

载脂蛋白 CⅢ通过氧化应激通路促进人肾小球系膜细胞表型转分化

黄小敏¹⁾, 王富华²⁾, 刘雪静¹⁾, 周子豪¹⁾, 张玲¹⁾, 刘国庆¹⁾, 黄薇^{1)*}
(¹⁾北京大学医学部基础医学院心血管研究所, 北京 100191; ²⁾青岛大学附属医院重症医学科, 山东 青岛 266000)

摘要 本研究旨在探讨富含甘油三酯的脂蛋白 (triglyceride-rich lipoproteins, TRLs) 中载脂蛋白 CⅢ (apolipoprotein CⅢ, ApoCⅢ) 的高表达对人肾小球系膜细胞 (human mesangial cells, HMCs) 表型转分化的作用及其机制。从正常野生型小鼠 (WT) 及 ApoCⅢ 转基因小鼠血浆中提取 TRLs, 在体外培养的 HMCs 中分别给予相同甘油三酯浓度的正常 TRLs (TRL-WT), 或富含 ApoCⅢ 的 TRLs (TRL-CⅢ) 孵育 12 h。结果显示, TRL-CⅢ 中 ApoCⅢ 蛋白质表达水平约为 WT 小鼠 TRLs 的 4 倍。与阴性对照 (NC) 组相比, 两种 TRLs 均可诱导 HMCs 中转分化标志物 α -SMA 及纤维化相关因子纤连蛋白、TGF- β 1、CTGF、Col I、Col IV 的 mRNA 及 α -SMA 和纤连蛋白的蛋白质表达水平升高, 且 TRL-CⅢ 较 TRL-WT 作用更明显。TRL-CⅢ 组中, α -SMA 及纤连蛋白蛋白质表达水平分别为 TRL-WT 组的 1.4 倍 ($P<0.05$) 和 2.1 倍 ($P<0.01$)。与 NC 组相比, 两种 TRLs 均可引起细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平增加, 且 TRL-CⅢ 组较 TRL-WT 组高 1.5 倍 ($P<0.05$); 氧化应激相关因子 Nox4、P22phox、PKC- β 的 mRNA 及 Nox4 蛋白表达水平在两组均增高, 且 TRL-CⅢ 较 TRL-WT 作用更为明显 ($P<0.05$)。TRL-CⅢ 组中, Nox4 蛋白表达水平为 TRL-WT 组的 1.6 倍 ($P<0.01$)。NADPH 氧化酶抑制剂 apocynin 可使 TRL-CⅢ 引起的细胞内 ROS 水平下降约 2 倍 ($P<0.01$)。上述转分化标志物及纤维化相关因子基因及蛋白质表达水平均明显下降。本研究表明, TRLs 通过氧化应激通路促进 HMCs 表型转分化, ApoCⅢ 的高表达进一步促进该作用。

关键词 载脂蛋白 CⅢ; 人肾小球系膜细胞; 转分化; 氧化应激

中图分类号 R363

Apolipoprotein CⅢ Promotes Phenotype Transdifferentiation of Human Mesangial Cells Through Oxidative Stress Pathway

HUANG Xiao-Min¹⁾, WANG Fu-Hua²⁾, LIU Xue-Jing¹⁾, ZHOU Zi-Hao¹⁾,
ZHANG Ling¹⁾, LIU Guo-Qing¹⁾, HUANG Wei^{1)*}

(¹⁾ Institute of Cardiovascular Sciences, School of Basic Medical Science, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China;
²⁾ Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong, China)

Abstract This study was to investigate the effects of apolipoprotein CⅢ (ApoCⅢ) which mainly contains in triglyceride-rich lipoproteins (TRLs) on the phenotype transdifferentiation of human mesangial cells (HMCs) and its potential mechanisms *in vitro*. In this study, TRLs were extracted from the plasma of wild type (WT) and ApoCⅢ transgenic mice, respectively. Normal TRLs (TRL-WT) or ApoCⅢ-rich TRLs (TRL-CⅢ) 400 mg/L were added into cultured HMCs and incubated for 12 hours. The results showed that

