

网络出版时间:2022-05-28 14:42 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220526.1015.001.html

◇基础医学研究◇

棕榈酸钠暴露不同时间对肾小管上皮细胞损伤及对 NLRP3 炎症小体激活的影响

张洁,张艳华,朱云峰,李艳,李维祖,李卫平

摘要 目的 探究棕榈酸钠(PA)暴露不同时间对肾小管上皮细胞(HK-2)的损伤作用和机制。方法 CCK-8 法检测 PA 作用不同时间 HK-2 细胞活力;油红染色法检测 PA 作用不同时间脂质沉积情况;Annexin-V-FITC/PI 凋亡试剂盒检测 PA 作用不同时间 HK-2 细胞凋亡情况;活性氧试剂盒检测 PA 作用不同时间活性氧(ROS)生成情况;ELISA 检测细胞中谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)活性以及上清液中白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-18 的水平;Western blot 测定 HK-2 细胞中核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、半胱天冬酶 1(Caspase-1)、NADPH 氧化酶 4(NOX4)蛋白表达情况。

结果 CCK-8 法结果显示,PA(6、9、12、24 h)组 HK-2 细胞活力下降;油红染色结果显示,PA(6、9、12、24 h)组脂质沉积增加;Annexin-V-FITC/PI 凋亡试剂盒结果显示,细胞凋亡率增加;活性氧试剂盒结果显示,PA(6、9、12、24 h)组 ROS 的生成显著增加;ELISA 结果显示,PA(6、9、12、24 h)组细胞中 GSH 和 SOD 的活性降低,细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-18 的水平增加;Western blot 结果显示,PA(6、9、12、24 h)组炎症相关蛋白 NLRP3、Caspase-1、ASC 及 NOX4 表达水平升高。

结论 PA 诱导能导致 HK-2 细胞脂质沉积和损伤,其机制可能与棕榈酸钠刺激后细胞内 NLRP3 炎症小体激活介导的炎症反应有关。

关键词 棕榈酸钠;人肾小管上皮细胞;NLRP3 炎症小体;活性氧;NADPH 氧化酶 4

中图分类号 R 587.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0841-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.001

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的主要并发症,是终末期肾脏疾病的最常见原因^[1]。先前的研究^[2]表明 DN 的病变主要是肾小球

硬化,但近年来越来越多的研究表明肾小管上皮细胞(human renal tubular epithelial cells, HK-2)的损伤也是糖尿病肾病的重要特征。前期研究^[3]显示,棕榈酸钠(sodium palmitate, PA)诱导能明显导致肾小球系膜细胞脂质沉积和氧化应激损伤。NADPH 氧化酶(NADPH oxidases, NOX)是细胞中负责产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)的重要酶系统,课题组前期研究^[4]表明 NOX4 在肾小球系膜细胞表达较高,并且参与了系膜细胞的纤维化。炎症小体在炎症反应中具有核心作用,核苷酸结合寡聚化结构域蛋白样受体蛋白家族[nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein (NOD)-like receptor protein, NLRP]是第 1 个被发现形成炎症小体的传感器蛋白家族。有报道^[5]称, NLRP3 炎症小体可能是慢性肾脏疾病的重要发病机制。然而,目前尚不清楚 PA 暴露是否可以通过激活 NOX4 增加 ROS 生成,进而激活 NLRP3 炎症小体导致 HK-2 炎症损伤。该实验主要研究 PA 诱导不同时间对 HK-2 损伤及对 NLRP3 炎症小体和 NOX4 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 HK-2 细胞由安徽医科大学药学院药理学孟晓明教授馈赠。

1.1.2 试剂 棕榈酸钠购自美国 Sigma 公司;牛血清白蛋白购自上海翊圣有限公司;油红染料购自合肥 BoMEI 生物技术有限公司;苏木精染色液购自沈阳万类生物有限公司;DMEM/F12 购自美国 Hyclone™公司;胎牛血清购自杭州四季青生物技术有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒、青-链霉素溶液、胰蛋白酶和 RIPA 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司;H2DCFDA 和 CCK-8 购自美国 Sigma 公司;NLRP3 抗体(ab214185)和 ASC 抗体(ab155970)购自英国 Abcam 有限公司;Caspase-1 抗体(WL02996)和 GAPDH 抗体(F01302243)购自沈阳万类生物有限公司;NOX4 抗体(DF6924)购自

