

# 炎症上调NPC1加重高脂负荷下HMCs胆固醇积聚致细胞损伤机制

李倩倩<sup>1</sup> 杨雪钧<sup>1</sup> 阳海平<sup>1</sup> 陈压西<sup>2</sup> 张高福<sup>1\*</sup> 李秋<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学附属儿童医院肾脏内科, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿童感染免疫重庆市重点实验室, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 重庆 400014;

<sup>2</sup>重庆医科大学脂糖代谢性疾病重庆市重点实验室, 脂质研究中心, 400014 重庆)

**摘要** 观察炎症因子IL1- $\beta$ 对高脂负荷下人肾脏系膜细胞(human glomerular mesangial cells, HMCs)C型尼曼匹克蛋白1(Niemann-pick protein c1, NPC1)表达水平的影响, 并初步探讨NPC1介导的胆固醇积聚致细胞损伤的作用机制。体外培养HMCs分为正常对照组、高脂组、高脂+炎症组。Western blot测NPC1蛋白含量; 酶法测细胞及内质网胆固醇水平; CCK8法测细胞增殖; 流式细胞术测细胞周期; 荧光定量PCR测NPC1、GRP78、PERK、ATF6、FN、Col IV mRNA; 免疫荧光技术测GRP78、FN的表达水平。予U-18666A干预NPC1的功能, 观察内质网胆固醇水平、细胞增殖能力、GRP78、FN、Col IV mRNA水平的变化。结果显示, 高脂促进NPC1蛋白及mRNA的表达水平, 同时细胞总胆固醇及内质网胆固醇浓度增加, 增殖加快、S期比例增加、内质网应激相关分子——GRP78、PERK、ATF6 mRNA及系膜基质成分——FN、Col IV mRNA水平均增加, GRP78、FN的荧光强度也增加; 炎症进一步上调高脂负荷下上述各指标水平。U-18666A干预后可减轻高脂和炎症导致的内质网胆固醇积聚及细胞损伤。综上, 炎症可通过上调NPC1的表达水平, 加重高脂负荷下肾系膜细胞及内质网胆固醇积聚, 诱发细胞损伤。

**关键词** NPC1; 炎症; 高脂; 胆固醇沉积; 内质网应激; 系膜细胞

## Inflammation Aggravates Intracellular Cholesterol Accumulation and Injury in HMCs Loaded by Low-Density Lipoprotein via Up-Regulating NPC1 Expression

Li Qianqian<sup>1</sup>, Yang Xuejun<sup>1</sup>, Yang Haiping<sup>1</sup>, Chen Yaxi<sup>2</sup>, Zhang Gaofu<sup>1\*</sup>, Li Qiu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Nephrology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Key Laboratory of the Ministry of Education, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Child Infection and Immunity, Chongqing 400014, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Metabolism on Lipid and Glucose, Center for Lipid Research, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

**Abstract** Investigate the effect of IL1- $\beta$  on NPC1 (Niemann-pick protein c1) expression in human mesangial cell (HMCs) loaded by low-density lipoprotein (LDL) and explore whether NPC1-mediated cholesterol accumulation causing cell injury. HMCs were divided into control group, LDL group, LDL+IL-1 $\beta$  group. The level of NPC1 protein was detected by Western blot. The total cholesterol and endoplasmic reticulum chole-

收稿日期: 2018-11-18 接受日期: 2019-04-19

国家自然科学基金(批准号: 81270802)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13883058878, E-mail: zhanggaofu19992004@163.com; Tel: 023-63603929, E-mail: liqiu809@126.com

Received: November 18, 2018 Accepted: April 19, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81270802)

\*Corresponding authors. Tel: +86-13883058878, E-mail: zhanggaofu19992004@163.com; Tel: +86-23-63603929, E-mail: liqiu809@126.com

网络出版时间: 2019-07-16 16:26:10

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190716.1626.022.html>

terol were detected by a cholesterol detection kit. Cell proliferation was measured using a cell count kit. Cell cycle was detected by flow cytometry PI/RN staining. The mRNA levels of *NPC1*, glucose-regulated protein78 (*GRP78*), protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (*PERK*), activating transcription factor 6 (*ATF6*), fibronectin (*FN*), type IV collagen secretion (*Col IV*) were measured by real-time quantitative PCR. *GRP78* and *FN* protein level were detected using immunofluorescent staining. After using U-18666A to intervene the function of *NPC1*, the level of endoplasmic reticulum cholesterol, cell proliferation, cell cycle, *GRP78*, *FN* and *Col IV* mRNA was measured. We found that LDL loading alone significantly increased the expression of *NPC1*, promoted intracellular and endoplasmic reticulum cholesterol accumulation, accelerated the proliferation of HMCs, increased the ratio of S phase in cell cycle, and promoted the expression of endoplasmic reticulum stress marker (*GRP78*, *PERK*, *ATF6* mRNA) and mesangial matrix marker (*FN*, *Col IV* mRNA), increased the mean fluorescence intensity of *GRP78* and *FN*. Inflammation further aggravated the level of the above indicators in HMCs loaded by LDL. Compared with LDL+IL-1 $\beta$  group, co-treatment with U-18666A significantly decreased the level of endoplasmic reticulum cholesterol, cell proliferation, ratio of S phase in cell cycle and *GRP78*, *FN*, *Col IV* mRNA. These results suggested that inflammation aggravated intracellular and endoplasmic reticulum cholesterol accumulation in HMCs via up-regulating *NPC1* expression and caused endoplasmic reticulum stress (ERS) and cell injury.

**Keywords** *NPC1*; inflammation; high lipid; cholesterol accumulation; endoplasmic reticulum stress; mesangial cells

脂质代谢紊乱或持续的高脂血症是肾脏损害的独立危险因素,可致慢性肾脏疾病和肾小球硬化<sup>[1]</sup>。同时,炎症是脂代谢紊乱致肾脏损伤的一个关键因素,炎症可通过影响细胞内的胆固醇平衡,促进肾病的发生发展<sup>[2]</sup>。C型尼曼匹克蛋白1(Niemann-pick protein c1, *NPC1*)是位于晚期内体(late endosome, LE)和溶酶体(lysosome, LY)膜上的一个跨膜蛋白,其主要作用是介导晚期内体和溶酶体中LDL来源的游离胆固醇的向细胞膜及内质网转运<sup>[3]</sup>, *NPC1*的异常表达可导致胞内胆固醇异常分布<sup>[4]</sup>。本课题组<sup>[5]</sup>既往研究发现,炎症能促进高脂状态下肾脏足细胞*NPC1*的表达水平,引起脂代谢紊乱,诱发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)致细胞损伤。人肾脏系膜细胞(human glomerular mesangial cells, HMCs)是肾脏的固有细胞,对维持肾脏结构和功能的完整性具有重要作用,系膜细胞的异常增殖、细胞外基质沉积,与肾小球硬化和肾脏纤维化密切相关<sup>[6]</sup>。但目前关于*NPC1*在系膜细胞中的作用研究尚无报道。本研究拟通过体外实验,观察炎症因子对高脂负荷下系膜细胞*NPC1*表达水平的影响,并初步探讨*NPC1*介导的脂代谢紊乱在肾脏系膜细胞损伤中所起的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞系 人肾脏系膜细胞HMCs由英国伦敦皇家自由医学院阮雄中教授惠赠<sup>[7-8]</sup>。

