

# Nlrp3 siRNA对高糖培养的肾小球系膜细胞促炎因子表达的影响及机制

王 敏 易 红 张亚娟 孙 艳 彭 睿 张 政\*

(重庆医科大学基础医学院, 重庆 400016)

**摘要** 该文研究了Nlrp3 siRNA对高糖培养的小鼠肾小球系膜细胞促炎因子表达水平的影响及相关机制。采用合成Nlrp3 siRNA转染高糖培养的系膜细胞(高糖组)和正常培养的系膜细胞(正常组)。运用实时荧光定量PCR和Western blot检测沉默Nlrp3后促炎因子IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 表达水平。运用生物信息学分析和ChIP检测Nlrp3与炎症相关因子NF- $\kappa$ B的关系。运用Western blot检测了沉默Nlrp3后NF- $\kappa$ B的表达情况以及特异性抑制NF- $\kappa$ B后对Nlrp3的影响。结果表明, Nlrp3表达水平在高糖培养的系膜细胞中较正常组增高, 将筛选出的沉默效应最优Nlrp3 siRNA转染入高糖培养的系膜细胞后, 促炎因子IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 表达降低。进一步生物信息学分析和ChIP实验结果显示, Nlrp3启动子区域与NF- $\kappa$ B亚单位p50具有靶向结合关系, 同时, Western blot结果显示, 在高糖系膜细胞中沉默Nlrp3后NF- $\kappa$ B p50表达减少, 特异性抑制p50后Nlrp3同步降低, 提示NF- $\kappa$ B是Nlrp3影响系膜细胞炎症因子表达的重要因素。因此, Nlrp3可能是调控高糖系膜细胞炎症反应的一个重要新因子, 其机制可能是Nlrp3启动子与NF- $\kappa$ B结合, 活化NF- $\kappa$ B, 从而影响促炎因子表达。在糖尿病肾病中靶向调控Nlrp3可能为预防和治疗疾病提供一个新的方向。

**关键词** NF- $\kappa$ B; NLRP3; p50; 系膜细胞; 炎症

## The Effect of Nlrp3 siRNA on the Expressions of Proinflammatory Factors in Glomerular Mesangial Cells Cultured with High Glucose and Its Mechanism

Wang Min, Yi Hong, Zhang Yajuan, Sun Yan, Peng Rui, Zhang Zheng\*

(College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** This article was aimed to investigate the effect of Nlrp3 on the expressions of the proinflammatory factors in mouse glomerular mesangial cells cultured with high concentration of glucose and explore its possible mechanism. The Nlrp3 siRNA was successfully constructed and transfected into glomerular mesangial cells cultured with high concentration of glucose (high glucose group) and normal concentration of glucose (normal group). The expressions of proinflammatory factors IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were tested by Real-time PCR and Western blot. The interaction between *Nlrp3* and the well-known inflammatory transcription factor NF- $\kappa$ B was determined by bioinformatics analysis and ChIP. The expressions of NF- $\kappa$ B and Nlrp3 were detected by Western blot when Nlrp3 was silenced or NF- $\kappa$ B was specifically inhibited. The results showed that the expression of Nlrp3 was higher in high glucose group than that in normal group. Then Nlrp3 siRNA with best silence efficacy

收稿日期: 2018-01-15 接受日期: 2018-04-03

国家自然科学基金(批准号: 81570747)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68485868, E-mail: zhangzheng92@163.com

Received: January 15, 2018 Accepted: April 3, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81570747)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68485868, E-mail: zhangzheng92@163.com

网络出版时间: 2018-05-31 17:09:57

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180531.1709.018.html>

was chosen to transfect into the cells. And data showed the proinflammatory factors IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were both decreased when Nlrp3 was silenced in high glucose group. Furthermore, results showed that there was a binding between *Nlrp3* promoter and NF- $\kappa$ B p50. Moreover, the results of Western blot showed that the expression of NF- $\kappa$ B p50 was decreased when Nlrp3 was silenced and the expression of Nlrp3 was reduced when NF- $\kappa$ B p50 was inhibited in high glucose group. In conclusion, Nlrp3 siRNA may play an anti-inflammatory role in mesangial cells with high glucose, and the mechanism may involve the interaction between the *Nlrp3* and NF- $\kappa$ B. It might provide a novel direction for the prevention and treatment of diabetic nephropathy.