2022-03-12 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81970630)

作者单位:安徽医科大学基础医学院药理学教研室,合肥 230032

作者简介:张洁,女,硕士研究生;

李卫平,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail:lwpl9@126.com;

李维祖,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail:liweizu@126.com

美国 Affinity 生物有限公司;PVDF 膜(R7SA908213) 购自美国 Millipore 公司。

1.2 主要试剂的配制 PA 的配置:取 PA 粉末 30 mg,向其中加入 4 ml 蒸馏水,在 70 °C 水浴条件下使其完全溶解,得到浓度为 27 mmol/L PA 母液,过滤除菌后备用。取 BSA 粉末 3 g,加入 10 ml 蒸馏水,55 °C 水浴加热溶解,过滤除菌后得到 BSA 溶液。将 PA 母液与 BSA 溶液按照等体积混合,用 DMEM/F12 稀释至 200 μ mol/L 后使用。

1.3 细胞培养与分组 HK-2 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM/F12 培养基于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,实验分为 5 组:BSA 组,PA (200 μ mol/L) 6、9、12、24 h 组。

1.4 CCK-8 法检测细胞活力 按照 1.3 分组方式,取对数生长期的 HK-2 细胞,将细胞以 4×10^4 个/ml 浓度接种于 96 孔板中,每组设 4 个复孔,待细胞贴壁后,各组给予 PA 刺激 6、9、12、24 h 后,每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,放置培养箱避光孵育 4 h,用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度。实验重复 3 次。

1.5 油红 - 苏木精染色检测细胞内脂质沉积情况

按照 1.3 分组方式,将对数生长期的细胞均匀接种于 24 孔培养板中,油红苏木精染色后显微镜观察脂质沉积情况,阳性区域被染成红褐色,用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量阳性区域的平均吸光度,评价脂质沉积情况。实验重复 3 次。

1.6 Annexin-V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡 按照 1.3 分组方式,HK-2 细胞均匀接种于 6 孔培养板中,收集各孔中培养基和消化的细胞于离心管中,离心后弃去上清液,得到细胞沉淀,加入 200 μ l 的 1 $\times$ Binding Buffer 悬浮细胞,随即加入 5 μ l 的 Annexin V-FITC 混匀后室温避光反应 15 min,再加入 10 μ l 的 PI 混匀后室温避光反应 15 min,用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。实验重复 3 次。

1.7 采用 H2DCFDA 荧光探针检测细胞内 ROS 情况 按照 1.3 分组方式,将对数生长期的细胞均匀接种于 24 孔培养板中,培养结束后,PBS 洗 3 次,H2DCFDA 储存液与 DMEM/F12 按 1 : 1 000 配制,每孔加入 H2DCFDA 工作液 500 μ l,孵育 30 min。弃去染料,用 PBS 洗 3 次,在显微镜下观察并拍照。用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量绿色荧光的平均吸光度,评价 ROS 的生成情况。实验重复 3 次。

1.8 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测细胞上清液中 IL-1 β 、IL-18 和细胞中 GSH、SOD 的表达 按照

1.3 分组方式,将对数生长期的细胞均匀接种于 6 孔板中,细胞培养结束后,收集细胞上清液用 ELISA 法检测 IL-1 β 、IL-18、GSH 和 SOD 水平,按照 ELISA 试剂盒说明书操作。

1.9 Western blot 检测细胞内蛋白表达情况 按照 1.3 分组方式,将对数生长期的细胞均匀接种于 6 孔培养板中,向细胞中加入适量的 RIPA 裂解液,使其充分裂解后,收集上清液,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白变性后进行电泳转膜封闭等步骤,将目的蛋白与相应的一抗 NLRP3、Caspase-1、ASC、NOX4、GAPDH 在 4 °C 条件下孵育过夜,TBST 洗涤后,加二抗室温孵育 1 h,显影后用 Image J 软件对图片进行灰度值分析。实验重复 3 次。

1.10 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析,所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组资料之间的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PA 暴露不同时间对 HK-2 细胞活力的影响

CCK-8 法检测结果显示,PA (200 μ mol/L) 分别干预 (6、9、12、24 h) 后,实验组与 BSA 组相比,PA 可时间依赖性的降低 HK-2 细胞的细胞活力 ($F = 59.61$, $P < 0.01$),见图 1。实验结果表明,随着暴露时间的延长,PA 对 HK-2 细胞的损伤作用增加。