1.1.2 人低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)采用低温超高速离心分离正常人新鲜血浆LDL,脱盐层析柱纯化,0.22  $\mu\text{m}$ 无菌滤器滤过除菌,Lowry法定量测LDL浓度<sup>[9]</sup>。

1.1.3 主要试剂 RPMI 1640培养基购自Gibco公司;胎牛血清购自Millipore公司;胰岛素-转铁蛋白-亚硒酸钠(insulin-transferrin-sodium selenite, ITS)购自corning公司;重组人IL 1- $\beta$ 细胞因子购自Peprotech公司;U-18666A(3- $\beta$ [2-(diethylamino) methoxy] androst-5-en-17-one)购自cayman公司;*NPC1*抗体(ab106534)、*GRP78*抗体(ab21685)、山羊抗兔TRITC二抗购自abcam公司;*FN*抗体(GTX112794)购自Gene Tex公司;CCK8试剂盒购自日本同仁研究所;细胞周期检测试剂盒PI-RNase购自BD公司;胆固醇检测试剂盒购自北京普利莱公司;内质网提取试剂盒购自sigma公司;核酸提取试剂盒购自百泰克公司;荧光定量PCR试剂盒(SYBR Green)购自北京天根生化科技有限公司。引物由Invitrogen公司合成。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 HMCs复苏后, 培养于含10%胎牛血清、1% ITS、100 U/mL青霉素和100  $\mu$ g/mL链霉素的RPMI 1640培养液中。将处于对数生长期的细胞平均接种于6孔板, 培养24 h后, 按下列分组进行处理。(1)正常对照组(CTL组): 给予正常培养液;(2)高脂组(low-density lipoprotein, LDL组): 给予含200  $\mu$ g/mL LDL的培养液<sup>[10]</sup>;(3)高脂+炎症组(LDL+IL-1 $\beta$ 组): 在高脂组基础上加20 ng/mL IL-1- $\beta$ <sup>[10]</sup>。并予以NPC1通路阻断剂U-18666A干预<sup>[11-14]</sup> (U-18666A+LDL+IL-1 $\beta$ 组): 在高脂+炎症组的基础上加37  $\mu$ g/mL U-18666A。各组均置于37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中孵育, 以LDL、IL-1 $\beta$ 处理48 h, U-18666A处理10 h后使检测相关指标。

1.2.2 蛋白提取及Western blot检测NPC1蛋白的表达水平 将干预后的细胞用冰PBS清洗, 加入细胞裂解液, 冰上裂解30 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心10 min, 收集上清液, 用BSA蛋白试剂盒测蛋白浓度。取等量总蛋白进行SDS-PAGE蛋白电泳, 将蛋白从SDS-PAGE凝胶上转移到PVDF膜, BSA室温封闭1 h, 加入NPC1蛋白抗体(1:500) 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 加入山羊抗兔二抗(1:2 000)室温孵育1 h, 化学发光法显色。

1.2.3 实时荧光定量PCR(Real-time Quantitative polymerase chain reaction, qPCR)检测 *NPC1*、*PERK*、*ATF6*、*grp78*、*FN*、*Col IV* mRNA水平 将刺激后的细胞, 按照RNA提取试剂盒说明书提取各组细胞总RNA, 各组取等量RNA作为模板, 逆转录合成cDNA。取1  $\mu$ L

cDNA、以*GAPDH*为内参进行实时荧光定量PCR。相关基因PCR序列见表1。

1.2.4 免疫荧光法检测细胞内GRP78和FN的表达 将系膜细胞接种于放置有细胞爬片的24孔板, 经相应处理后, 弃培养液, PBS洗3次。用预冷的4%多聚甲醛固定15 min弃固定液, PBS洗3次。每孔300  $\mu$ L 0.5% triton打孔10 min, PBS洗3次。室温5% BSA封闭30 min。弃多余封闭液, 分别孵相应一抗4 $^{\circ}$ C(GRP78 1:1 000, FN 1:200)过夜。复温30 min, PBS洗3次, 山羊抗兔二抗(1:300)室温孵育1 h, PBS洗3次。DAPI(1:200)室温孵育30 min, PBS洗3次, 封片, 共聚焦荧光显微镜(购自Nikon公司)拍照。

1.2.5 普利莱胆固醇试剂盒检测细胞内总胆固醇 将系膜细胞经相应处理后, 弃掉原培养液, PBS洗3次, 加1 mL胆固醇裂解液室温静置10 min, 以R1:R2=4:1的比例配置工作液, 190  $\mu$ L工作液:10  $\mu$ L样品/每孔混匀, 37 $^{\circ}$ C反应20 min, 酶标仪于550 nm处测吸光度值, 并以每毫克蛋白浓度校正胆固醇含量。

1.2.6 内质网提取试剂盒提取细胞内质网并检测内质网胆固醇含量 消化离心收集干预后的细胞, PBS洗涤, 室温下600 r/min离心5 min, PBS洗2次, 弃上清。用3倍体积1 $\times$ 低渗液重悬细胞, 4 $^{\circ}$ C静置10 min使细胞肿胀, 600 r/min离心5 min, 弃上清, 加2倍体积1 $\times$ 等张液研磨, 将匀浆液以1 000 r/min 4 $^{\circ}$ C离心10 min, 去除上层漂浮的脂质层, 将上清液12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C离心10 min, 将上清液转移到烧杯并加入7.5倍体积浓度

表1 实时荧光定量PCR引物序列

Table 1 Primer for Sequences qPCR

基因	引物序列(5' $\rightarrow$ 3')	正反链
Genes	Primer sequence (5' $\rightarrow$ 3')	Orientation
<i>NPC1</i>	AAG GGT CGG TCG GTT TAC CA	Sense
	GTT CAC AGG CGC TAC GTT CA	Anti-sense
<i>GRP78</i>	CCG AGA ACA CGG TCT TTG AC	Sense
	CTT TGT TTG CCC ACC TCC AA	Anti-sense
<i>PERK</i>	TGG CCA GAA AGG AGA GAT GG	Sense
	TGG TGG ACC TGG AAA TCC TC	Anti-sense
<i>ATF6</i>	TGG AAG CAGCAA ATG AGA CG	Sense
	TGA GGA GGC TGG AGA AAG TG	Anti-sense
<i>FN</i>	TGG AGG AAG CCG AGG TTT	Sense
	CAG CGG TTT GCG ATG GTA	Anti-sense
<i>Col IV</i>	CAG CCA GGA CCT AAA GGT GA	Sense
	CTC CAG GTA AGC CAG GTG AA	Anti-sense
<i>GAPDH</i>	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	Sense
	GAA GAT GGT GAT GGG ATT C	Anti-sense

为8 mol/L的氯化钙溶液,冰上研磨15 min,8 000 r/min 4 °C离心10 min,沉淀即为内质网小体。再用普利莱胆固醇试剂盒检测该沉淀物的胆固醇含量并以每毫克蛋白浓度校正。