**Keywords** NF- $\kappa$ B; Nlrp3; p50; mesangial cells; inflammation

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病重要的慢性微血管并发症之一,主要表现为糖尿病性肾小球硬化。中国有1亿多糖尿病患者,患病率达11.6%,其中DN约占糖尿病发病人数的1/3,是导致终末期肾病的常见病因之一,严重影响了糖尿病患者的预后和生存<sup>[1]</sup>。研究表明,高糖、高脂、高血压、血液动力学、氧化应激、炎症等多方面复杂的致病因素导致糖尿病患者肾脏细胞外基质累积、肾小球肥大、肾小球基底增厚和肾小球硬化<sup>[2]</sup>,参与DN的发生发展,但确切机制尚不清楚。

近年多项研究报道, DN患者存在炎细胞浸润和多种炎症介质表达水平增高,此慢性炎症状态在糖尿病早期肾病发展中发挥重要作用,且DN的进展与长期的微炎症状态和免疫系统的活化亦密切相关<sup>[3-6]</sup>。核转录因子-kappa B(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B)、转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、促分裂素原活化蛋白激酶38(mitogen-activated protein kinases 38, p38MAPK)信号通路等被广泛发现参与DN炎症进程,在DN肾脏结构和功能性损伤中发挥重要作用<sup>[7-9]</sup>。新近报道,核苷酸结合寡聚化结构域样受体3(nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3, Nlrp3)炎症小体作为炎症重要因子参与多种疾病<sup>[10]</sup>,不仅与糖尿病大血管并发症动脉粥样硬化等相关<sup>[11]</sup>,还与DN关系密切,参与DN高尿酸<sup>[12]</sup>、脂质紊乱<sup>[13]</sup>、高氧化应激<sup>[14]</sup>等病理生理过程,提示Nlrp3炎症小体可能是一个重要的DN新型炎症因子。然而,它在DN系膜增生中的作用和机制目前尚不明确。

本研究探讨在高糖培养的肾小球系膜细胞中Nlrp3对促炎因子表达的作用以及Nlrp3启动子与NF- $\kappa$ B p50绑定结合关系的机制研究。该研究为探索DN系膜细胞炎症反应的具体机制提供实验依据,为DN的早期诊断和抗炎治疗提供新的靶点和研究

思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小鼠肾小球系膜细胞株SV40MES13购自中国科学院上海细胞库。

### 1.2 试剂及仪器

总RNA提取试剂Trizol、逆转录试剂盒、DNA Marker及SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq Premix购自大连宝生物公司。脂质体Lipofectamine 3000购自Invitrogen公司。Rabbit anti-mouse IgG-Nlrp3购自Abcam公司。EZ-ChIP<sup>™</sup>染色质免疫共沉淀试剂盒购自Millipore公司。DMEM培养基购自Hyclone公司。胎牛血清购自Gibco公司。SN50(NF- $\kappa$ B p50特异性抑制剂)购自Enzo公司。其他试剂均为国产分析纯。

PCR扩增仪、CFX96 PCR仪、流式细胞仪、酶标仪购自Bio-Rad公司。6孔和24孔细胞培养板购自Costar公司。CO<sub>2</sub>细胞培养箱购自Forma Scientific公司。倒置显微镜购自Olympus公司。荧光显微镜购自Leica公司。采用索尼数码相机拍照。

### 1.3 siRNA合成

根据Ensembl数据库中公布的小鼠*Nlrp3*的mRNA序列通过Oligo软件设计3条siRNA靶序列,具体如下(5'→3'), No.1: CAC UCA UGA UUG ACU UCA AUG; No.2: GCA GGU UCU ACU CUA UCA AGG; No.3: GGA CAU ACG UCU GGA UCA AGC。上述引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,其干扰效率通过荧光定量PCR检测。

### 1.4 细胞培养及转染

小鼠肾小球系膜细胞培养于DMEM培养基中,内含10%灭活胎牛血清,置于37 °C、5.0% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。当细胞融合度达到80%时,用0.25%胰蛋白酶消化细胞,800 r/min离心5 min,收集

细胞进行传代或冻存。细胞分别以含5 mmol/L葡萄糖加入19.5 mmol/L甘露醇的DMEM培养基模拟正常生理状态(正常组);以25 mmol/L葡萄糖的DMEM培养基培养48 h模拟糖尿病高糖状态(高糖组)<sup>[15]</sup>。待系膜细胞生长到对数生长期后,以每孔 $5.5 \times 10^5$ 个细胞等体积接种于6孔板,每组设3个平行孔,运用Lipofectamine 3000将3条Nlrp3 siRNAs及其对照转染至高糖组细胞(si No.1组、si No.2组、si No.3组和si NC组),将NF- $\kappa$ B p50特异性抑制剂SN50转染至高糖组细胞(SN50组),转染后4~6 h更换新鲜培养基,继续培养48 h后收获细胞,准备后续实验。