收稿日期: 2019-03-28; 修回日期: 2019-05-17; 接受日期: 2019-05-28
国家自然科学基金项目 (No. 81770448) 资助
* 通讯作者 Tel: 010-82801589; E-mail: huangwei@bjmu.edu.cn
Received: March 28, 2019; Revised: May 17, 2019; Accepted: May 28, 2019
Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81770448)
* Corresponding author Tel: 010-82801589; E-mail: huangwei@bjmu.edu.cn

there was a 4-fold increase of the ApoCⅢ protein expression level of TRL-CⅢ as compared with that of TRL-WT. The mRNA levels of transdifferentiation marker α -SMA and fibrosis-related factors fibronectin, TGF- β 1, CTGF, ColⅠ, ColⅣ and the protein levels of the α -SMA and fibronectin in HMCs were increased in both TRL-WT and TRL-CⅢ groups when compared with the control; This effects of TRL-CⅢ were more obvious than that of TRL-WT, and the protein expression levels of α -SMA and fibronectin in TRL-CⅢ group were 1.4-fold ($P<0.05$) and 2.1-fold ($P<0.01$) higher than that in TRL-WT group, respectively. Both TRLs caused an increase of reactive oxygen species (ROS) levels in HMCs, and the ROS levels were 1.5-fold higher in TRL-CⅢ group than that in TRL-WT group ($P<0.05$). The mRNA expression levels of oxidative stress-related factors Nox4, P22phox, PKC- β and protein expression level of Nox4 were increased in both groups. TRL-CⅢ had more significant effect than TRL-WT ($P<0.05$), and the protein expression level of Nox4 in TRL-CⅢ group was 1.6-fold higher than in the TRL-WT group. The NADPH oxidase inhibitor apocynin reduced the levels of ROS in TRL-CⅢ group by about 2-fold ($P<0.01$), and the expression levels of the transdifferentiation marker and fibrosis-related factors were significantly decreased. This study demonstrated that TRLs could promote transdifferentiation in HMCs by activating oxidative stress pathway, high expressing of ApoCⅢ could further promote this process.

Key words apolipoprotein CⅢ; human mesangial cells; transdifferentiation; oxidative stress

载脂蛋白CⅢ (apolipoprotein CⅢ, ApoCⅢ) 主要存在于富含甘油三酯的脂蛋白 (triglyceride-rich lipoproteins, TRLs) 中。ApoCⅢ可通过抑制脂蛋白脂酶 (lipoprotein lipase, LPL) 及肝脂酶 (hepatic lipase, HL) 活性, 干扰载脂蛋白B (apolipoprotein B, ApoB) 或载脂蛋白E (apolipoprotein E, ApoE) 与肝受体结合, 抑制极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 清除, 抑制甘油三酯 (triglyceride, TG) 分解, 导致血浆 TG 增高^[1]。既往研究表明, 慢性肾疾病 (chronic kidney disease, CKD) 患者血浆中 ApoCⅢ水平显著增加, 与血肌酐、尿蛋白水平呈正相关, 与肾小球滤过率呈负相关。提示 ApoCⅢ在 CKD 中发挥重要作用^[2, 3]。另有临床研究发现, ApoCⅢ也是早期糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 发病的危险因子^[4]。但 ApoCⅢ在 CKD 中的作用机制仍不明确。肾小球系膜细胞 (mesangial cells, MCs) 转分化在 CKD 及 DN 中均发挥重要的作用^[5], 可分化成纤维细胞表型, 分泌过量的细胞外基质蛋白, 引起肾小球系膜区基质增生, 导致肾损伤^[6]。氧化应激在 MCs 转分化中发挥重要作用^[7]。研究表明, 氧化低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 可引起人肾小球系膜细胞 (human mesangial cells, HMCs) 转分化^[8], 但 TRLs 在 HMCs 转分化中的作用目前仍未见研究。ApoCⅢ主要存在于 TRLs 中, 我们推测 ApoCⅢ对 CKD 的促进作用可能与 TRLs 中的高 ApoCⅢ含量相关。本研究将探讨 TRLs 在 ApoCⅢ高表达时是否有促进肾小球系膜细胞表型转分化的作用, 该研究将进一步提示 ApoCⅢ在促进 CKD 中的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物

