

## 炎症状态下高脂介导的内质网应激在系膜细胞损伤中的作用及机制

崔晶晶<sup>1</sup>, 施 静<sup>1</sup>, 李 秋<sup>1\*</sup>, 阳海平<sup>1</sup>, 刘 玮<sup>2</sup>

1. 重庆医科大学附属儿童医院肾脏免疫科, 重庆 400014
2. 重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所, 重庆 400014

**[摘要]** **目的** 观察炎症状态下高脂介导的内质网应激在人肾脏系膜细胞(HMCs)损伤中的作用,并探讨高脂在肾脏损伤中的作用机制。**方法** 体外培养 HMCs,分为对照组、高脂组、炎症组、高脂+炎症组、高脂+炎症+4-苯基丁酸(4-PBA)干预组(4-PBA 干预组),分别培养 24、48 和 72 h。用油红 O 染色观察 HMCs 胞内脂质沉积水平;四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖变化;实时荧光定量 PCR 检测 *GRP78*、纤连蛋白(*FN*) mRNA 水平;免疫细胞化学半定量分析糖调节蛋白 78(*GRP78*)蛋白水平。**结果** (1)与对照组比较,高脂组、炎症组、高脂+炎症组 HMCs 胞内脂质沉积增多( $P$ 均 $<0.01$ ),细胞增殖增快,且呈时间依赖性( $P$ 均 $<0.01$ ),同时 *FN* mRNA 表达升高( $P$ 均 $<0.01$ );与高脂+炎症组比较,4-PBA 干预组胞内脂质沉积减少( $P$ 均 $<0.01$ ),细胞增殖减慢( $P$ 均 $<0.01$ ),且 *FN* mRNA 表达降低( $P<0.05, P<0.01$ )。(2)与对照组比较,高脂组、炎症组、高脂+炎症组 *GRP78* mRNA 和蛋白表达升高( $P<0.05, P<0.01$ );而 4-PBA 干预组 *GRP78* mRNA 和蛋白表达较高脂+炎症组降低( $P$ 均 $<0.01$ )。(3)在 24、48 及 72 h,细胞脂质沉积水平与其增殖、*GRP78* 蛋白及 *FN* mRNA 水平均呈正相关( $P$ 均 $<0.01$ ),*GRP78* 蛋白表达水平与细胞增殖和 *FN* mRNA 水平呈正相关( $P$ 均 $<0.05$ )。**结论** 炎症状态下,高脂可通过启动 HMCs 内质网应激致细胞损伤。

**[关键词]** 内质网应激;肾小球系膜细胞;高脂;炎症

**[中图分类号]** R 692.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2013)04-0375-07

### High lipid-mediated endoplasmic reticulum stress in human glomerular mesangial cell injury under inflammation condition: the role and mechanisms

CUI Jing-jing<sup>1</sup>, SHI Jing<sup>1</sup>, LI Qiu<sup>1\*</sup>, YANG Hai-ping<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>2</sup>

1. Department of Nephroimmunology, Children's Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China
2. Pediatric Research Institute, Children's Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

**[Abstract]** **Objective** To study the role of high lipid-mediated endoplasmic reticulum stress in human glomerular mesangial cells (HMCs) injury under inflammation condition, and to explore the mechanism of lipid-induced kidney injury. **Methods** HMCs were divided into control group, high lipid group, inflammatory stress group, high lipid plus inflammatory stress group, and high lipid plus inflammatory stress plus 4-phenylbutyric acid (4-PBA) group. After culture for 24 h, 48 h, and 72 h, Oil red O staining was used to evaluate lipid droplet accumulation in the cells; cell proliferation was assessed by MTT assay; expression of *GRP78* protein was measured by immunocytochemistry method; and the levels of *GRP78* and *FN* mRNA were examined by real-time PCR. **Results** (1) Compared with control group, the high lipid group, inflammatory stress group and high lipid plus inflammatory stress group had significantly increased intracellular cholesterol levels (all  $P < 0.01$ ), significantly higher *FN* mRNA levels (all  $P < 0.01$ ), and significantly faster cell proliferation (all  $P < 0.01$ ), which was in a time-dependent manner. Compared with high lipid plus inflammatory stress group, 4-PBA group had significantly reduced lipid deposition (all  $P < 0.01$ ), slower cell proliferation (all  $P < 0.01$ ) and lower *FN* mRNA expression ( $P < 0.05, P < 0.01$ ) induced by high lipid. (2) Compared with control group, high lipid group, inflammatory group and high lipid plus inflammatory stress group had significantly increased expression of *GRP78* mRNA and protein ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), and the expression in 4-PBA treatment group was significantly lower than that in the high lipid plus inflammatory stress group (all  $P < 0.01$ ). (3)

**[收稿日期]** 2012-12-13

**[接受日期]** 2013-03-20

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81270802),重庆市自然科学基金(CSTC,2009BA5080). Supported by National Natural Science Foundation of China (81270802) and Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC,2009BA5080).