### 1.5 荧光定量PCR检测Nlrp3表达情况

按Trizol试剂说明书步骤提取系膜细胞总RNA。用酶标仪检测RNA的浓度和纯度。总RNA逆转录反应体系按逆转录试剂盒说明书进行,经37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 逆转录合成cDNA。利用Primer Premier 5.0软件设计小鼠Nlrp3的引物,由生物工程(上海)股份有限公司合成。Nlrp3上游引物为:5'-AGT GGA TGG GTT TGC TGG GAT-3', 下游引物为:5'-GCG TGT AGC GAC TGT TGA GG-3'; IL-1 $\beta$ 上游引物为:5'-CAT CAG CAC CTC ACA AGC AGA-3', 下游引物为:5'-TGG GGA AGG CAT TAG AAA CAG-3';  $\beta$ -actin上游引物为:5'-GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG-3', 下游引物为:5'-CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T-3'。以cDNA为模板对Nlrp3基因的编码区扩增,扩增反应体系终体积为10  $\mu$ L, 包含SYBR® Premix Ex Taq™ II 5  $\mu$ L、cDNA 1  $\mu$ L(100 ng)、上下游引物各0.8  $\mu$ L和ddH<sub>2</sub>O 3.2  $\mu$ L, 每个检测指标设3个平行复孔。扩增条件为:95 °C 预变性3 min, 95 °C 5 s、60 °C 30 s、72 °C 30 s共39个循环,65 °C延伸5 s。最终数据用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式分析。

### 1.6 生物信息学预测Nlrp3启动子区域与转录因子结合情况

在Ensembl数据库中查找到目的基因Nlrp3的启动子序列,然后运用数据库JASPAR和TFSEARCH预测与目的基因Nlrp3启动子序列有潜在结合关系的转录因子。

### 1.7 ChIP检测Nlrp3启动子与p50的绑定结合作用

通过软件Primer Premier 5.0设计含有p50与Nlrp3结合位点、p65与Nlrp3结合位点的PCR引物。p50/Nlrp3预测结合位点上游引物为:5'-GCT GAG CCC TGA GGT TTC ACT T-3', 下游引物为:5'-TGT

CAA AGA CGG ATT GGC AGT T-3'; p65/Nlrp3预测结合位点上游引物为:5'-GTG TTT CTG ATA ACT TCG TTT TCT GG-3', 下游引物为:5'-TGC AAC GGA CAC TCG TCA TCT T-3'。使用Millipore公司的EZ-ChIP™试剂盒处理正常组和高糖组细胞。根据试剂盒说明书进行染色质免疫共沉淀,操作步骤如下:加入37%甲醛体外交联和裂解细胞DNA,超声处理DNA(功率20 W,每次超声10 s,暂停10 s,共35次),使交联的DNA/蛋白质共沉淀,洗脱DNA/蛋白质复合物,解交联,纯化DNA。将各组得到的DNA产物分别加入上述对应的引物进行实时荧光定量PCR扩增。结果以Input作为内参,重复3次,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式得到目的蛋白组中DNA的相对表达量,IgG组(阴性对照组)作为质控标准,以确保实验结果的可靠性。

### 1.8 Western blot检测Nlrp3、p50、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达情况

收集转染48 h后的系膜细胞,离心沉淀后加入RIPA:PMSF为100:1的裂解液混匀,冰上裂解30 min,期间每间隔5 min漩涡振荡15 s,15 000 r/min离心30 min,收集上清液。蛋白样品按1:5的比例与6 $\times$ SDS-PAGE蛋白上样缓冲液充分混合,并100 °C煮沸10 min,使蛋白变性。SDS-PAGE后,转膜,分别加入兔抗Nlrp3抗体(1:500稀释)、兔抗p50抗体(1:500稀释)兔抗IL-1 $\beta$ 抗体(1:500稀释)、兔抗TNF- $\alpha$ 抗体(1:500稀释)和兔抗GAPDH抗体(1:1 000稀释),4 °C过夜。TBST洗PVDF膜3次后,加入辣根酶标记山羊抗兔IgG(1:8 000稀释),室温摇床孵育2 h,ECL显色,以GAPDH抗体作为内参。

### 1.9 数据统计

实验数据以mean $\pm$ S.D.形式表示,显著性差异分析用SPSS 17.0软件进行。三组数据比较采用单因素方差分析,两组数据比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 Nlrp3在系膜细胞高糖组中异常高表达

采用荧光定量PCR和Western blot检测高糖培养的系膜细胞中Nlrp3的表达水平。结果显示,Nlrp3在高糖组细胞较正常组显著高表达(图1),提示Nlrp3可能参与高糖系膜细胞病理改变,可能是DN系膜病变的重要相关因素。

## 2.2 成功筛选最优Nlrp3 siRNA

采用荧光定量PCR和Western blot筛选3条Nlrp3 siRNA的沉默效率。结果显示, No.3沉默效率最佳( $P<0.01$ )(图2)。因此, 选择No.3 Nlrp3 siRNA进行后续实验。