**1.2.7 CCK8检测细胞增殖** 将对数生长期的细胞以 $2 \times 10^4$ 个/mL(每孔100  $\mu$ L)接种于96孔板,每组设置5个复孔,各组细胞进行相应刺激处理,分别于刺激前以及刺激后24 h、48 h、72 h向各孔板中加入CCK8试剂,每孔10  $\mu$ L,继续孵育3 h。用酶标仪于450 nm处测吸光度值。

**1.2.8 流式细胞术PI/RN染色法检测细胞周期** 消化离心收集干预后的细胞,PBS 1 000 r/min离心5 min,洗2次,弃上清。加1 mL 70%乙醇重悬细胞4 °C过夜。3 000 r/min离心3 min,弃上清。PBS洗2次,37 °C水浴复温30 min,加10  $\mu$ L RNA酶,37 °C水浴反应30 min,加入PI/RNase缓冲液500  $\mu$ L避光染色30 min,流式上机检测。

**1.2.9 数据统计及分析** 至少3次独立重复实验数据,结果采用GraphPad 5.01及SPSS 20.0软件进行单因素方差分析和Student's *t*-test检验,计量资料结果用 $\bar{x} \pm S.D.$ 表示。 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高脂和炎症对各组HMCs NPC1表达水平的影响

实时荧光定量PCR检测NPC1的mRNA表达水

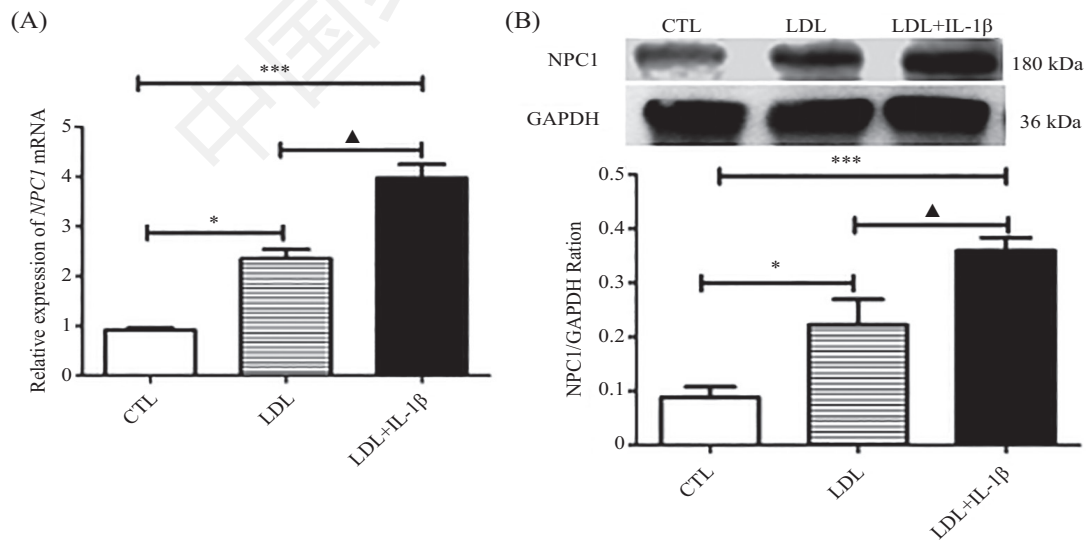
平、Western blot检测NPC1蛋白的表达水平,图1A和图1B结果所示:与CTL组相比,LDL组( $P < 0.05$ )、LDL+IL-1 $\beta$ 组( $P < 0.001$ )NPC1的表达量显著升高;LDL+IL-1 $\beta$ 组组较LDL组,NPC1表达又进一步升高( $P < 0.05$ )。提示高脂可促进NPC1在HMCs的表达水平,炎症可进一步上调高脂负荷下NPC1的表达水平。

### 2.2 各组细胞内总胆固醇及内质网胆固醇浓度

图2结果所示,细胞内总胆固醇水平,与CTL组( $64.00 \pm 8.64$ )相比,LDL组( $88.13 \pm 6.98$ ,  $P < 0.05$ )、LDL+IL-1 $\beta$ 组( $118.40 \pm 10.46$ ,  $P < 0.001$ )均显著增加;内质网胆固醇水平,与CTL组( $50.17 \pm 5.41$ )相比,LDL组( $65.99 \pm 3.97$ ,  $P < 0.05$ )、LDL+IL-1 $\beta$ 组( $92.39 \pm 4.83$ ,  $P < 0.001$ )也均明显增加。与LDL组相比,LDL+IL-1 $\beta$ 组细胞内总胆固醇水平及内质网胆固醇水平均增加( $P < 0.05$ )。提示,高脂会增加细胞内总胆固醇及内质网胆固醇水平,炎症进一步加重高脂负荷下细胞及内质网胆固醇沉积。

### 2.3 高脂和炎症对HMCs内质网应激相关分子及系膜基质成分表达水平的影响

内质网应激(ERS)相关分子——葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, *GRP78*)、蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, *PERK*)、活化转录因子6(activating transcription factor 6, *ATF6*) mRNA的表达。图3A结果提示, *GRP78*



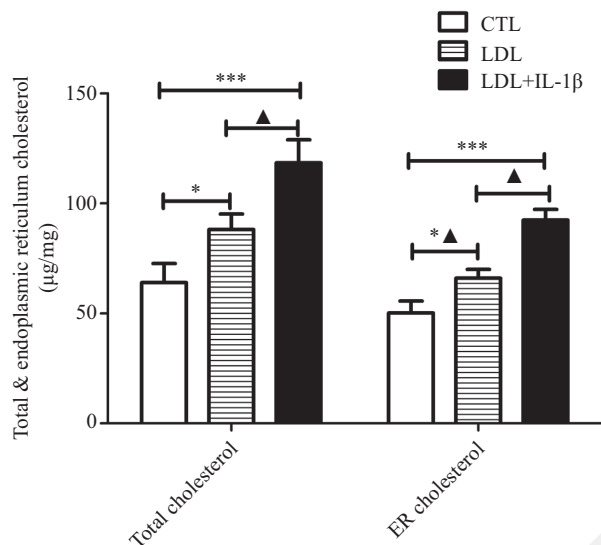
A. qPCR检测NPC1 mRNA的表达水平; B. Western blot检测NPC1蛋白的表达水平。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,与CTL组比较;  $\blacktriangle P < 0.05$ ,与高脂+炎症组比较。

A: expression of NPC1 mRNA was detected by qPCR; B: Western blot detection of NPC1 protein in different groups. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs CTL group;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs LDL+IL-1 $\beta$  group.