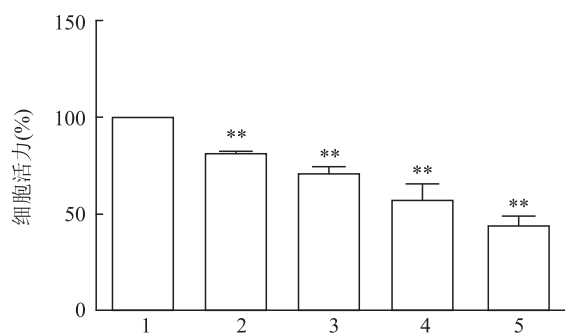


图 1 PA 暴露不同时间对 HK-2 细胞活力的影响

1:BSA 组;2:PA 6 h 组;3:PA 9 h 组;4:PA 12 h 组;5:PA 24 h 组;与 BSA 组比较; ** $P < 0.01$

2.2 PA 暴露不同时间对 HK-2 细胞内脂质沉积的影响 油红染色结果显示,BSA 组细胞内未见脂质沉积,而随着 PA 暴露时间的增加,HK-2 细胞内的脂质沉积程度增加 ($F = 155.183$, $P < 0.01$),尤其在 PA 暴露 12、24 h 时最为明显,见图 2。研究结果表明,PA 暴露可通过脂毒性引起 HK-2 细胞损伤。

2.3 PA 暴露不同时间对 HK-2 细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC/PI 染色结果显示,与 BSA 组相比,随着 PA 暴露时间的延长,细胞凋亡率显著升高($F = 17.675, P < 0.05$),特别是在 24 h。见图 3。实验结果表明,PA 暴露能导致 HK-2 细胞的凋亡。

2.4 PA 暴露不同时间对 HK-2 细胞中 SOD 和 GSH 活性及 ROS 生成的影响 ELISA 实验结果显示,PA 分别刺激 6、9、12、24 h 后,随着暴露时间的增加,细胞内 GSH 和 SOD 的活性均降低($F_{\text{GSH}} = 67.183, P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; $F_{\text{SOD}} = 155.532, P < 0.01$)。见图 4。实验表明 PA 暴露能降低 HK-2 细胞抗氧化能力。同时该实验观察了 PA 暴露不同时间对 HK-2 细胞中 ROS 生成的影响。结果显示,

BSA 组 HK-2 细胞中只有较低水平的 ROS 生成,而与 BSA 组比较,PA 暴露时间越长,HK-2 细胞中 ROS 积累越明显($F = 103.124, P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见图 5。结果表明,PA 暴露可导致 HK-2 细胞 ROS 生成增多和抗氧化能力下降。

2.5 PA 暴露不同时间对上清液中 IL-1 β 和 IL-18 水平的影响 ELISA 实验结果显示,与 BSA 组比较,PA 暴露时间越长,分泌到细胞上清液的 IL-1 β 和 IL-18 水平增加($F_{\text{IL-1}\beta} = 5.961, P < 0.01$; $F_{\text{IL-18}} = 3.784, P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),24 h 浓度最高,表明 PA 暴露可导致 HK-2 细胞出现炎症反应水平增加。见图 6。

