7): 1607-1617.
- [12] Thirugnanasambandham I, Jupudi S, Roychowdhury P, *et al.* Revamped role for approved drug: integrative computational and biophysical analysis of saquinavir's peptidyl arginine deiminase 4 inhibition for rheumatoid arthritis[J]. *Biochem J*, 2024, 481(20): 1379-1393.
- [13] Chen R, Lin ZY, Shen SQ, *et al.* Citrullination modulation stabilizes HIF-1 α to promote tumour progression [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 7654.
- [14] Wang BB, Su XJ, Zhang B, *et al.* GSK484, an inhibitor of peptidyl arginine deiminase 4, increases the radiosensitivity of colorectal cancer and inhibits neutrophil extracellular traps [J]. *J Gene Med*, 2023, 25(9): e3530.
- [15] Chang XT, Wu H, Li HL, *et al.* PAD14 promotes epithelial-mesenchymal transition(EMT) in gastric cancer *via* the up-regulation of interleukin 8[J]. *BMC Gastroenterol*, 2022, 22(1): 25.
- [16] Russo L, Lumeng CN. Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity[J]. *Immunology*, 2018, 155(4): 407-417.
- [17] Bae EJ, Park BH. Multiple roles of sirtuin 6 in adipose tissue inflammation[J]. *Diabetes Metab J*, 2023, 47(2): 164-172.
- [18] Zatterale F, Longo M, Naderi J, *et al.* Chronic adipose tissue inflammation linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes[J]. *Front Physiol*, 2020, 10: 1607.
- [19] Saad MA, Santos A, Prada PO. Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2016, 31(4): 283-293.
- [20] Chumanevich AA, Causey CP, Knuckley BA, *et al.* Suppression of colitis in mice by Cl-amidine: a novel peptidylarginine deiminase inhibitor[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 300(6): G929-G938.
- [21] Scheenstra MR, van Harten RM, Veldhuizen EJA, *et al.* Cathelicidins modulate TLR-activation and inflammation[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1137.
- [22] Janeesh PA, Sasikala V, Dhanya CR, *et al.* Robinin modulates TLR/NF- κ B signaling pathway in oxidized LDL induced human peripheral blood mononuclear cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 18(1): 191-197.
- [23] Fakhri S, Moradi SZ, Yarmohammadi A, *et al.* Modulation of TLR/NF- κ B/NLRP signaling by bioactive phytochemicals: a promising strategy to augment cancer chemotherapy and immunotherapy[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 834072.

PAD4 negatively regulates the TLR4/NF- κ B signal pathway to alleviate adipose tissue inflammation

Zhang Xinyue^{1,2}, Cheng Yi^{1,2}, Zheng Wenxiang², Zhai Qiaoli^{2#}, Xiang Xinxin^{2#} (1. *School of Clinical Medicine, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China*; 2. *Translational Medicine Center, Zibo Central Hospital, Zibo 255036, China*)

Abstract: The purpose of this study is to explore the role and mechanism of peptidyl arginine deiminase type 4 (PAD4) in inflammatory adipose tissue. The subcutaneous and visceral adipose tissues of db/db (type 2 diabetes mellitus [T2DM] group), db/m (T2DM control group), ob/ob (obese group) and ob/c (obese control group) were extracted, and the expression of PAD4 in subcutaneous and visceral adipose tissue of T2DM and obese mice was detected by immunohistochemistry. Wild-type mouse primary peritoneal macrophages and mouse macrophage cell line RAW264.7 were stimulated with LPS, the expressions of PAD4, inflammatory factors TNF- α and IL-6, the activation of NF- κ B signal pathway in the 2 types of cells were detected by qRT-PCR and Western blotting, respectively. The results showed that compared to those of the db/m and ob/c groups, the expression of PAD4 in subcutaneous and visceral adipose tissue, primary peritoneal macrophages and RAW264.7 cells stimulated by LPS in db/db and ob/ob groups were all decreased, while the expressions of inflammatory factors TNF- α and IL-6 increased significantly. Meanwhile, the TLR4/NF- κ B signal pathway was activated. This study shows that the expression of PAD4 is decreased in subcutaneous and visceral adipose tissue in inflammatory state (T2DM and obesity) and is negatively correlated with the activation of the TLR4/NF- κ B signal pathway.

Key words: peptidyl arginine deiminase type 4; inflammation; adipose tissue; type 2 diabetes mellitus; obesity