图1 高脂和炎症对各组HMCs NPC1表达水平的影响

Fig.1 Effect of high lipid and inflammation on the expression of NPC1 in HMCs



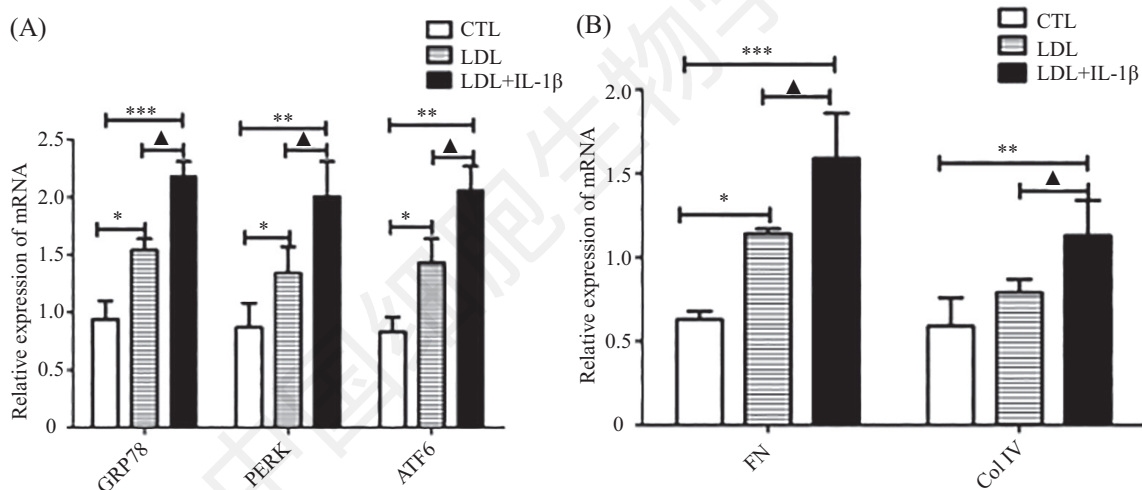


\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与CTL组比较; ▲ $P < 0.05$ , 与高脂+炎症组比较。

\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs CTL group; ▲ $P < 0.05$  vs LDL+IL-1β group.

图2 各组HMCs细胞总胆固醇及内质网胆固醇水平

Fig.2 Level of total and endoplasmic reticulum cholesterol in HMCs among different groups



A: qPCR检测各组内质网应激(ERS)相关分子——*GRP78*、*PERK*、*ATF6* mRNA的表达水平; B: qPCR检测各组系膜基质成分——*FN*、*Col IV* mRNA的表达水平。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与CTL组比较; ▲ $P < 0.05$ , 与高脂+炎症组比较。

A: the mRNA expression of endoplasmic reticulum stress marker (*GRP78*, *PERK*, *ATF6*) was detected by qPCR; B: the mRNA expression of mesangial matrix marker (*FN*, *Col IV*) was detected by qPCR. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs CTL group; ▲ $P < 0.05$  vs LDL+IL-1β group.

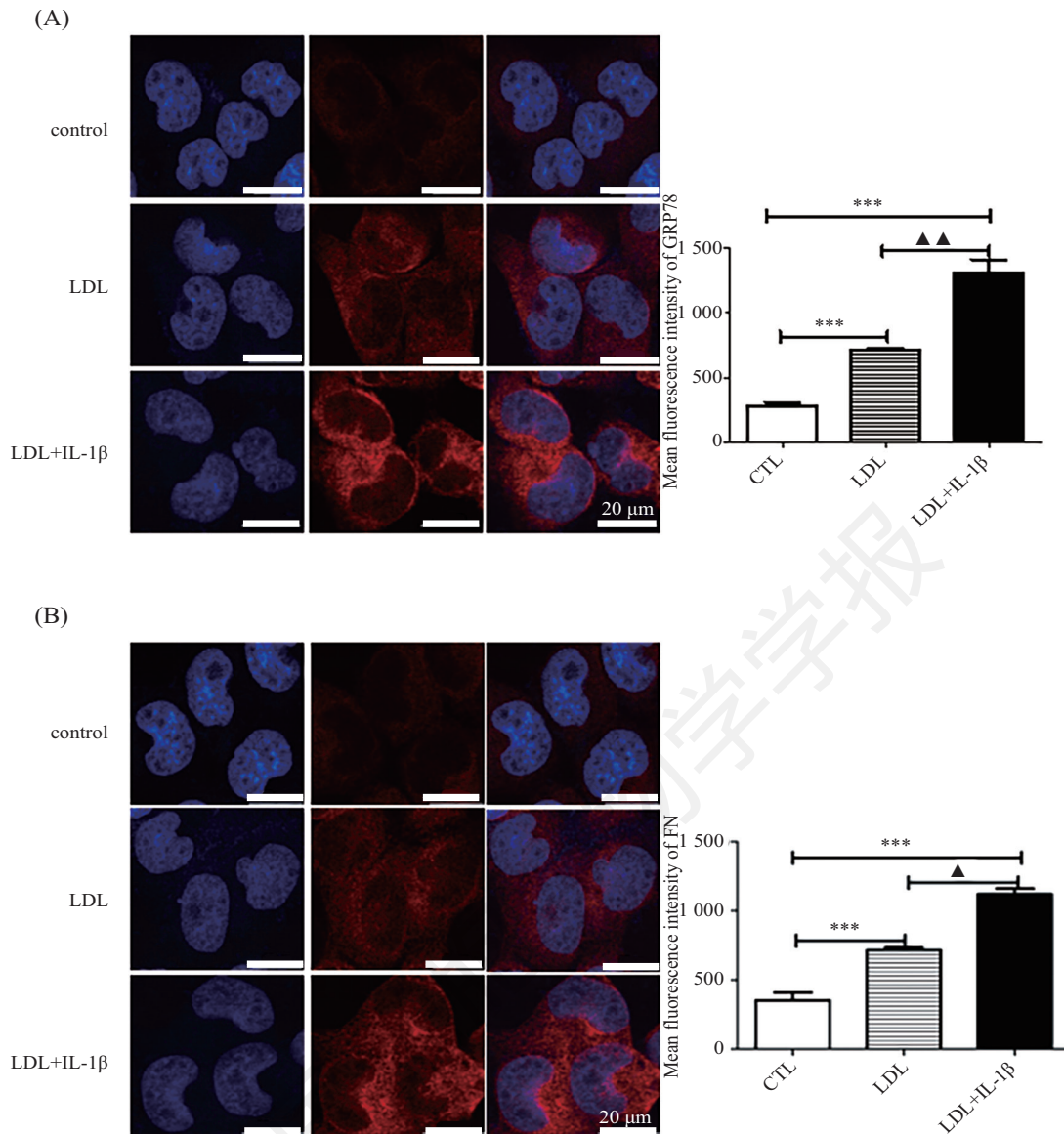
图3 高脂和炎症对HMCs内质网应激相关分子及系膜基质成分表达水平的影响

Fig.3 Effect of high-lipid and inflammation on expression of endoplasmic reticulum stress marker and mesangial matrix marker in HMCs among different groups

mRNA的表达水平, 与CTL组( $0.94 \pm 0.16$ )相比, LDL组( $1.54 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$ )、LDL+IL-1β组( $2.17 \pm 0.13$ ,  $P < 0.001$ )均显著升高; *PERK* mRNA的表达水平, 较CTL组( $0.87 \pm 0.21$ ), LDL组( $1.34 \pm 0.23$ ,  $P < 0.05$ )、LDL+IL-1β组( $2.10 \pm 0.30$ ,  $P < 0.01$ )均显著升高; *ATF6* mRNA的表达水平, 相比CTL组( $0.83 \pm 0.13$ ), LDL组( $1.43 \pm 0.21$ ,  $P < 0.05$ )、LDL+IL-1β组( $2.06 \pm 0.21$ ,  $P < 0.01$ )也均显著