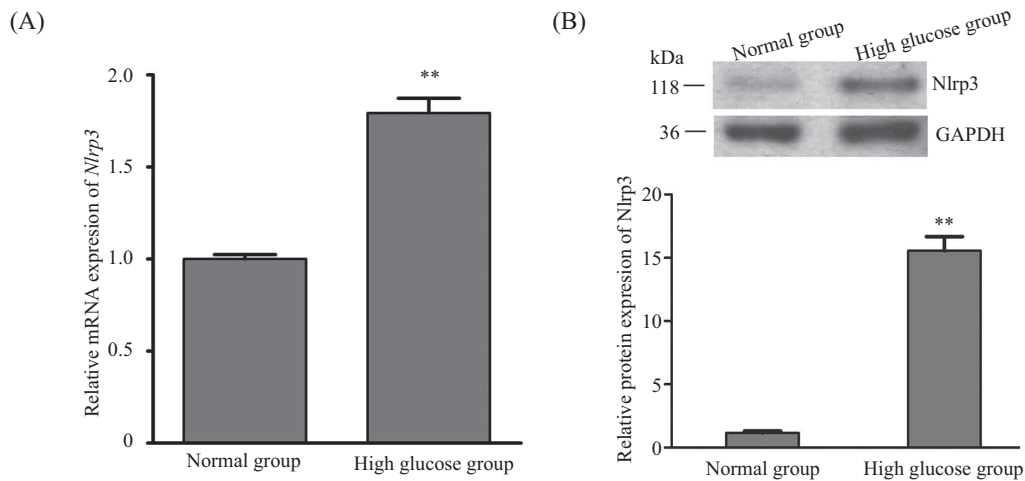
## 2.3 沉默Nlrp3对促炎因子IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 表达的影响

荧光定量PCR和Western blot检测沉默Nlrp3后

高糖培养的系膜细胞促炎因子表达水平。结果显示, 沉默Nlrp3可抑制高糖培养的系膜细胞促炎因子IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达水平, 提示Nlrp3可能是影响DN炎症状态的重要因素(图3)。

## 2.4 p50结合结合Nlrp3启动子区域

为进一步探索Nlrp3在系膜细胞炎症反应的机制, 我们采用生物信息学方法预测Nlrp3启动子与转录因子的潜在关系。结果显示, 仅NF- $\kappa$ B与Nlrp3启

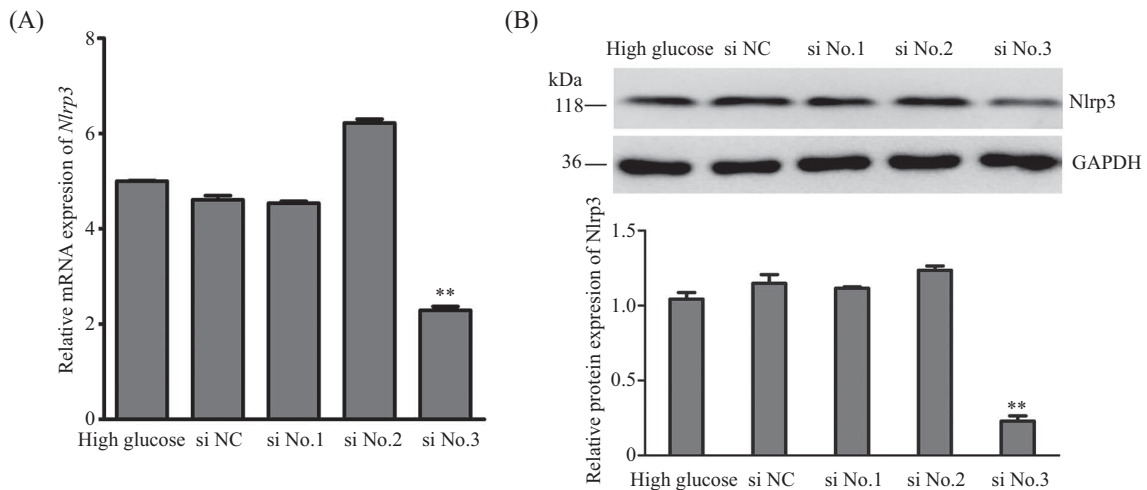


A: 荧光定量PCR检测Nlrp3的mRNA表达; B: Western blot检测Nlrp3的蛋白表达及条带灰度值分析。\*\* $P<0.01$ , 与正常组比较。

A: the mRNA expression of Nlrp3 was detected by Real-time PCR; B: the protein expression of Nlrp3 was detected by Western blot, and the gray value of Western blots bands was examined. \*\* $P<0.01$  vs normal group.