ICR 背景野生型 (wild type, WT) 及 ApoCⅢ转基因 3 个月月龄的雄性小鼠用于本实验。所有动物均饲养于北京大学医学部实验动物中心, 遵循 SPF 级动物饲养条件。实验动物饲养遵照《美国国立卫生研究院实验室动物应用指南》进行, 并通过北京大学实验室动物伦理委员会批准。实验动物均自由进食和饮水, 12 h 光照/黑暗交替。

1.2 材料

HMCs 由北京大学医学部生理学系管又飞教授赠送。DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 均购自美国 Gibco 公司; 胰岛素-转铁蛋白-硒 (insulin-transferrin-selenium, ITS) 购自美国 Sigma 公司; 胰蛋白酶购自北方同正公司; 兔多克隆抗 ApoCⅢ抗体、Anti- α -SMA 抗体、抗纤连蛋白抗体、Anti-Nox4 抗体购自美国 Abcam 公司, HRP-山羊抗兔 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司; apocynin 购自美国 Selleck 公司; DCFH-DA 法活性氧检测试剂盒购自上海碧云天公司; RIPA 缓冲液和 BCA 蛋白质定量试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司; Trizol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; TransScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒购自北京全式金生物公司; EvaGreen 2 \times qPCR MasterMix 购自加拿大 ABM 公司; 甘油三酯测定试剂盒购自北京中生北控生物科技公司; 其他生化试剂均为进口分装或国产分析纯。所有引物均由北京奥科生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 TRLs 的提取

给予 WT 小鼠和 ApoCⅢ转基因小鼠 200 μL 橄榄油灌胃。4 h,经眶静脉取血,于 4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min。取血浆后加入等体积无菌 PBS 溶液混匀,于 4 ℃、42 000 r/min 超速离心(德国 Beckman 超速离心机)3 h,分离血浆中 TRLs。取离心管上层乳白色 TRLs,4 ℃保存待用。上述收集血浆及 TRLs 的操作均于生物安全柜中进行。

1.4 TRLs 中甘油三酯含量的检测

取 96 孔酶标板,加入稀释后的 TRLs 样品及标准品各 5 μL,每孔加入 200 μL 工作液,37 ℃孵育 10 min,采用酶标仪(550 型,美国 Bio-Rad 公司)测定 490 nm 波长处吸光度值。将标准液浓度与对应的 A 值进行线性拟合,根据样品 A 值计算出 TRLs 中的 TG 浓度。

1.5 细胞培养

HMCs 复苏后,培养于含 10%胎牛血清(FBS)、1%胰岛素转铁蛋白酶硒(ITS)和 1%青链霉素的 DMEM 培养基中,孵育于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中。每 2~3 d 传代 1 次。实验前,2×10⁵ 个细胞/孔接种于 6 孔板中,细胞饥饿处理 24 h,分别给予 400 mg/L(以相同 TG 浓度量化)的两种 TRLs 孵育,或给予 NADPH 氧化酶抑制剂 apocynin 500 μmol/L(浓度的选择参考文献[9, 10]),与 400 mg/L TRL-CⅢ共孵

育,12 h 后提取 HMCs 的总 RNA 或总蛋白质,并对相关因子的表达量进行检测。

1.6 Western 印迹分析

取量化至相同 TG 浓度的两种 TRLs 各 1 μL,或提取的细胞总蛋白质 30 μg 上样,进行 SDS-PAGE,湿式电转移法转移至 NC 膜,用 5%脱脂牛奶溶液室温孵育封闭 1 h。NC 膜再用 5%脱脂牛奶溶液配制的一抗(ApoCⅢ, α-SMA, Nox4, 纤连蛋白均为 1:1 000)在摇床(140 r/min)上,4 ℃孵育过夜,TBST 溶液清洗 3 次,加二抗溶液孵育 1 h,再次用 TBST 清洗 3 次。加 ECL 显色液显色,利用化学发光分子成像系统(美国 Bio-Rad)采集,获得免疫印迹图像及定量结果。