升高。LDL+IL-1β组较LDL组, 上述三种指标的表达增加。提示高脂可引起HMCs发生内质网应激, 炎症可进一步加重高脂负荷下细胞的ERS。

系膜基质成分——细胞内纤维连接蛋白(fibronectin, *FN*)、IV型胶原蛋白(type IV collagen secretion, *Col IV*) mRNA水平。图3B显示, *FN* mRNA的水平, 与CTL组( $0.63 \pm 0.05$ )相比, LDL组( $1.14 \pm 0.13$ ,  $P < 0.05$ )、LDL+IL-



A: 免疫荧光检测GRP78的表达水平; B: 免疫荧光检测FN的表达水平。\*\*\* $P < 0.001$ , 与CTL组比较; ▲ $P < 0.05$ , ▲▲ $P < 0.01$ , 与高脂+炎症组比较。

A: immunofluorescence detection of GRP78 in different groups; B: immunofluorescence detection of FN in different groups. \*\*\* $P < 0.001$  vs CTL group; ▲ $P < 0.05$ , ▲▲ $P < 0.01$  vs LDL+IL-1 $\beta$  group.

图4 高脂和炎症对各组HMCs GRP78及FN表达的影响

Fig.4 Immunofluorescence detection of GRP78 and FN in different groups

1 $\beta$ 组( $1.59 \pm 0.27$ ,  $P < 0.001$ )均显著升高; *Col IV* mRNA水平, 较CTL组( $0.58 \pm 0.07$ ), LDL+IL-1 $\beta$ 组( $1.13 \pm 0.12$ ,  $P < 0.01$ )显著升高。LDL+IL-1 $\beta$ 组较LDL组, 二者的表达均进一步增加。提示, 高脂可增加系膜基质相关分子的表达, 炎症可进一步加重高脂负荷下上述指标的水平。

#### 2.4 免疫荧光检测GRP78及FN的表达水平

共聚焦显微镜下观察, 如图4A和图4B所示: 红光分别代表GRP78(图4A)和FN(图4B), 蓝光代表细胞核, 半定量分析平均荧光强度。较CTL组( $277.2 \pm 76.8$ ),

LDL组( $711.7 \pm 114.9$ )、LDL+IL-1 $\beta$ 组( $1317 \pm 238.0$ ), GRP78的荧光强度均显著增加( $P < 0.001$ ); 炎症可增加高脂状态下GRP78的表达( $P < 0.01$ )。与CTL组( $291.6 \pm 153.5$ )相比, LDL组( $743.7 \pm 130.4$ )、LDL+IL-1 $\beta$ 组( $1122 \pm 129.5$ ), FN的荧光强度亦均显著增加( $P < 0.001$ ); 炎症进一步增加高脂状态下FN的荧光强度( $P < 0.05$ )。提示高脂可诱发HMCs内质网应激和系膜基质成分过度表达, 炎症可加重高脂负荷下系膜细胞上述损伤。

#### 2.5 高脂和炎症对各组HMCs细胞增殖能力的影响

CCK8法检测各组细胞增殖能力, 结果如表2所

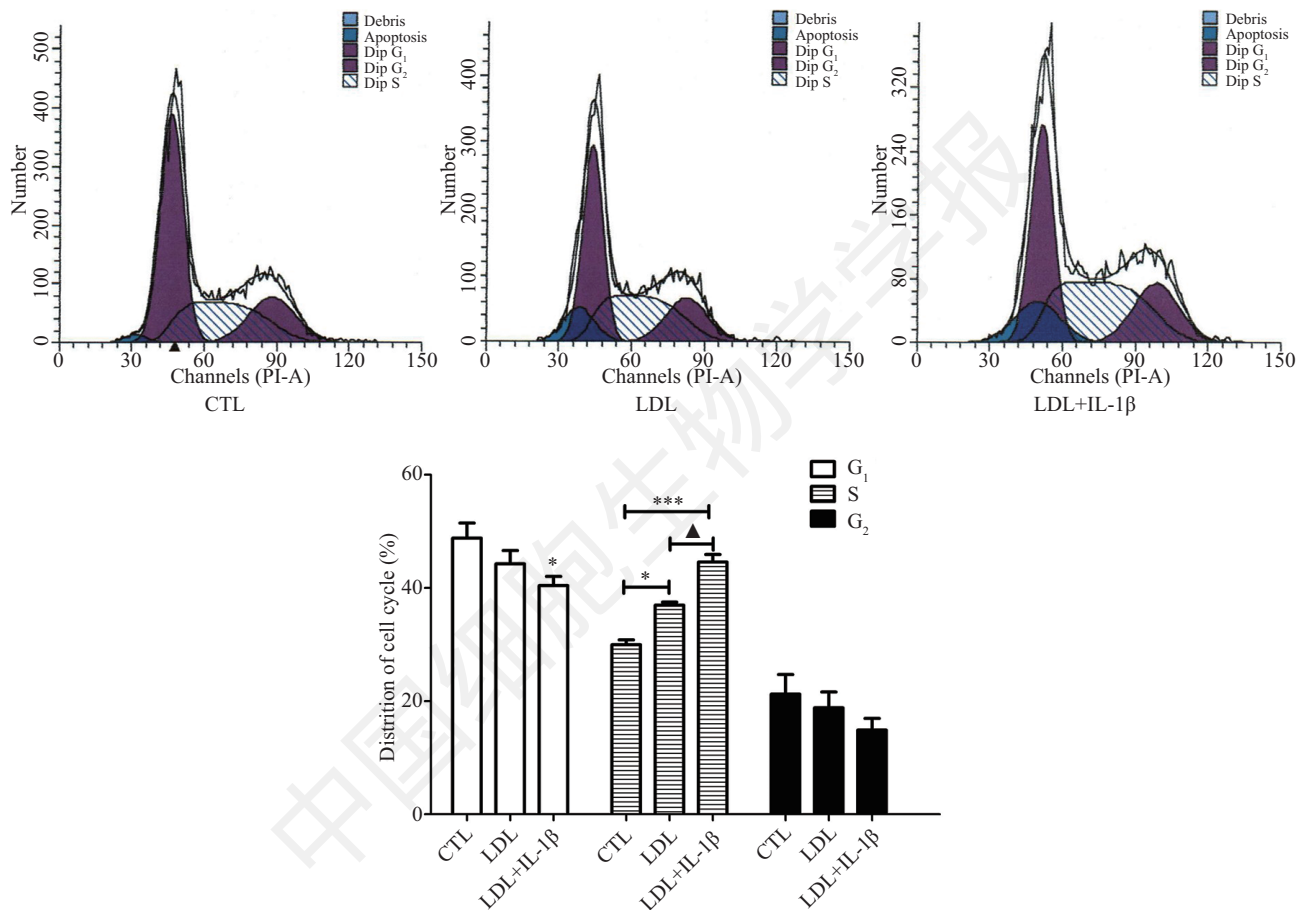
表2 各组HMCs增殖结果

Table 2 Proliferation ability of HMCs in different groups

时间点	对照组	高脂组	高脂+炎症组
Time point	CTL group	LDL group	LDL+IL-1 $\beta$ group
0 h	0.53 $\pm$ 0.04	0.52 $\pm$ 0.03	0.51 $\pm$ 0.02
24 h	0.68 $\pm$ 0.03	0.76 $\pm$ 0.02*	0.79 $\pm$ 0.12*
48 h	1.17 $\pm$ 0.10	1.36 $\pm$ 0.08* $\blacktriangle$	1.55 $\pm$ 0.06***
72 h	1.34 $\pm$ 0.06	1.59 $\pm$ 0.07*** $\blacktriangle\blacktriangle$	1.96 $\pm$ 0.10***