**[作者简介]** 崔晶晶,硕士生. E-mail: cuijingjing87@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 023-63603929, E-mail: liqiu809@hotmail.com

After treatment with high lipid or inflammation for 24 h, 48 h and 72 h, the intracellular cholesterol level was positively correlated with mesangial cell proliferation and expression of GRP78 protein and *FN* mRNA (all  $P < 0.01$ ). The cellular expression of GRP78 protein was positively correlated with mesangial cell proliferation and *FN* mRNA expression (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** High lipid can induce glomerular mesangial cell injury through activating endoplasmic reticulum stress in HMCs under inflammation stress condition.

[Key words] endoplasmic reticulum stress; mesangial cells; high lipid; inflammation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(4): 375-381]

自 Moorhead 等<sup>[1]</sup>于 1982 年提出“脂质肾毒性学说”以来,越来越多的研究表明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,可致慢性肾损伤或肾小球硬化<sup>[2-4]</sup>,但其机制尚未完全阐明。

近年来大量研究揭示内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)参与多种肾脏疾病包括膜性肾病、膜增生性肾小球肾炎、糖尿病肾病等的发生发展<sup>[5-7]</sup>。有报道高糖<sup>[8]</sup>、高半胱氨酸<sup>[9]</sup>刺激诱导人肾小球系膜细胞(human glomerular mesangial cells, HMCs)发生 ERS、促进系膜细胞增殖、系膜外基质产生增多,但高脂能否通过诱导系膜细胞发生 ERS 致肾损伤尚无报道。本研究通过体外实验,观察炎症状态下高脂对 HMCs 的影响,探讨高脂-ERS-肾损伤之间的可能发病机制,为进一步临床治疗提供新的理论与实验依据。

## 1 材料和方法

1.1 细胞株与试剂 HMCs 由英国伦敦皇家自由医学院阮雄中教授惠赠。RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司,ERS 阻断剂 4-苯基丁酸(4-PBA)、油红 O 均购自 Sigma 公司,重组人 IL-1 $\beta$  购自 SAB 公司,四甲基偶氮唑盐(MTT)购自 Solarbio 公司,兔抗人糖调节蛋白 78(GRP78)单克隆抗体购自 Epitomics 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 低密度脂蛋白(LDL)的分离纯化<sup>[10]</sup> 采用低温超速离心法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 LDL 浓度。

1.3 细胞培养与分组 HMCs 复苏后,培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中。将处于对数生长期的细胞平均接种于各孔板,培养 24 h 后,按下列分组进行处理。(1)对照组:给予正常培养液(RPMI 1640 + 10% FBS);(2)高脂组:给予含 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LDL 的培养液<sup>[11]</sup>;(3)炎症组:给予含 20

ng/mL IL-1 $\beta$  的培养液;(4)高脂+炎症组:在高脂组基础上加 20 ng/mL IL-1 $\beta$ <sup>[11]</sup>;(5)4-PBA 干预组:在高脂+炎症组基础上加 5 mmol/L 4-PBA。各组均置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 24、48、72 h 后进行各项实验分析。

1.4 油红 O 染色观察细胞脂质积聚 HMCs 爬片,干预后弃培养液,PBS 洗涤 3 次,4%多聚甲醛固定 30 min,ddH<sub>2</sub>O 冲洗 2 次,1,2-丙二醇孵育 2 min 后吸尽,室温下油红 O 工作液染色 30 min,ddH<sub>2</sub>O 冲洗 3 次。苏木精复染 30~60 s,自来水漂洗 5 min,中性树胶封片,显微镜下观察并照相。每张爬片随机选取 5 个区域,采用 Image-pro plus 软件分析,细胞内脂滴含量以细胞平均累积光密度(integrated optical density, IOD)值表示。实验重复 3 次,每组 3 复孔。