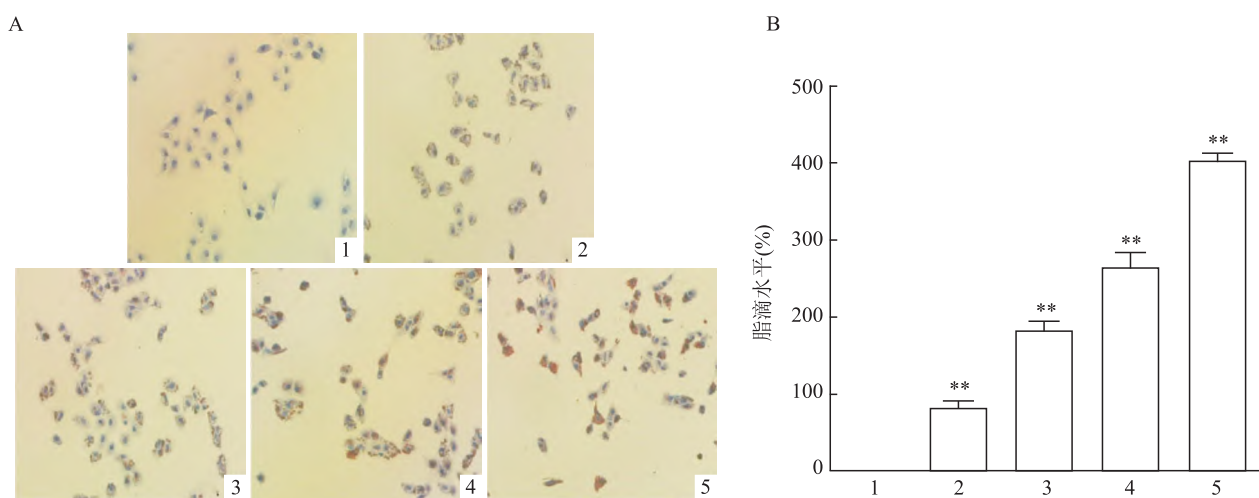


图2 PA 暴露不同时间对 HK-2 细胞脂质进入细胞程度的影响 $\times 200$

A: PA 刺激不同时间脂质沉积情况; B: 脂质沉积半定量分析; 1: BSA 组; 2: PA 6 h 组; 3: PA 9 h 组; 4: PA 12 h 组; 5: PA 24 h 组; 与 BSA 组比较: ** $P < 0.01$

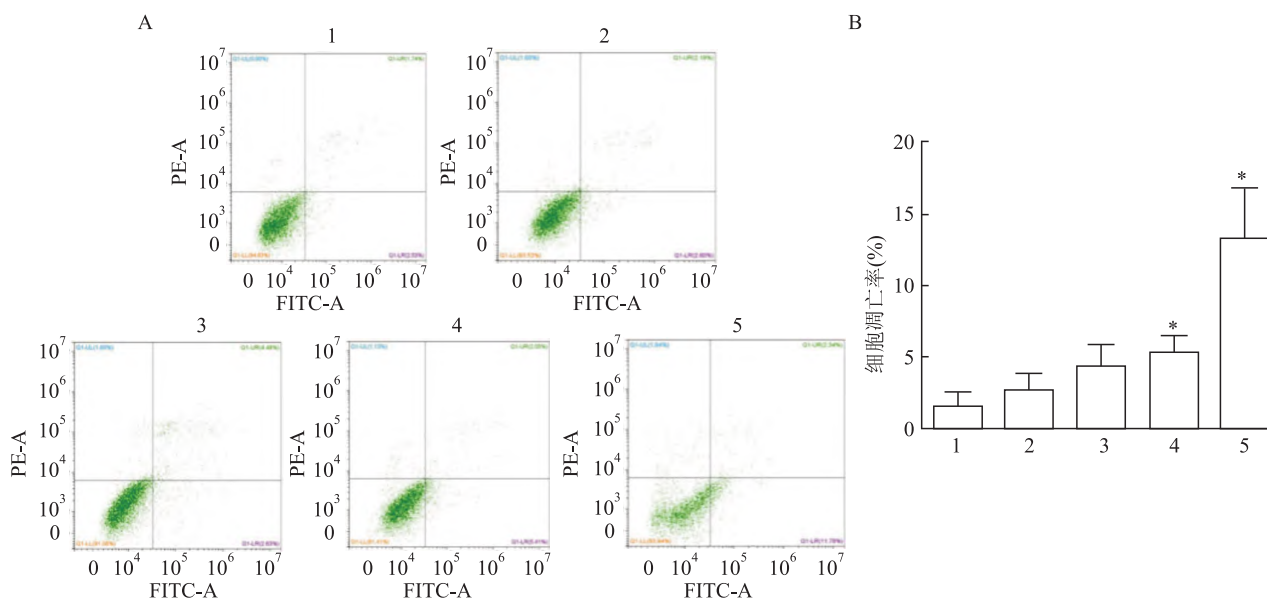


图3 PA 暴露不同时间对 HK-2 细胞凋亡的影响

A: PA 暴露不同的时间 HK-2 细胞凋亡流式图; B: PA 暴露不同的时间 HK-2 细胞凋亡定量分析图; 1: BSA 组; 2: PA 6 h 组; 3: PA 9 h 组; 4: PA 12 h 组; 5: PA 24 h 组; 与 BSA 组比较: * $P < 0.05$