\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001, 与对照组比较;  $\blacktriangle$  $P$ <0.05,  $\blacktriangle\blacktriangle$  $P$ <0.01, 与高脂+炎症组比较。

\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 vs CTL group;  $\blacktriangle$  $P$ <0.05,  $\blacktriangle\blacktriangle$  $P$ <0.01 vs LDL+IL-1 $\beta$  group.



\* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.01与对照组比较;  $\blacktriangle$  $P$ <0.05, 与高脂+炎症组比较。

\* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.01 vs CTL group;  $\blacktriangle$  $P$ <0.05 vs LDL+IL-1 $\beta$  group.

图5 各组细胞周期分布图

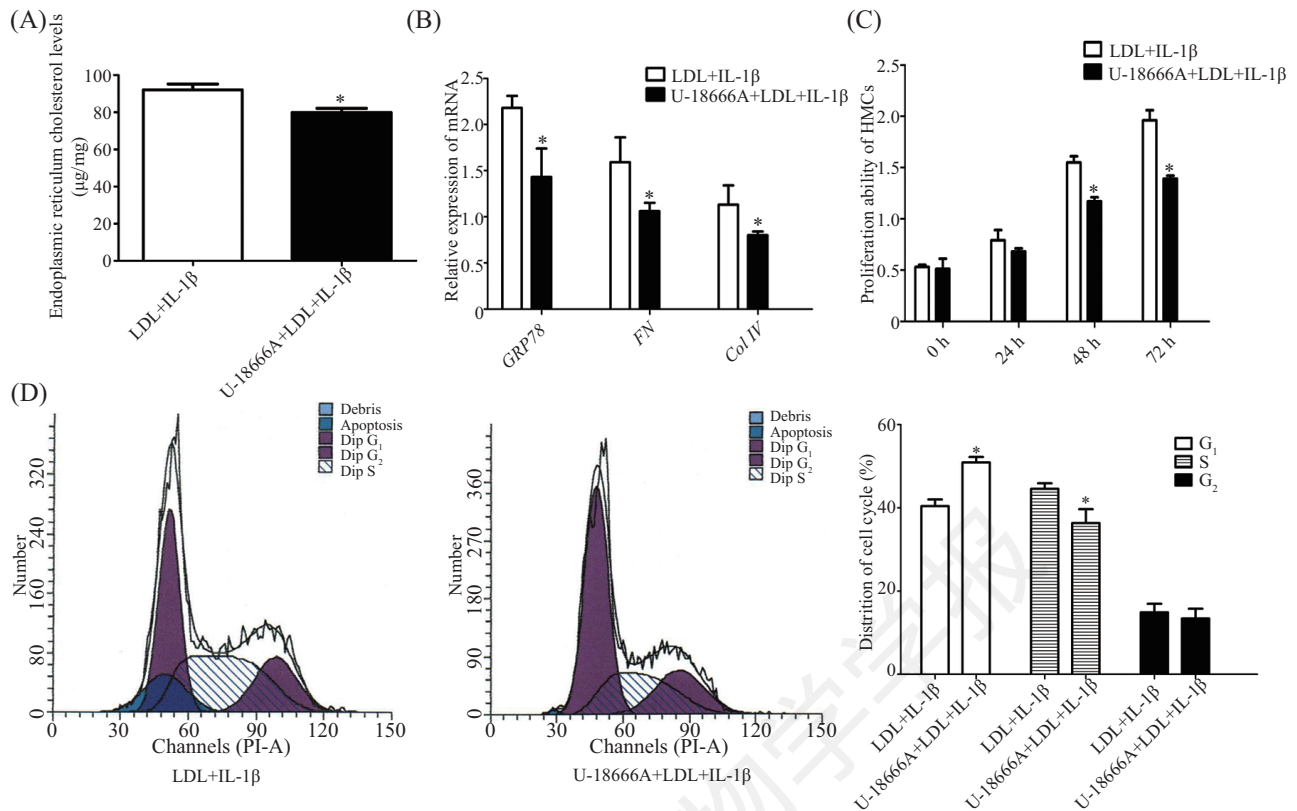
Fig.5 The distribution of cell cycle in different groups

示, 刺激24 h后, 与CTL组相比, LDL组、LDL+IL-1 $\beta$ 组细胞增殖均显著加快( $P$ <0.05); 刺激48 h后, LDL组( $P$ <0.05)、LDL+IL-1 $\beta$ 组( $P$ <0.001)较CTL组细胞仍过度增殖; 刺激72 h后, LDL组( $P$ <0.01)、LDL+IL-1 $\beta$ 组( $P$ <0.001)细胞仍明显异常增殖。与LDL组相比, LDL+IL-1 $\beta$ 组在24 h时间点增殖无明显差异( $P$ >0.05), 但在48 h( $P$ <0.05)、72 h( $P$ <0.01)时间点增殖进一步加快。提示, 高脂可诱导HMCs过度增殖,

并呈时间依赖性, 炎症可加重高脂负荷下细胞的过度增殖。

## 2.6 各组HMCs细胞周期分布

流式细胞术PI/RN染色法检测HMCs细胞周期, 结果(图5)显示: 与CTL组相比, LDL组( $P$ <0.05)、LDL+IL-1 $\beta$ 组( $P$ <0.001) S期比例显著增加; 与LDL组相比, LDL+IL-1 $\beta$ 组S期比例进一步增加( $P$ <0.05)。S期是细胞DNA和组蛋白合成最旺盛的时期, S期比例



A: U-18666A干预对内质网胆固醇水平的影响; B: U-18666A干预后 $GRP78$ 、 $FN$ 、 $Col IV$  mRNA水平的变化; C: U-18666A干预后对细胞增殖的影响; D: U-18666A干预后细胞周期分布的影响。\* $P < 0.05$ 与高脂+炎症组比较。

A: effect of U-18666A intervention on level of endoplasmic reticulum cholesterol; B: effect of U-18666A intervention on expression of  $GRP78$ ,  $FN$ ,  $Col IV$  mRNA; C: effect of U-18666A on ability of proliferation; D: effect of U-18666A on distribution of cell cycle. \* $P < 0.05$  vs LDL+IL-1 $\beta$  group.