1.5 MTT 法检测细胞增殖 将对数生长期的 HMCs 按  $7 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板,给予实验干预,终止前 4 h 加 20  $\mu\text{L}$ /孔 MTT 溶液(5 mg/mL),继续孵育 4 h,弃上清,加 150  $\mu\text{L}$  DMSO,室温振荡至结晶溶解,于 490 nm 波长处用酶标仪测定各孔光密度(D)值。实验重复 3 次,每组 6 复孔。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测 GRP78、纤连蛋白(FN) mRNA 表达水平 将处于对数生长期的 HMCs 以  $5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板,干预后收集细胞,按说明书提取细胞总 RNA,各组取等量 RNA 为模板,反转录合成 cDNA。取 1  $\mu\text{L}$  cDNA 进行实时定量 PCR,以  $\beta$ actin 为内参照。扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$  10 s,61.4 $^{\circ}\text{C}$  30 s,72 $^{\circ}\text{C}$  30 s,共 40 个循环。采用 Bio-Rad 公司 Gene Expression Analysis for iCycler iQ<sup>®</sup> Real-Time PCR Detection System (v1.10)软件计算各样本目的基因相对表达量。实验重复 3 次,每组 3 复孔。PCR 引物序列见表 1。

1.7 免疫细胞化学检测 GRP78 蛋白表达 HMCs 爬片,干预后弃培养液,PBS 洗涤 3 次,4%多聚甲醛室温固定 30 min。1% Triton X-100 室温处理 10 min,PBS 洗涤 3 次,滴加一抗,浓度为 1:200,4 $^{\circ}\text{C}$

过夜。PBS 洗涤 3 次,加二抗 37℃ 孵育 30 min。DAB 显色,苏木素复染 30~60 s,自来水漂洗 5 min,中性树胶封片,显微镜下观察并照相,采用 Im-

age-pro plus 图像分析软件半定量分析 GRP78 蛋白表达量。实验重复 3 次,每组 3 复孔。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列  
Tab 1 Primer sequences for real-time PCR

Gene	Upper stream primer(5'→3')	Down stream primer(5'→3')
GRP78	TCA ACC AAC TGT TAC AAT CAA GGT C	TCA CTC GAA GAA TAC CAT TCA CAT C
FN	TGG AGG AAG CCG AGG TTT	CAG CGG TTT GCG ATG GTA
<i>βactin</i>	CAT GGG TCA GAA GGA TTC CTA TGT	ATT TTC TCC ATG TCG TCC CAG TTG

1.8 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析,对有相关趋势的变量采用 Pearson 相关分析。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 油红 O 染色观察 HMCs 胞内脂质积聚 油红 O 染色(图 1)及半定量分析(表 2)结果显示:对照组

HMCs 中见少许脂质沉积。与对照组比较,在 24、48 及 72 h 时间点,高脂组、炎症组、高脂+炎症组胞内脂质沉积量增加( $P$  均 $<0.01$ );而高脂+炎症组胞内脂质沉积量较高脂组、炎症组明显增多( $P$  均 $<0.01$ ),提示炎症可加重高脂处理细胞的胞内脂质沉积。4-PBA 干预组胞内脂质沉积在 24、48 及 72 h 时间点均减少,与高脂+炎症组比较差异均有统计学意义( $P$  均 $<0.01$ )。