图1 高糖系膜细胞中Nlrp3的表达情况

Fig.1 The expression of Nlrp3 in mesangial cells with high glucose



A: 荧光定量PCR检测转染Nlrp3 siRNAs后Nlrp3的mRNA表达; B: Western blot检测转染Nlrp3 siRNAs后Nlrp3的蛋白表达及条带灰度值分析。\*\* $P<0.01$ , 与高糖组比较。

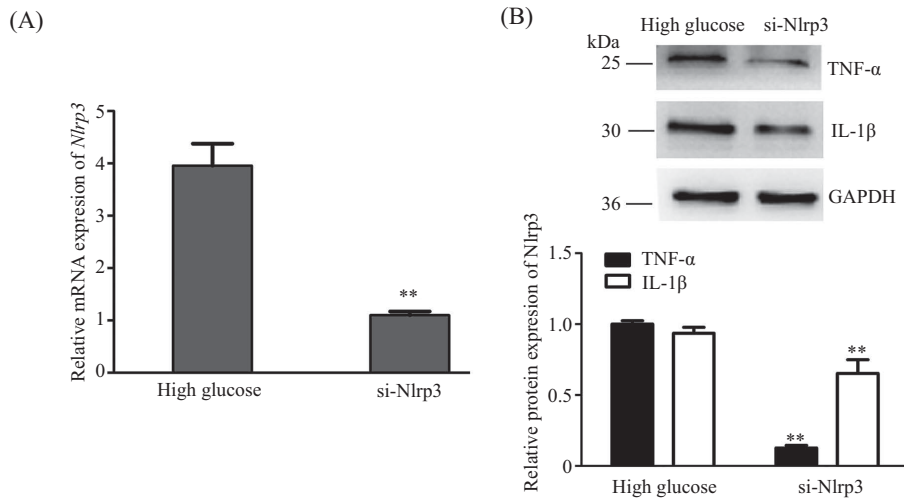
A: the mRNA expression of Nlrp3 was detected by Real-time PCR when Nlrp3 siRNAs were transfected into the cells; B: the protein expression of Nlrp3 was detected by Western blot when Nlrp3 siRNAs were transfected into the cells, and the gray value of Western blots bands was examined.

\*\* $P<0.01$  vs high glucose group.

图2 Nlrp3 siRNAs沉默效果筛选

Fig.2 The silent effect of Nlrp3 siRNAs

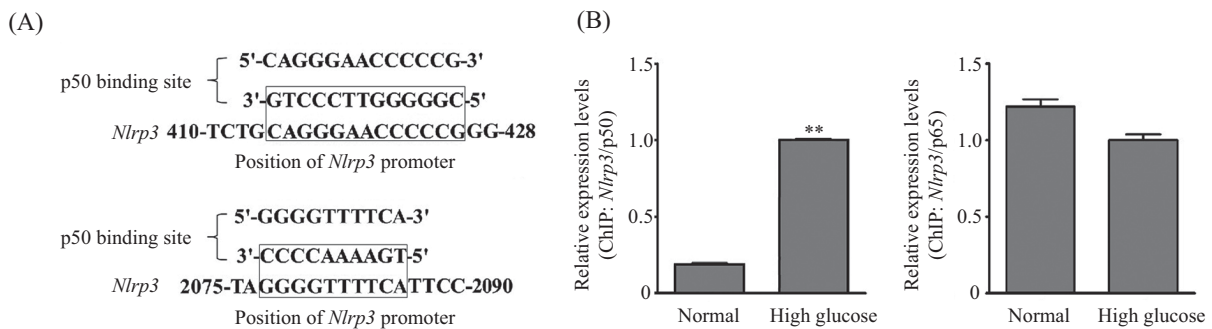




A: 荧光定量PCR检测沉默Nlrp3后IL-1 $\beta$ 的表达; B: Western blot检测沉默Nlrp3后IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达以及条带灰度值分析。\*\* $P$ <0.01, 与高糖组比较。  
A: the mRNA expression of *IL-1 $\beta$*  was detected by Real-time PCR when Nlrp3 was silenced; B: the expressions of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were detected by Western blot when Nlrp3 was silenced, and the gray value of Western blots bands was examined. \*\* $P$ <0.01 vs high glucose group.

图3 沉默Nlrp3对促炎因子表达的影响

Fig.3 The effect of si-Nlrp3 on the expressions of proinflammatory factors in cells



A: 生物信息学预测NF- $\kappa$ B与*Nlrp3*启动子的结合位点; B: ChIP检测NF- $\kappa$ B与*Nlrp3*启动子结合。\*\* $P$ <0.01, 与高糖组比较。

A: the prediction of the binding sites between NF- $\kappa$ B and *Nlrp3* promoter region by bioinformatics analysis; B: the binding relationship between NF- $\kappa$ B and *Nlrp3* promoter by ChIP. \*\* $P$ <0.01 vs normal glucose group.