图6 U-18666A干预对HMCs内质网胆固醇集聚和细胞损伤的影响

Fig.6 Effect of U-18666A intervention on endoplasmic reticulum cholesterol accumulation and cell injury in HMCs

增加说明细胞增殖活跃。提示,高脂可引起HMCs增殖加快,炎症又进一步加重高脂负荷下细胞的异常增殖。

## 2.7 U-18666A干预对HMCs内质网胆固醇集聚和细胞损伤的影响

U-18666A能干预NPC1的功能<sup>[9-11]</sup>,在高脂炎症基础上,予以U-18666A干预,结果如图6所示:与LDL+IL-1 $\beta$ 组相比,U-18666A+LDL+IL-1 $\beta$ 组内质网胆固醇浓度显著降低( $79.20 \pm 3.03$ ,  $P < 0.05$ ,图6A);与LDL+IL-1 $\beta$ 组相比,U-18666A+LDL+IL-1 $\beta$ 组 $GRP78$ 、 $FN$ 、 $Col IV$  mRNA( $1.43 \pm 0.31$ 、 $1.06 \pm 0.09$ 、 $0.80 \pm 0.04$ )的表达水平显著减低( $P < 0.05$ ,图6B);与LDL+IL-1 $\beta$ 组相比,U-18666A+LDL+IL-1 $\beta$ 组在刺激后48 h( $1.17 \pm 0.04$ )、72 h( $1.38 \pm 0.02$ )时间点的细胞增殖速率显著加快( $P < 0.05$ ,图6C);细胞周期G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期比例显著增加( $P < 0.05$ )、S期比例明显减少( $P < 0.05$ ,图6D)。提示,干扰NPC1功能后,可显著减少胆固醇向内质网的转

运,减少高脂炎症状态下内质网胆固醇水平,缓解ERS,减轻细胞过度增殖和系膜基质成分的异常表达。

## 3 讨论

1982年Moorhead等<sup>[14]</sup>提出“脂质肾毒性”学说,后有研究表明,脂质代谢紊乱是肾脏疾病的独立危险因素<sup>[1]</sup>。有研究发现,低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLr)缺陷所致LDL降解异常可加重肾病综合症的肾脏损伤<sup>[15]</sup>,高甘油三酯血症可加重肾病的蛋白尿表现<sup>[16]</sup>等。同时,炎症在慢性肾脏疾病的发生发展中也具有重要作用,炎症因子可通过干扰细胞水平的胆固醇平衡,加速高脂状态下的肾脏损伤<sup>[2]</sup>。系膜细胞是肾小球的固有细胞,系膜细胞的过度增殖、系膜基质增生是糖尿病肾病<sup>[17]</sup>、系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)、膜增生性肾



小球肾炎(membrano-proliferative glomerulo nephritis, MPGN)<sup>[18]</sup>等多种肾脏疾病的重要病理改变,在肾小球硬化和肾脏纤维化中起着重要作用,但其中的相关机制尚不明确。

C型尼曼匹克蛋白1(Niemann-pick protein c1, NPC1)是位于晚期内体和溶酶体膜上的一个具有胆固醇敏感区的跨膜蛋白,可将LDL来源的胆固醇转移到溶酶体膜上并跨膜向内质网或质膜转运,以便胆固醇发生酯化作用并通过载脂蛋白A-I进行外排<sup>[3-4]</sup>。近年来越来越多的研究开始关注, NPC1在脂代谢相关疾病中的作用。NPC1杂合子突变能抑制胆固醇向内质网转运从而减轻动脉粥样硬化病变中巨噬细胞的凋亡<sup>[19]</sup>;过表达NPC1使LDL来源的胆固醇向内质网和质膜的转运加快<sup>[20]</sup>,下调NPC1表达水平可以降低高脂饮食对小鼠肝脏的损害,延缓脂肪肝的发生<sup>[21]</sup>。本课题组既往研究发现<sup>[5]</sup>,炎症状态下高脂可通过NPC1介导内质网脂质过载,引起内质网应激和足细胞损伤。高脂负荷下,炎症因子可否加重NPC1介导的细胞内胆固醇平衡紊乱,并对系膜细胞损伤产生一定影响?本研究发现,高脂可促进肾脏系膜细胞内NPC1的表达水平,炎症又可加重高脂负荷下系膜细胞内NPC1的表达量,进一步加重胆固醇向内质网转运,引起内质网及细胞内脂质过载,诱发内质网应激和细胞损伤。以上结果提示,炎症可加重高脂负荷下系膜细胞内NPC1 mRNA及蛋白的表达水平,干扰NPC1介导的胆固醇转运,但其中的具体作用机制尚有待进一步研究。

内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)在多种因素诱发的肾脏疾病的病理过程中起重要作用,如高糖、脂代谢紊乱、炎症、缺氧、钙超载等因素均能诱导肾脏细胞发生ERS,引起肾脏损害<sup>[22-23]</sup>。ERS可触发以未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)为核心的蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)、1型内质网转膜蛋白激酶(inositol-requiring enzyme 1, IRE1)、活化转录因子6(activating transcription factor 6, ATF6)三条跨膜信号通路。生理状态下,它们与葡萄糖调节蛋白78(glucose regulatory protein78, GRP78)/Bip相结合,当发生ERS时,内质网中未折叠或错误折叠的蛋白质竞争性结合GRP78/Bip,使上述3中膜蛋白与之分离活化,表达增加<sup>[24]</sup>。本实验的研究结果显示,炎症可加重高脂负荷下NPC1介导的细胞及内质网

胆固醇沉积,使GRP78、PERK、ATF6 mRNA的表达以及GRP78荧光强度进一步增高,引起内质网应激,造成细胞损伤。

系膜细胞过度增殖及细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)沉积是肾小球硬化的重要病理改变。FN和Col IV是由系膜细胞分泌的ECM的重要组成部分,二者均可随细胞增殖而分泌增多。FN对介导细胞增殖和其他的ECM成分的分泌也起到重要的作用,是促进肾脏纤维化的一个重要因素<sup>[25]</sup>。IV胶原蛋白是构成肾小球基底膜网架的支架,其分泌的异常,则会导致肾小球基底膜增厚和以系膜区为主的细ECM积聚<sup>[26]</sup>。本实验的研究结果显示,单纯高脂刺激会使HMCs异常增殖、S期比例增加即细胞增殖过度、FN、Col IV mRNA表达量以及FN荧光强度增加,炎症会加重高脂状态下HMCs的异常增殖和系膜基质成分的过度表达。提示炎症可加重高脂负荷下NPC1的表达及其介导的细胞及内质网脂质过载,导致ERS,加重系膜细胞异常增殖和系膜基质沉积,但其中的具体机制还有待进一步研究。