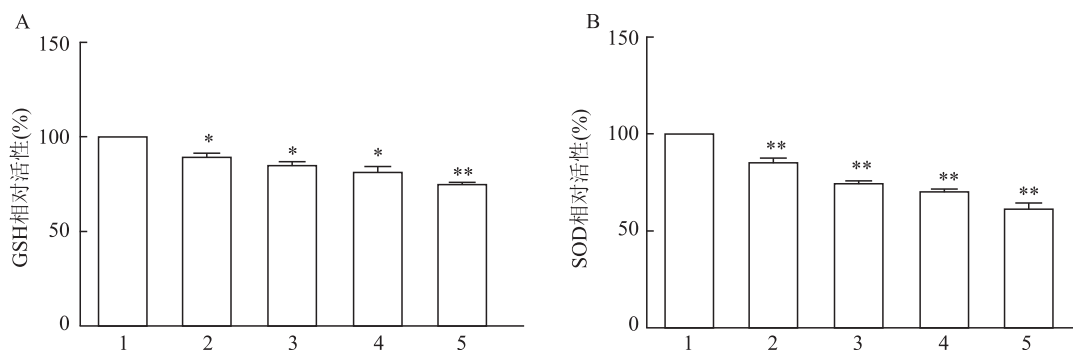


图4 PA暴露不同时间对HK-2细胞GSH、SOD水平的影响

A: PA暴露对GSH水平的影响; B: PA暴露对SOD水平的影响; 1: BSA组; 2: PA 6 h组; 3: PA 9 h组; 4: PA 12 h组; 5: PA 24 h组; 与BSA组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

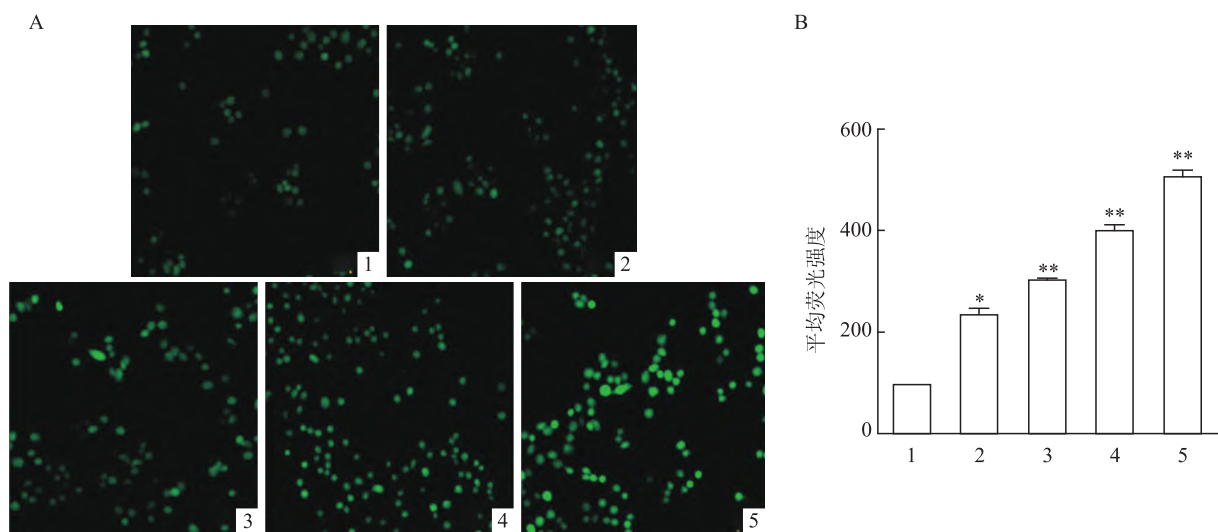


图5 PA暴露不同时间对HK-2细胞内ROS水平的影响 ×200

A: PA暴露不同时间HK-2细胞ROS的生成情况; B: ROS生成半定量分析; 1: BSA组; 2: PA 6 h组; 3: PA 9 h组; 4: PA 12 h组; 5: PA 24 h组; 与BSA组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