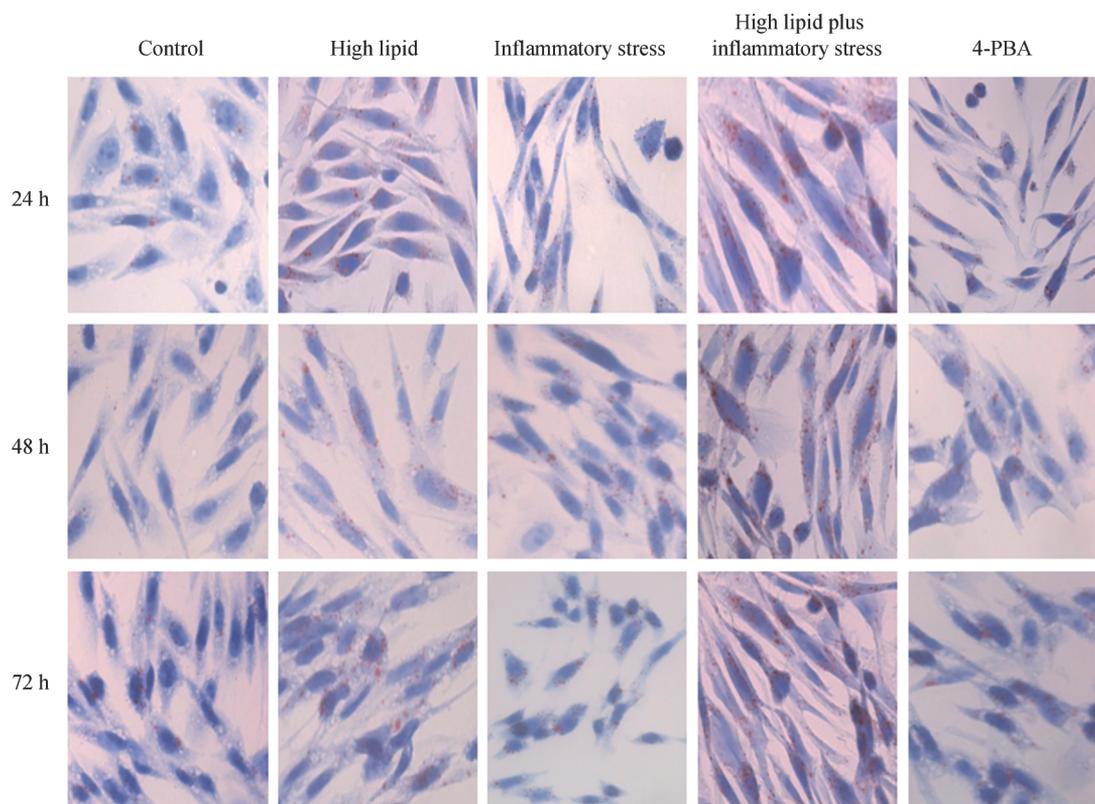


图 1 各组 HMCs 油红 O 染色结果

Fig 1 Oil red O staining of lipid accumulation in HMCs of different groups

4-PBA: 4-phenylbutyric acid; HMCs: Human glomerular mesangial cells. Original magnification:  $\times 400$

2.2 MTT 法检测细胞增殖结果 结果(表 3)显示:与对照组相比,高脂组、炎症组和高脂+炎症组

在 24、48 及 72 h 时间点细胞增殖均增快,且呈时间依赖性( $P$  均 $<0.01$ )。与高脂组、炎症组相比,高

脂+炎症组在 24 h 时间点细胞增殖水平无明显差异,而在 48 h、72 h 时间点明显增高( $P$  均 $<0.01$ )。

4-PBA 干预组与高脂+炎症组比较,细胞增殖水平在 3 个时间点均明显降低( $P$  均 $<0.01$ )。

表 2 各组 HMCs 油红 O 染色半定量分析结果

Tab 2 Oil red O staining for semi-quantitative analysis of lipid accumulation in HMCs of different groups

$n=5, \bar{x} \pm s$

Time point	Control	High lipid	Inflammatory stress	High lipid plus inflammatory stress	4-PBA
24 h	0.32±0.06	0.44±0.04** $\Delta\Delta$	0.53±0.07** $\Delta\Delta$	0.75±0.06**	0.42±0.06 $\Delta\Delta$
48 h	0.43±0.04	0.71±0.04** $\Delta\Delta$	0.69±0.08** $\Delta\Delta$	0.97±0.16**	0.59±0.08 $\Delta\Delta$
72 h	0.49±0.12	0.82±0.11** $\Delta\Delta$	0.78±0.10** $\Delta\Delta$	1.10±0.05**	0.81±0.11 $\Delta\Delta$

4-PBA; 4-phenylbutyric acid; HMCs; Human glomerular mesangial cells. \*\*  $P<0.01$  vs control group;  $\Delta\Delta P<0.01$  vs high lipid plus inflammatory stress group

表 3 各组 HMCs 增殖结果

Tab 3 Proliferation ability of HMCs in different groups

$n=6, \bar{x} \pm s$

Time point	Control	High lipid	Inflammatory stress	High lipid plus inflammatory stress	4-PBA
24 h	0.66±0.03	0.75±0.03**	0.72±0.04**	0.76±0.04**	0.64±0.05 $\Delta\Delta$
48 h	1.17±0.03	1.34±0.04** $\Delta\Delta$	1.31±0.05** $\Delta\Delta$	1.53±0.05**	0.92±0.05 $\Delta\Delta$
72 h	1.27±0.03	1.58±0.03** $\Delta\Delta$	1.42±0.06** $\Delta\Delta$	1.95±0.05**	1.23±0.03 $\Delta\Delta$

4-PBA; 4-phenylbutyric acid; HMCs; Human glomerular mesangial cells. \*\*  $P<0.01$  vs control group;  $\Delta\Delta P<0.01$  vs high lipid plus inflammatory stress group

2.3 各组 HMCs GRP78 的 mRNA 和蛋白表达 实时荧光定量 PCR 结果(表 4)显示:对照组 GRP78 mRNA 表达始终处于较低水平;高脂组 GRP78 mRNA 表达在早期(24 h)即较对照组显著升高,而后逐渐下降,但仍高于对照组( $P<0.01, P<0.05$ );炎症组各时间点 GRP78 mRNA 表达均较对照组升高( $P$  均 $<0.01$ );而高脂+炎症组中, 48、72 h 时间点 GRP78 mRNA 表达水平明显高于