图4 *Nlrp3*启动子区域与NF- $\kappa$ B p50的绑定结合

Fig.4 The binding relationship between *Nlrp3* promoter and NF- $\kappa$ B p50

动子区域有预测结合位点,且在NF- $\kappa$ B p65和p50两个亚基均与*Nlrp3*启动子区域有关(图4A)。为证实*Nlrp3*与NF- $\kappa$ B的具体关系,我们进一步采用ChIP检测系膜细胞中*Nlrp3*与NF- $\kappa$ B p65和NF- $\kappa$ B p50的结合。结果显示,*Nlrp3*启动子与p50绑定结合,与另一亚单位p65没有结合关系(图4B),提示在系膜细胞中*Nlrp3*与NF- $\kappa$ B的关系以p50为主。

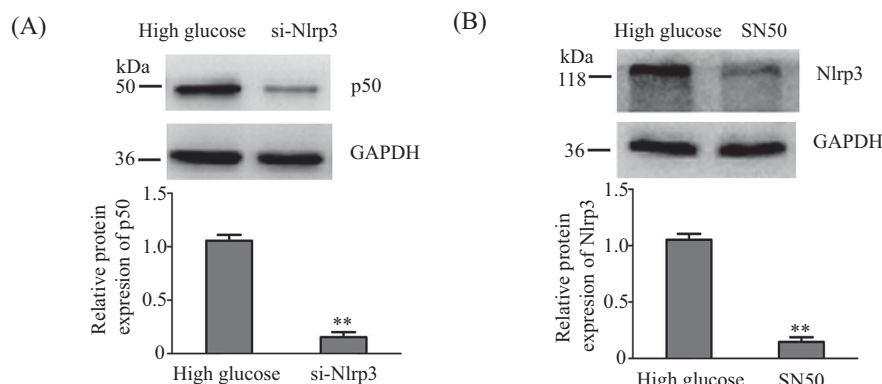
## 2.5 *Nlrp3*炎症小体和p50互相影响表达水平

为探索p50与*Nlrp3*的相互调控关系,我们采用si-Nlrp3沉默*Nlrp3*,p50特异性抑制剂SN50抑制p50,通过Western blot检测高糖系膜细胞中沉默*Nlrp3*后p50的表达水平以及抑制p50后*Nlrp3*的表达情况。结果显示,高糖系膜细胞沉默*Nlrp3*后p50的表达水

平呈同步下降(图5A),同时对抑制p50后*Nlrp3*的表达水平也显著降低(图5B)。结果表明,*Nlrp3*与p50密切相关,相互调控。

## 3 讨论

研究发现,包括肾小球内皮细胞、肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞、足细胞、成纤维细胞等在内的肾脏固有细胞以及外源进入肾脏的其他细胞,如巨噬细胞、中性粒细胞、肥大细胞等均可以参与DN的炎症过程<sup>[6]</sup>。同时,近年越来越多的证据还表明,炎症相关因子在DN中具有重要的作用,包括白介素类(interleukin, IL)、黏附因子、趋化因子、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )等<sup>[17]</sup>。因



A: Western blot检测沉默Nlrp3后p50的表达及条带灰度值分析; B: Western blot检测特异性抑制p50后Nlrp3的表达及条带灰度值分析。 \*\* $P < 0.01$ , 与高糖组比较。

A: the expression of p50 after Nlrp3 was silenced by Western blot and the gray value analysis of the Western blot bands; B: the expression of Nlrp3 after p50 was inhibited by Western blot and the gray value analysis of the Western blot bands. \*\* $P < 0.01$  vs high glucose group.

图5 系膜细胞中Nlrp3和p50表达水平的相互影响

Fig.5 The interaction between Nlrp3 and p50 on their expressions in mesangial cells

此, 学者们提出了DN炎症发病学说, 认为DN是一种自然免疫和低度炎症性疾病。新近研究发现, Nlrp3炎症小体是一个新兴的炎症相关因子, 是核苷酸结合寡聚化结构域样受体被激活后形成的巨大的蛋白复合体-炎症体, 由寒冷诱导自身炎症综合征1基因编码, 是核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族成员之一, 由N-端热蛋白结构域、C-端亮氨酸重复序列和中间的核苷酸结合寡聚域三部分组成, 是Nlrp3炎症体的重要成分。研究发现, Nlrp3炎症体在糖尿病肾病中扮演重要角色, 可通过激活caspase-1来促进IL-1 $\beta$ 和IL-18的成熟, 从而诱发持续的炎症, 导致糖尿病患者肾脏损伤的发生发展。在STZ诱导的伴有高尿酸血症和高脂血症的糖尿病肾病模型中, 除IL-1 $\beta$ 和IL-18的水平升高外, NLRP3炎症体存在过度表达<sup>[12]</sup>。然而, Nlrp3炎症体与糖尿病肾病系膜增生关系如何, 目前尚未见明确报道。肾小球系膜病变是DN最突出的病理改变之一, 在其病程的早期就存在系膜细胞增殖、细胞外基质合成增多等现象, 虽然已知糖脂代谢紊乱、血流动力学异常、炎症介质释放、细胞因子以及氧化应激等多因素的作用涉及其中, 但具体机制仍不完全清楚。本研究采用高低糖培养的肾小球系膜细胞为研究对象, 结果发现, 在高糖组Nlrp3表达水平较正常组显著增高, 提示Nlrp3在系膜细胞中也发挥重要作用。此外, El-Horany等<sup>[18]</sup>对糖尿病肾病患者的研究发现, Nlrp3表达水平在DN患者中显著增高, 多重线性回归和ROC分析显示, Nlrp3是一个独立的DN预测指标和重要