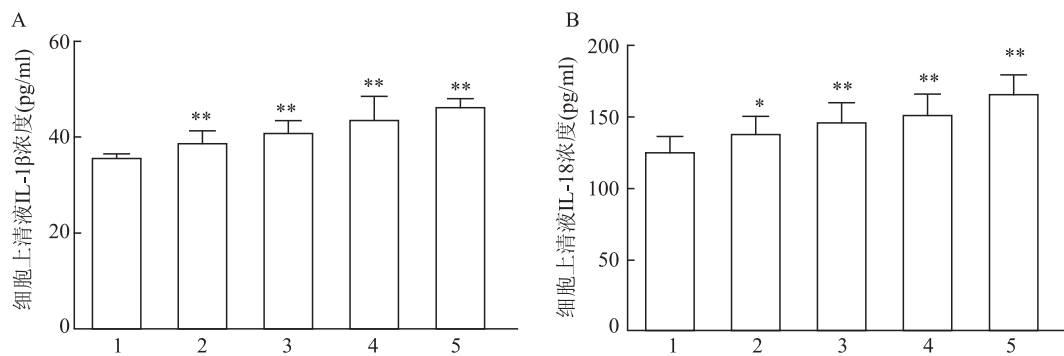


图6 PA暴露不同时间对HK-2细胞上清液中IL-1β和IL-18水平的影响

A: PA暴露后HK-2细胞上清液中IL-1β水平; B: PA暴露后HK-2细胞上清液中IL-18水平; 1: BSA组; 2: PA 6 h组; 3: PA 9 h组; 4: PA 12 h组; 5: PA 24 h组; 与BSA组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.6 PA暴露不同时间对HK-2细胞NLRP3、Caspase-1、ASC和NOX4表达的影响 Western blot实验结果显示, BSA组HK-2细胞中NLRP3、Caspase-1、ASC和NOX4的表达水平较低, 与BSA组比较, PA暴露时间越长, HK-2细胞中NLRP3、

Caspase-1、ASC和NOX4蛋白的表达显著增加 ($F_{\text{NLRP3}} = 68.241$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; $F_{\text{Caspase-1}} = 108.423$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; $F_{\text{ASC}} = 161.253$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; $F_{\text{NOX4}} = 84.253$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图7。实验表明NOX4-NLRP3炎症小体

参与了 PA 暴露导致的 HK-2 细胞的损伤。

3 讨论

DN 是糖尿病最严重、最常见的并发症之一,最终会导致慢性肾功能衰竭,这也是糖尿病患者死亡的重要原因之一。越来越多的证据表明,除了肾小球的损伤外,HK-2 细胞的损伤在 DN 中具有重要作用。越来越多的研究^[6]表明,2 型糖尿病(T2DM)患者血浆中含有游离脂肪酸(FFAs)的水平高于健康人群,而过高的 FFAs 可导致机体胰岛素抵抗,并引起胰岛素分泌异常,这可能是 T2DM 发病的主要诱因。PA 是 FFAs 中含量最丰富的饱和脂肪酸,约占 FFAs 总量的 25%。该课题组前期研究^[7]表明,HK-2 细胞在 PA 的刺激下,引起细胞凋亡并且加重了肾损伤。该研究结果显示,细胞活力随 PA 作用时间延长显著降低,细胞凋亡率和脂质沉积随 PA 作用时间延长显著增加,表明 PA 暴露可时间依赖性的导致 HK-2 细胞损伤,可能是 DN 发生发展的重要诱因。

目前,PA 暴露导致的 HK-2 细胞损伤的机制尚不完全清楚。细胞内 ROS 升高在 DN 的发病机制中起着重要作用。有研究^[8]显示,多酚酸酯可通过调节 DN 中 NOX4 的活性来预防高糖诱导的足细胞损伤。前期研究^[9]显示,PA 暴露可明显增加肾小球系膜细胞 NOX4 介导的 ROS 生成增加,导致肾小球系膜细胞纤维化。在该研究中,随着 PA 暴露时间

的延长,HK-2 细胞中 ROS 水平和 NOX4 的表达明显同步增加,说明 NOX4 介导的 ROS 积累与 PA 导致的 HK-2 细胞损伤密切相关。SOD 和 GSH 是细胞内重要的抗氧化分子,维持机体中氧化与抗氧化系统之间的平衡。在该实验中,随着 PA 暴露时间的延长,HK-2 细胞中 SOD 和 GSH 出现下降,表明 PA 可以导致 HK-2 细胞抗氧化作用减弱。这些结果表明,PA 暴露可导致 HK-2 细胞氧化还原状态失衡,可通过增强氧化应激引起 HK-2 的损伤和凋亡。