高脂组及炎症组( $P<0.01, P<0.05$ );4-PBA 干预组在各时间点 GRP78 mRNA 表达均较高脂+炎症组明显降低( $P$  均 $<0.01$ )。免疫细胞化学结果(图 2、表 5)显示:高脂组、炎症组及高脂+炎症组 GRP78 蛋白表达均高于对照组( $P$  均 $<0.01$ ),高脂+炎症组 GRP78 蛋白表达较高脂组、炎症组升高( $P<0.01, P<0.05$ ),而 4-PBA 干预可明显抑制其表达( $P$  均 $<0.01$ )。

表 4 各组 HMCs GRP78 mRNA 的表达

Tab 4 Expression of GRP78 mRNA in different groups

$n=3, \bar{x} \pm s$

Time point	Control	High lipid	Inflammatory stress	High lipid plus inflammatory stress	4-PBA
24 h	0.40±0.01	0.88±0.15**	0.87±0.09**	0.78±0.06**	0.43±0.04 $\Delta\Delta$
48 h	0.42±0.08	0.82±0.01** $\Delta\Delta$	1.00±0.11** $\Delta$	1.28±0.08**	0.85±0.06 $\Delta\Delta$
72 h	0.46±0.05	0.67±0.08** $\Delta\Delta$	1.07±0.22** $\Delta$	1.27±0.17**	0.55±0.13 $\Delta\Delta$

4-PBA; 4-phenylbutyric acid; HMCs; Human glomerular mesangial cells. \*  $P<0.05, ** P<0.01$  vs control group;  $\Delta P<0.05, \Delta\Delta P<0.01$  vs high lipid plus inflammatory stress group

2.4 各组 HMCs FN mRNA 的表达 实时荧光定量 PCR 结果(表 6)显示:与对照组比较,在 24 h 和 48 h 时间点,高脂组 FN mRNA 表达明显升高( $P$

均 $<0.01$ ),而在 72 h 时间点,两组表达水平差异无统计学意义;高脂+炎症组 FN mRNA 表达水平在各时间点较对照组均升高,分别为 2 倍、1.51 倍、

1.45倍( $P < 0.01$ ), 其中, 72 h 时 FN mRNA 的表达水平较高脂组和炎症组明显升高( $P < 0.05$ )。与高

脂+炎症组比较, 4-PBA 干预组 FN mRNA 表达在各时间点均降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