的血清学标记物。因此, 深入研究Nlrp3在DN中的作用具有重要意义。

为探索Nlrp3在系膜细胞的具体作用, 本研究采用siRNA沉默Nlrp3, 应用荧光定量PCR和Western blot筛选出沉默效果最优者进行后续实验。结果发现, 在高糖组系膜细胞沉默Nlrp3后, 促炎因子IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 表达水平均下降, 提示在系膜细胞炎症中Nlrp3对促炎因子的表达有重要调控作用, 可能是DN炎症的中心环节。Lu等<sup>[19]</sup>报道, 在红斑狼疮模型小鼠中Nlrp3的激活导致小鼠呈现显著蛋白尿和系膜损伤。以上均提示, Nlrp3可能是DN系膜细胞炎症反应的关键因子, 参与DN系膜增生。

为进一步探索Nlrp3参与系膜细胞炎症的机制, 本研究应用生物信息学技术分析Nlrp3启动子区域与转录因子的预测结合情况发现, 仅NF- $\kappa$ B与Nlrp3启动子区域有潜在靶向关系。NF- $\kappa$ B是公认的DN炎症发病机制中的一个关键环节。研究发现, 体外培养的小鼠肾小球系膜细胞中NF- $\kappa$ B的活化能促进系膜细胞的增殖, 且对系膜细胞分泌的多种化学因子起着调控作用<sup>[20]</sup>。此外, 在2型糖尿病患者肾活检中也发现, NF- $\kappa$ B信号通路活化和相关基因的上调; DN患者外周血单核细胞中NF- $\kappa$ B活性明显高于非肾病的糖尿病患者, 且其活性与DN患者糖化血红蛋白浓度及蛋白尿等病情的严重程度密切相关<sup>[21]</sup>。因此, 如果在系膜细胞中Nlrp3确实与NF- $\kappa$ B有关, 那么NF- $\kappa$ B则可能是Nlrp3参与系膜细胞炎症的重要作用机制。ChIP实验结果发现, 在

预测的NF- $\kappa$ B两个亚单位p65和p50中, p50与Nlrp3启动子区域绑定结合, 而p65未发现有结合关系。同时, 在高糖培养的系膜细胞中运用si-Nlrp3沉默Nlrp3后发现, p50蛋白水平显著降低; 运用SN50特异性抑制p50后发现, Nlrp3蛋白水平呈同步减少。以上结果均提示, Nlrp3启动子区域与NF- $\kappa$ B p50具有结合关系, 两者在表达水平上相互影响。NF- $\kappa$ B作为一个蛋白家族, 包括5个亚单位: Rel(cRel)、p65(RelA)、RelB、p50(NF- $\kappa$ B 1)和p52(NF- $\kappa$ B 2)。两个亚基形成的二聚体与靶基因上特定的序列( $\kappa$ B位点)结合调节基因转录, 而最常见的NF- $\kappa$ B二聚体是由p65与p50组成的异二聚体<sup>[22]</sup>, p65通过其羧基端反式激活区域发挥反式激活作用, 而p50通过与靶基因- $\kappa$ B位点直接结合发挥作用, 影响靶基因的表达, 从而引起下游基因在疾病中的变化<sup>[23-24]</sup>。结合本研究结果, 在探寻Nlrp3在系膜细胞中与p65和p50的直接关系中, 也再次得到证实。由此我们推测, 高糖下Nlrp3炎症小体调控系膜细胞促炎因子的表达, 其机制可能涉及p50与Nlrp3的 $\kappa$ B位点直接绑定结合, 从而影响系膜细胞炎症反应。p65在系膜细胞Nlrp3作用中的地位及具体机制, 有待我们进一步研究。

综上, 本实验的研究结果显示, Nlrp3在高低糖培养的肾小球系膜细胞中异常表达, 通过与NF- $\kappa$ B p50绑定结合相互调控, 影响系膜细胞炎症相关因子表达, 为探索DN发病机制研究和早期诊断治疗提供实验室依据。Nlrp3与NF- $\kappa$ B p50具体内在关系如何, 孰因孰果, 有待进一步研究。