慢性炎症在 DN 的形成中起着重要作用,氧化应激可以进一步激活炎症小体,促进炎症反应的发生发展,加重 DN 的病理损伤。炎症小体激活是促进炎症反应的中心环节,多种因素可以导致 NLRP3 激活,将 pro-Caspase-1 裂解为 Caspase-1,从而促进 IL-1 β 和 IL-18 前体的成熟和释放^[10]。有研究^[11]表明,在 HG 诱导的 HK-2 细胞中 NLRP3 的表达增加,IL-18、Caspase-1 和 IL-1 β 的表达也增加。研究^[12]表明,机体中过多 ROS 可以激活 NLRP3 炎症小体,引起肾损伤,二氢槲皮素显著抑制细胞增殖和 ROS 的过量产生,并减轻 NLRP3 的激活和肾纤维化。该研究结果显示,在 PA 诱导的 HK-2 细胞中,NLRP3、ASC、Caspase-1 以及 IL-1 β 和 IL-18 促炎因子的表达均显著升高,随着 PA 暴露时间的延长,这些炎症相关蛋白的表达进一步升高。这些结果表明,PA 诱导可以激活 HK-2 细胞中的 NLRP3 炎症小体,从而导致 HK-2 细胞的炎症损伤。

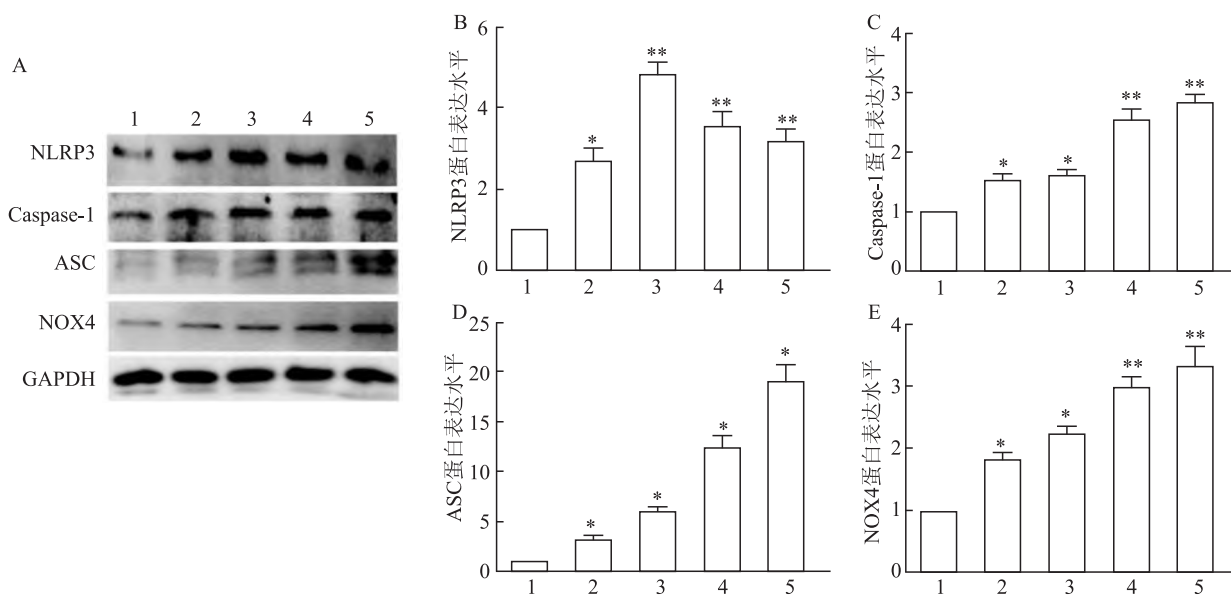


图7 PA 暴露对 HK-2 细胞 NLRP3、Caspase-1、ASC 和 NOX4 表达的影响

A: Western blot 检测相关蛋白的表达情况;B~E: NLRP3、Caspase-1、ASC 和 NOX4 的半定量分析;1: BSA 组;2: PA 6 h 组;3: PA 9 h 组;4: PA 12 h 组;5: PA 24 h 组;与 BSA 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

综上所述,PA 可以诱导 HK-2 细胞的损伤,其机制可能与激活 NOX4-NLRP3 炎症小体,导致 HK-2 细胞氧化应激和炎症有关。该实验表明高血脂可能在糖尿病肾病的发病中具有重要作用,这对找到有效的预防或保护方法来延缓 DN 的进展具有重要意义。