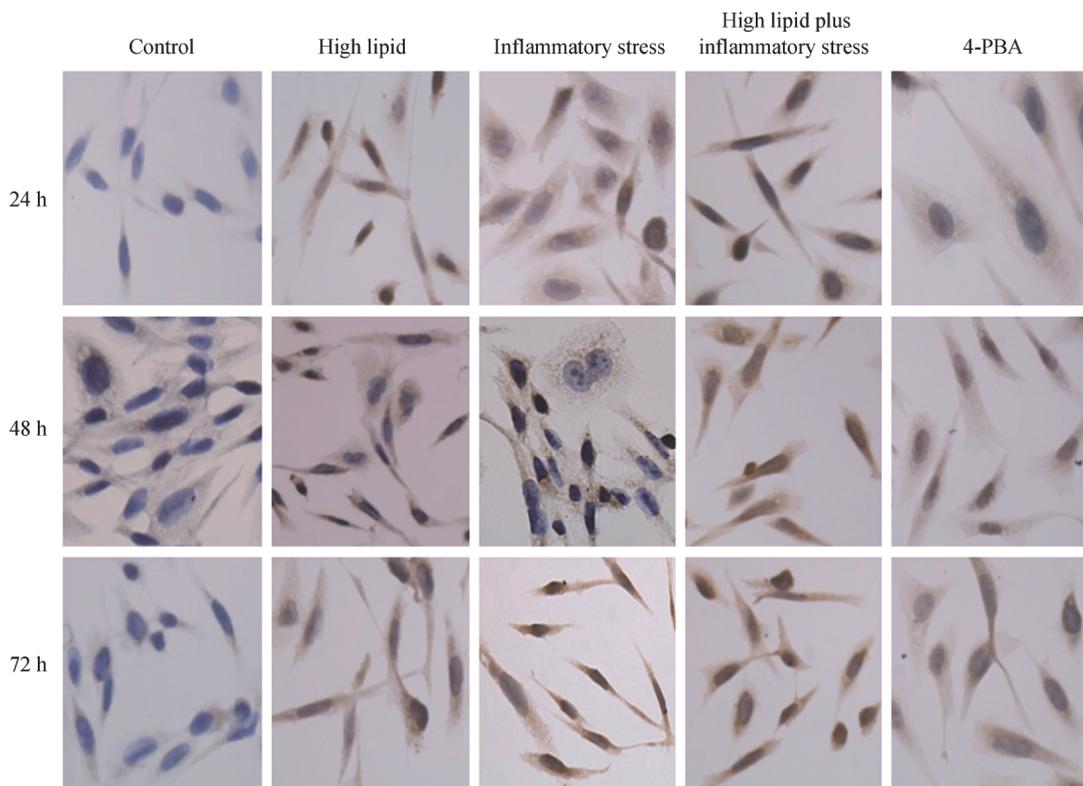


图 2 免疫细胞化学法检测各组 HMCs GRP78 蛋白的表达

Fig 2 Immunocytochemistry results of GRP78 protein expression in HMCs of different groups

4-PBA: 4-phenylbutyric acid; HMCs: Human glomerular mesangial cells. Original magnification:  $\times 400$

表 5 各组 HMCs GRP78 蛋白表达的半定量分析结果

Tab 5 Immunocytochemistry method for semi-quantitative analysis of GRP78 protein expression in HMCs of different groups

$n=5, \bar{x} \pm s$

Time point	Control	High lipid	Inflammatory stress	High lipid plus inflammatory stress	4-PBA
24 h	0.52±0.03	1.04±0.07** $\Delta\Delta$	0.96±0.07** $\Delta$	1.23±0.09**	0.82±0.06 $\Delta\Delta$
48 h	0.55±0.06	1.42±0.31** $\Delta\Delta$	1.11±0.05** $\Delta\Delta$	1.61±0.05**	1.04±0.09 $\Delta\Delta$
72 h	0.66±0.07	1.15±0.06** $\Delta\Delta$	1.22±0.07** $\Delta$	1.74±0.07**	1.11±0.10 $\Delta\Delta$

4-PBA: 4-phenylbutyric acid; HMCs: Human glomerular mesangial cells. \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$  vs high lipid plus inflammatory stress group

表 6 各组 HMCs FN mRNA 的表达

Tab 6 Expression of FN mRNA in HMCs of different groups

$n=3, \bar{x} \pm s$

Time point	Control	High lipid	Inflammatory stress	High lipid plus inflammatory stress	4-PBA
24 h	0.41±0.05	0.69±0.15**	0.72±0.12**	0.82±0.12**	0.54±0.05 $\Delta\Delta$
48 h	0.67±0.11	1.00±0.11**	0.81±0.04** $\Delta$	1.01±0.20**	0.80±0.13 $\Delta$
72 h	0.77±0.06	0.84±0.09 $\Delta$	0.93±0.09** $\Delta$	1.12±0.05**	0.62±0.10 $\Delta\Delta$

4-PBA: 4-phenylbutyric acid; HMCs: Human glomerular mesangial cells. \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$  vs high lipid plus inflammatory stress group

2.5 脂质沉积、GRP78 水平与细胞增殖及 FN 水平的相关性分析 线性回归分析结果显示:在 24、48 及 72 h 时间点, HMCs 胞内脂质沉积与细胞增殖 ( $r$  值分别为 0.759、0.661、0.761,  $P$  均  $< 0.01$ )、GRP78 蛋白表达水平 ( $r$  值分别为 0.808、0.814、0.947,  $P$  均  $< 0.01$ ) 和 FN mRNA 水平呈正相关 ( $r$  值分别为 0.811、0.646、0.506,  $P$  均  $< 0.01$ )。GRP78 蛋白表达水平与细胞增殖 ( $r$  值分别为 0.709、0.559、0.759,  $P$  均  $< 0.05$ ) 和 FN mRNA 水平 ( $r$  值分别为 0.749、0.74、0.537,  $P$  均  $< 0.05$ ) 呈正相关。

### 3 讨论

多种肾脏疾病均伴随或并发脂质代谢紊乱,且常伴有不同程度的炎症反应。肾小球硬化是各种肾脏疾病的终末病理阶段,多种因素导致的肾小球硬化和肾间质纤维化是慢性肾功能衰竭的共同通路。研究证实胆固醇,尤其 LDL 是慢性肾脏疾病发生肾小球硬化的独立危险因素<sup>[2]</sup>,而炎症可通过影响肾脏细胞的胆固醇稳态平衡来加速脂质介导肾脏损伤<sup>[12]</sup>。