### 参考文献 (References)

- Xu Y, Wang L, He J, Bi Y, Li M, Wang T, *et al.* Prevalence and control of diabetes in Chinese adults. *JAMA* 2013; 310(9): 948-59.
- Catania JM, Chen G, Parrish AR. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292(3): F905-11.
- Sun YM, Su Y, Li J, Wang LF. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 433(4): 359-61.
- Yang X, Wang Y, Gao G. High glucose induces rat mesangial cells proliferation and MCP-1 expression via ROS-mediated activation of NF- $\kappa$ B pathway, which is inhibited by eleutheroside E. *J Recept Signal Transduct Res* 2016; 36(2): 152-7.
- Sun L, Kanwar YS. Relevance of TNF- $\alpha$  in the context of other inflammatory cytokines in the progression of diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2015; 88(4): 662-5.
- Xu L, Shen P, Bi Y, Chen J, Xiao Z, Zhang X, *et al.* Danshen injection ameliorates STZ-induced diabetic nephropathy in association with suppression of oxidative stress, pro-inflammatory factors and fibrosis. *Int Immunopharmacol* 2016; 38: 385-94.
- Chen Y, Liang Y, Hu T, Wei R, Cai C, Wang P, *et al.* Endogenous Nampt upregulation is associated with diabetic nephropathy inflammatory-fibrosis through the NF- $\kappa$ B p65 and Sirt1 pathway; NMN alleviates diabetic nephropathy inflammatory-fibrosis by inhibiting endogenous Nampt. *Exp Ther Med* 2017; 14(5): 4181-93.
- Luan P, Zhuang J, Zou J, Li H, Shuai P, Xu X, *et al.* NLRC5 deficiency ameliorates diabetic nephropathy through alleviating inflammation. *FASEB J* 2018; 32(2): 1070-84.
- Xu X, Fan Z, Qi X, Shao Y, Wu Y. The role of TGF- $\beta$ -activated kinase 1 in db/db mice and high glucose-induced macrophage. *Int Immunopharmacol* 2016; 38: 120-31.
- Hughes MM, O'Neill LA. Metabolic regulation of NLRP3. *Immunol Rev* 2018; 281(1): 88-98.
- Liu D, Zeng X, Li X, Mehta JL, Wang X. Role of NLRP3 inflammasome in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Basic Res Cardiol* 2017; 113(1): 5.
- Wang C, Pan Y, Zhang QY, Wang FM, Kong LD. Quercetin and allopurinol ameliorate kidney injury in STZ-treated rats with regulation of renal NLRP3 inflammasome activation and lipid accumulation. *PLoS One* 2012; 7(6): e38285.
- Wang Y, Yu B, Wang L, Yang M, Xia Z, Wei W, *et al.* Pioglitazone ameliorates glomerular NLRP3 inflammasome activation in apolipoprotein E knockout mice with diabetes mellitus. *PLoS One* 2017; 12(7): e0181248.
- Feng H, Gu J, Gou F, Huang W, Gao C, Chen G, *et al.* High glucose and lipopolysaccharide prime NLRP3 inflammasome via ROS/TXNIP pathway in mesangial cells. *J Diabetes Res* 2016; 2016: 6973175.
- Sun Y, Peng R, Peng H, Liu H, Wen L, Wu T, *et al.* miR-451 suppresses the NF- $\kappa$ B-mediated proinflammatory molecules expression through inhibiting LMP7 in diabetic nephropathy. *Mol Cell Endocrinol* 2016; 433: 75-86.
- Taniguchi K, Xia L, Goldberg HJ, Lee KW, Shah A, Stavar L, *et al.* Inhibition of Src kinase blocks high glucose-induced EGFR transactivation and collagen synthesis in mesangial cells and prevents diabetic nephropathy in mice. *Diabetes* 2013; 62(11): 3874-86.
- Ogawa D, Makino H. Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of inflammation. *Nihon Rinsho* 2012; 70 Suppl 5: 389-92.
- El-Horany HE, Abd-Ellatif RN, Watany M, Hafez YM, Okda HI. NLRP3 expression and urinary HSP72 in relation to biomarkers of inflammation and oxidative stress in diabetic nephropathy patients. *IUBMB Life* 2017; 69(8): 623-30.
- Lu A, Li H, Niu J, Wu S, Xue G, Yao X, *et al.* Hyperactivation of the NLRP3 inflammasome in myeloid cells leads to severe organ damage in experimental lupus. *J Immunol* 2017; 198(3): 1119-29.
- Jiang Q, Liu P, Wu X, Liu W, Shen X, Lan T, *et al.* Berberine

- attenuates lipopolysaccharide-induced extracellular matrix accumulation and inflammation in rat mesangial cells: involvement of NF-kappaB signaling pathway. *Mol CellEndocrinol* 2011; 331(1): 34-40.
- 21 Schmid H, Boucherot A, Yasuda Y, Henger A, Brunner B, Eichinger F, *et al.* Modular activation of nuclear factor-kappaB transcriptional programs in human diabetic nephropathy. *Diabetes* 2006; 55(11): 2993-3003.
- 22 Zhang H, Sun SC. NF-kappaB in inflammation and renal diseases. *Cell Biosci* 2015; 5: 63.
- 23 Kunsch C, Ruben SM, Rosen CA. Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12(10): 4412-21.
- 24 Kohda A, Yamazaki S, Sumimoto H. The nuclear protein IkappaBzeta forms a transcriptionally active complex with nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) p50 and the Lcn2 promoter via the N- and C-terminal ankyrin repeat motifs. *J Biol Chem* 2016; 291(39): 20739-52.