参考文献

- [1] 范高霞,甘 甜,周晓燕,等. Rac1 抑制剂对高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞损伤的影响及其作用机制[J]. 安徽医科大学学报, 2019,54(4):605-10.
- [2] 张海桥,段 鹏. 糖尿病肾病肾小管损伤的研究进展[J]. 中国医学创新, 2021,18(12):182-5.
- [3] Kim D, Kim H J, Cha S H, et al. Protective effects of broussonetia kazinoki siebold fruit extract against palmitate-induced lipotoxicity in mesangial cells[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019,2019:1-12.
- [4] Gorin Y, Block K. NOX4 and diabetic nephropathy: with a friend like this, who needs enemies[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 61:130-42.
- [5] 毛海霞,欧三桃. NLRP3 炎症小体与糖尿病肾病的研究进展[J]. 西南军医, 2021,23(1):30-4.
- [6] Salgin B, Ong K K, Thankamony A, et al. Higher fasting plasma free fatty acid levels are associated with lower insulin secretion in children and adults and a higher incidence of type 2 diabetes[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012,97(9):3302-9.
- [7] Chen Q, Su Y, Ju Y, et al. Astragalosides IV protected the renal tubular epithelial cells from free fatty acids-induced injury by reducing oxidative stress and apoptosis[J]. Biomed Pharmacother, 2018,108:679-86.
- [8] Liang Y, Liu H, Fang Y, et al. Salvianolate ameliorates oxidative stress and podocyte injury through modulation of NOX4 activity in db/db mice[J]. J Cell Mol Med, 2021,25(2):1012-23.
- [9] Su Y, Chen Q, Ma K, et al. Astragaloside IV inhibits palmitate-mediated oxidative stress and fibrosis in human glomerular mesangial cells via downregulation of CD36 expression[J]. Pharmacol Rep, 2019,71(2):319-29.
- [10] Zhen Y, Zhang H. NLRP3 inflammasome and inflammatory bowel disease[J]. Front Immunol, 2019,10:276.
- [11] Xie C, Wu W, Tang A, et al. lncRNA GASS/miR-452-5p reduces oxidative stress and pyroptosis of high-glucose-stimulated renal tubular cells[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2019,12:2609-17.
- [12] Ding T, Wang S, Zhang X, et al. Kidney protection effects of dihydroquercetin on diabetic nephropathy through suppressing ROS and NLRP3 inflammasome[J]. Phytomedicine, 2018,41:45-53.

Effects of palmitic acid sodium exposure for different time on renal tubular epithelial cells injury and NLRP3 inflammasome activation

Zhang Jie, Zhang Yanhua, Zhu Yunfeng, Li Yan, Li Weizu, Li Weiping

(Dept of Pharmacology, Basic Medicine College, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the effect and mechanism of palmitic acid sodium (PA) exposure for different time on HK-2 cells injury. **Methods** CCK-8 assay was used to detect the activity of HK-2 cells treated with PA at different times; oil red staining was used to detect lipid deposition at different time of PA treatment; Annexin-V-FITC/PI apoptosis kit was used to detect the apoptosis of HK-2 cells treated with PA at different times; reactive oxygen species (ROS) production was detected by ROS kit at different time of PA treatment; ELISA was used to detect GSH and SOD in cells as well as the levels of IL-1 β and IL-18 in the cell supernatant; Western blot was used to determine the expressions of NLRP3, ASC, Caspase-1 and NOX4 in HK-2 cells. **Results** CCK-8 assay showed that HK-2 cell viability decreased in PA(6, 9, 12, 24 h) groups; oil red staining showed that lipid deposition increased in PA(6, 9, 12, 24 h) groups; Annexin-V-FITC/PI apoptosis kit results showed that the apoptosis rate increased; ROS kit results showed that ROS production significantly increased in PA(6, 9, 12, 24 h) groups; ELISA results showed that the activities of GSH and SOD decreased in PA(6, 9, 12, 24 h) groups, while the levels of IL-1 β and IL-18 in supernatant increased; Western blot results showed that the expression levels of inflammatory related proteins NLRP3, Caspase-1, ASC and NOX4 in PA(6, 9, 12 and 24 h) increased. **Conclusion** PA exposure can induce lipid deposition and HK-2 cells damage, and the mechanism may be related to PA-induced inflammatory response by activating NLRP3 inflammasome in HK-2 cells.

Key words palmitic acid sodium; human renal tubular epithelial cells; NLRP3 inflammasome; reactive oxygen species; NADPH oxidase 4