本研究通过建立高脂、高脂+炎症状态细胞模型,发现炎症可明显加重 HMCs 胞内脂质异常沉积。本课题组前期研究也证实了高脂可诱导多柔比星肾病鼠足细胞发生足突融合及泡沫样变,致肾小球硬化发生<sup>[3]</sup>;同时还证实炎症通过干预 SCAP-SREBP2-LDLr/HMG-CoA 还原酶途径加重胞内脂质沉积,进而加重脂质对足细胞、系膜细胞损伤,诱导泡沫细胞形成<sup>[4]</sup>,这些研究表明炎症是加重脂质介导肾脏损伤并向肾小球硬化发展的主要原因。

有关脂质介导肾脏损伤甚至诱发肾小球硬化的机制较多,如“LDL 的氧化修饰学说”<sup>[13]</sup>、清道夫受体代谢途径等<sup>[14-15]</sup>,但均不能完全阐明脂质引发肾小球硬化的作用机制。越来越多的证据提示高脂、ERS 与疾病之间存在一定联系。Tabas<sup>[16]</sup>报道巨噬细胞内脂质向内质网异常转运或沉积启动 ERS 是动脉粥样硬化的重要机制。体外实验用 ERS 阻断剂 4-PBA 可有效减轻脂毒性效应、缓解动脉粥样硬化的发生<sup>[17]</sup>。提示脂质在内质网异常沉积启动 ERS 是动脉粥样硬化的重要机制,但 ERS 在脂质肾毒性中的作用尚不明确。

GRP78 是 ERS 的主要分子伴侣,在调控 ERS 信号通路活化过程中发挥重要作用,被认为是 ERS

的一种重要标记蛋白。本研究发现高脂状态下,炎症可加重 HMCs 胞内脂质异常沉积,进而上调 GRP78 表达,且脂质沉积量与 ERS 状态呈正相关,提示脂质在胞内异常沉积、进而激活 ERS/GRP78 信号通路可能是“脂质毒性”的关键环节。有报道在蛋白过载的足细胞及动物模型中,通过主动预处理上调 GRP78 或转染 GRP78 载体使 GRP78 过表达,可有效缓解肾脏局部 ERS、减轻肾脏损害<sup>[18]</sup>,提示适度的 ERS 能够使未折叠蛋白质恢复正确构象并能够进一步加工,是一种细胞自我保护的机制,但严重或持续的 ERS 则可能损伤内质网功能,导致细胞损伤。本研究也意外发现随着 LDL 刺激时间延长,GRP78 mRNA 表达水平降低,可能由于 LDL 刺激 HMCs 后,细胞通过自身反馈调节系统的严密控制来维持脂质稳态平衡,进而诱发轻度 ERS,启动了相关保护机制,具体机制尚待进一步研究。

FN 是 HMCs 分泌的细胞外基质的重要组成部分<sup>[19]</sup>。在肾小球病变发生发展过程中, FN 含量增多是促进肾脏纤维化或硬化的一个重要因素。本研究观察到单独高脂或炎症刺激均可使细胞增殖明显增快, FN mRNA 表达上调,而二者联合刺激时细胞增殖、FN mRNA 表达均较单独炎症刺激明显增加,且脂质沉积水平与 GRP78、细胞增殖及 FN mRNA 水平呈正相关性, GRP78 水平与细胞增殖、FN mRNA 水平呈正相关,提示 HMCs 胞内脂质代谢紊乱可能通过激活 ERS/GRP78 信号通路,进而加重系膜细胞增殖及基质合成等,从而致肾脏损伤。

4-PBA 是一种重要的化学分子伴侣,既可改善内质网的折叠能力,也可稳定蛋白的构象以利于其转运或降解,从而减轻 ERS。有报道 4-PBA 通过抑制 nephrin 突变相关蛋白错误折叠缓解 ERS,从而减轻肾脏损伤<sup>[20]</sup>。我们也进一步通过 4-PBA 干预实验发现 4-PBA 不仅明显减轻高脂诱导的 GRP78 高表达,还逆转 HMCs 的过度增殖、抑制 FN mRNA 的表达,提示 ERS/GRP78 信号通路在高脂介导的系膜细胞损伤中起关键作用,4-PBA 可通过缓解或阻断 ERS 对系膜细胞发挥保护作用,进一步证实了高脂诱导 ERS 可能与启动系膜细胞增殖及基质合成的分子信号相关联。该发现可能为临床干预脂质代谢紊乱介导的肾损伤提供了新的治疗靶点和思路,然而目前对于 4-PBA 在脂质代谢中作用及其具体分子机制尚不明确。