U-18666A能与NPC1的固醇敏感区相结合,可作为NPC1通路的抑制剂,使LDL衍生的胆固醇向内质网和质膜的转运减少,并抑制胆固醇的酯化<sup>[11-13]</sup>,被广泛用于模拟尼曼匹克病(Niemann-Pick disease, NPC病)<sup>[27]</sup>。本研究结果表明,在高脂炎症基础上予以U-18666A干预后,显著减少了内质网胆固醇蓄积、降低了ERS标记分子GRP78 mRNA及系膜基质成分FN、Col IV mRNA的表达量,抑制了细胞的过度增殖。以上结果提示,干预NPC1功能,可减轻内质网脂质沉积以及脂质过载引起的内质网应激和细胞损伤。

综上所述,炎症可促进高脂负荷下肾脏系膜细胞内NPC1 mRNA和蛋白的表达水平,加重细胞内总胆固醇及内质网胆固醇沉积,并通过诱发内质网应激,引起系膜细胞过度增殖、系膜基质成分表达量增加;应用U-18666A干预NPC1功能后,减轻了胆固醇向内质网的转运,缓解内质网应激及细胞损伤。这一发现可能为炎症及脂代谢紊乱造成肾脏细胞的损伤、肾脏纤维化以及慢性肾脏疾病的发生发展提供新的研究方向和治疗靶点。

## 参考文献 (References)

- 1 Ruan XZ, Varghese Z, Moorhead JF. An update on the lipid nephrotoxicity hypothesis. *Nat Rev Nephrol* 2009; 5(12): 713-21.

- 2 Ruan XZ. Inflammation modifies lipid-mediated renal injury. *Nephrol Dial Transpl* 2003; 18(1): 27-32.
- 3 Pfisterer SG, Per Nen J, Ikonen E. LDL-cholesterol transport to the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Lipidol* 2016; 27(3): 282-7.
- 4 Ikonen E, HölttäVuori M. Cellular pathology of Niemann-Pick type C disease. *Semin Cell Dev Biol* 2004; 15(4): 445-54.
- 5 熊晓, 肖蕾, 杨雪钧, 闫俊丽, 阳海平, 李秋. 炎症状态下高脂通过NPC1介导内质网应激致足细胞损伤机制研究. *中国细胞生物学学报*(Xiong Xiao, Xiao Lei, Yang Xuejun, Yan Junli, Yang Haiping, Li Qiu. High-lipid induced endoplasmic reticulum stress and inflammatory factor caused the podocyte injure through NPC1 and its mechanism. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2016; 38(1): 32-9.
- 6 Kolset SO, Reinholt FP, Jenssen T. Diabetic nephropathy and extracellular matrix. *J Histochem Cytochem* 2012; 60(12): 976-86.
- 7 Zhong S, Zhao L, Li Q, Yang P, Varghese Z, Moorhead JF, et al. Inflammatory stress exacerbated mesangial foam cell formation and renal injury via disrupting cellular cholesterol homeostasis. *Inflammation* 2015; 38(3): 959-71.
- 8 Varghese Z, Fernando R, Moorhead JF, Powis SH, Ruan XZ. Effects of sirolimus on mesangial cell cholesterol homeostasis: a novel mechanism for its action against lipid-mediated injury in renal allografts. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289(1): 43-8.
- 9 Fernando RL, Varghese Z, Moorhead JF. Oxidation of low-density lipoproteins by rat mesangial cells and the interaction of oxidized low-density lipoproteins with rat mesangial cells in vitro. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8(6): 512-8.
- 10 Chen Y, Ruan XZ, Li Q, Huang A, Moorhead JF, Powis SH, et al. Inflammatory cytokines disrupt LDL-receptor feedback regulation and cause statin resistance: a comparative study in human hepatic cells and mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293(3): 680-7.
- 11 Lange Y, Steck TL. Four cholesterol-sensing proteins. *Curr Opin Struct Biol* 1998; 8(4): 435-9.
- 12 Lange Y, Ye J, Rigney M, Steck T. Cholesterol movement in Niemann-Pick type C cells and in cells treated with amphiphiles. *J Biol Chem* 2000; 275(23): 17468-75.
- 13 Liscum L, Faust JR. The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is inhibited in Chinese hamster ovary cells cultured with 3- $\beta$  [2-(diethylamino)methoxy] androst-5-en-17-one. *Biol Chem* 1989; 264(20): 11796-809.
- 14 Moorhead JF, Chan MK, El-Nahas M, Varghese Z. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease. *Lancet* 1982; 2(8311): 1309-11.
- 15 Liu S, Vaziri ND. Role of PCSK9 and IDOL in the pathogenesis of acquired LDL receptor deficiency and hypercholesterolemia in nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transpl* 2014; 29(3): 538-43.
- 16 Clement LC, Macé C, Avila-Casado C, Joles JA, Kersten S, Chugh SS. Circulating angiopoietin-like 4 links protei-nuria with hypertriglyceridemia in nephrotic syndrome. *Nat med* 2014; 20(1): 37-46.
- 17 Anderson PW, McGill JB, Tuttle KR. Protein kinase C beta inhibition the promise for treatment of diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16(5): 397-402.
- 18 Ahmad H, Tejani A. Predictive value of repeat renal biopsies in children with nephrotic syndrome. *Nephron* 2000; 84: 342-6.
- 19 Feng B, Zhang D, Kuriakose G, Devlin CM, Kockx M, Tabas I. Niemann-Pick C heterozygosity confers resistance to lesional necrosis and macrophage apoptosis in murine atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10423-8.
- 20 Millard EE, Srivastava K, Traub LM, Schaffer JE, Ory DS. Niemann-pick type C1 (NPC1) overexpression alters cellular cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 2000; 275: 38445-51.
- 21 Jelinek D, Castillo JJ, Richardson LM, et al. The Niemann-Pick C1 gene is downregulated in livers of C57BL/6J mice by dietary fatty acids, but not dietary cholesterol, through feedback inhibition of the SREBP pathway. *J Nutr* 2012; 142(11): 1935-42.
- 22 Schönthal AH. Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica (Cairo)* 2012; 2012: 1-26.
- 23 Inagi R1, Ishimoto Y2, Nangaku M. Proteostasis in endoplasmic reticulum-new mechanisms in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2014; 10(7): 369-78.
- 24 Saveljeva S, Mc Laughlin SL, Vandenabeele P, Samali A, Bertrand MJ. Endoplasmic reticulum stress induces ligand-independent TNFR1-mediated necroptosis in L929 cells. *Cell Death Dis* 2015; 8(5): 1587-91.
- 25 Zhang L, Pang S, Deng B, Qian L, Chen J, Zou J, et al. High glucose induces renal mesangial cell proliferation and fibronectin expression through JNK/NF- $\kappa$ B/NADPH oxidase /ROS pathway, which is inhibited by resveratrol. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44(4): 629-36.
- 26 Li YB, Yin JJ, Wang HJ, Wang J, Tian H, Yang M. Effect of simvastatin on expression of transforming growth factor-beta and collagen type IV in rat mesangial cells. *Pharmacology* 2011; 88(3/4): 188-92.
- 27 Roff CF1, Goldin E, Comly ME, Cooney A, Brown A, Vanier MT, et al. Type C Niemann-Pick disease: use of hydrophobic amines to study defective cholesterol transport. *Dev Neurosci* 1991; 13(4/5): 315-9.