综上所述,炎症可促进 HMCs 胞内脂质沉积,

进而诱导系膜细胞发生 ERS, 通过 ERS/GRP78 信号通路加重细胞损伤; 如过度增殖及 FN 合成增多等; 应用 4-PBA 阻断 ERS 可在一定程度上缓解细胞损伤、减轻肾脏损害。这些研究提示炎症状态下, 高脂-ERS-肾损伤之间可能有一定的相关性, 为阐述炎症加重高脂介导的肾脏损害甚至进展至肾小球硬化提供了实验依据, 也为延缓脂质肾损害提供了新的治疗靶点。

(志谢 感谢本课题组的万俊丽、邱桂霞和王志铁给予的帮助和支持!)

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] Moorhead J F, Chan M K, El-Nahas M, Varghese Z. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease[J]. *Lancet*, 1982, 2: 1309-1311.

[2] Ruan X Z, Varghese Z, Moorhead J F. An update on the lipid nephrotoxicity hypothesis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2009, 5: 713-721.

[3] Zhang W, Li Q, Wang L, Yang X. Simvastatin ameliorates glomerulosclerosis in Adriamycin-induced-nephropathy rats[J]. *Pediatr Nephrol*, 2008, 23: 2185-2194.

[4] Zhang G, Li Q, Wang L, Chen Y, Zhang W, Yang H. The effects of inflammation on lipid accumulation in the kidneys of children with primary nephrotic syndrome[J]. *Inflammation*, 2011, 34: 645-652.

[5] Inagi R. Endoplasmic reticulum stress as a progression factor for kidney injury[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, 10: 156-165.

[6] Inagi R, Kumagai T, Nishi H, Kawakami T, Miyata T, Fujita T, et al. Preconditioning with endoplasmic reticulum stress ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19: 915-922.

[7] Tao J L, Wen Y B, Shi B Y, Zhang H, Ruan X Z, Li H, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in podocyte apoptosis induced by saturated fatty acid palmitate[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125: 3137-3142.

[8] 郭艳红, 周坤, 齐伟, 曾薇, 罗志峰, 牟娇, 等. 内质网应激在高糖诱导人肾脏系膜细胞表型转化中的作用[J]. *中华肾脏病杂志*, 2011, 27: 106-111.

[9] Ingram A J, Krepinsky J C, James L, Austin R C, Tang D, Salapatek A M, et al. Activation of mesangial cell MAPK in response to homocysteine[J]. *Kidney Int*, 2004, 66: 733-745.

[10] Fernando R L, Varghese Z, Moorhead J F. Oxidation of low-density lipoproteins by rat mesangial cells and the interaction of oxidized low-density lipoproteins with rat mesangial cells *in vitro* [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1993, 8: 512-518.

[11] Chen Y, Ruan X Z, Li Q, Huang A, Moorhead J F, Powis S H, et al. Inflammatory cytokines disrupt LDL-receptor feedback regulation and cause statin resistance; a comparative study in human hepatic cells and mesangial cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293: F680-F687.

[12] Ruan X Z, Varghese Z, Moorhead J F. Inflammation modifies lipid-mediated renal injury[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18: 27-32.

[13] Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 20963-20966.

[14] Wang W, He B, Shi W, Liang X, Ma J, Shan Z, et al. Deletion of scavenger receptor A protects mice from progressive nephropathy independent of lipid control during diet-induced hyperlipidemia [J]. *Kidney Int*, 2012, 81: 1002-1014.

[15] Kennedy D J, Chen Y, Huang W, Viterna J, Liu J, Westfall K, et al. CD36 and Na/K-ATPase- $\alpha$ 1 form a proinflammatory signaling loop in kidney[J]. *Hypertension*, 2013, 61: 216-224.

[16] Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications[J]. *J Clin Invest*, 2002, 110: 905-911.

[17] Erbay E, Babaev V R, Mayers J R, Makowski L, Charles K N, Snitow M E, et al. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis[J]. *Nat Med*, 2009, 15: 1383-1391.

[18] Inagi R, Nangaku M, Onogi H, Ueyama H, Kitao Y, Nakazato K, et al. Involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in podocyte injury induced by excessive protein accumulation[J]. *Kidney Int*, 2005, 68: 2639-2650.

[19] Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D. Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects[J]. *Virchows Arch*, 1996, 429: 311-322.

[20] Liu X L, Don S C, Yan K, Kilpeläinen P, Pikkarainen T, Tryggvason K. Defective trafficking of nephrin missense mutants rescued by a chemical chaperone[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15: 1731-1738.