1.7 RT-PCR 法检测 mRNA 的表达

细胞用 PBS 洗 3 次,在 6 孔板内每孔加入 Trizol 抽提液 1.0 mL,提取总 RNA,检测 RNA 的质量和丰度。使用反转录试剂盒产生第一链 cDNA。使用具有 EVA Green 荧光的 RT-PCR 试剂盒进行实时定量检测(美国 Agilent, AriaMx)。每个样品进行 35 个循环扩增,每个循环包括 94 ℃变性 45 s、54 ℃~60 ℃复性 45 s 及 72 ℃延伸 1 min。所有样品使用相对 C(T)值方法,目的基因 mRNA 表达水平相对内参 GAPDH 的比值为:2^{-ΔC(T)},其中 ΔC(T)=C(T) target-C(T) GAPDH,结果用与 NC 对照组的比值表示,如前所述^[11]。相关引物序列见 Table 1。

Table 1 Sequences of the primers

Gene	Primer sequence
Nox4	Forward: 5'-TGACGTTGCATGTTTCAGGAG-3'
	Reverse: 5'-AGCTGGTTCGGTTAAGACTGAT-3'
P22phox	Forward: 5'-CCCAGTGGTACTTTTGGTGCC-3'
	Reverse: 5'-GCGGTCATGTACTTCTGTCCC-3'
PKC-β	Forward: 5'-AAACCTTGTACCTATGGACCCC-3'
	Reverse: 5'-CCCAATCCCAAATCTCTACTGAC-3'
TGF-β1	Forward: 5'-CTAATGGTGGAACCCACAACG-3'
	Reverse: 5'-TATCGCCAGGAATTGTTGCTG-3'
α-SMA	Forward: 5'-CCACCATGTACCCAGGCATT-3'
	Reverse: 5'-TTGTGTGCTAGAGGCAGAGC-3'
Col I	Forward: 5'-ATCAACCGGAGGAATTTCCGT-3'
	Reverse: 5'-CACCAGGACGACCAGGTTTTTC-3'
Col IV	Forward: 5'-GGACTACCTGGAACAAAAGGG-3'
	Reverse: 5'-GCCAAGTATCTCACCTGGATCA-3'
CTGF	Forward: 5'-AAAAGTGCATCCGTACTCCCA-3'
	Reverse: 5'-CCGTCGGTACATACTCCACAG-3'
Fibronectin	Forward: 5'-CCGCCGAATGTAGGACAAGA-3'
	Reverse: 5'-GACAGAGTTGCCACGGTAA-3'
GAPDH	Forward: 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'
	Reverse: 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'

1.8 活性氧检测

2×10^5 个细胞/孔接种于共聚焦专用玻底皿中,细胞饥饿处理 24 h。分别给予上述剂量两种 TRLs 刺激,或给予 TRL-CⅢ与 500 $\mu\text{mol/L}$ apocynin 共刺激 12 h。无血清 DMEM 溶液清洗 2 次,用含 2 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 的 DMEM 溶液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育细胞 1 h,进行荧光探针装载。再用 DMEM 溶液轻轻洗涤细胞 3 次,于激光共聚焦扫描显微镜下进行荧光强度检测。采用 ImageJ 专业图像分析软件进行半定量分析,如前所述^[12]。

1.9 统计学方法

数据采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行分析统计。实验结果以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示。应用 one-way ANOVA 单因素方差分析, Tukey test 用于组间两两比较。对于非正态分布数据采用 Mann-Whitney U 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ApoCⅢ转基因小鼠的 TRLs 中 ApoCⅢ含量显著增高

为了证实 ApoCⅢ转基因小鼠来源的 TRLs 中 ApoCⅢ蛋白水平明显高于 WT 小鼠 TRLs,蛋白质印迹法对两种来源的 TRLs 中 ApoCⅢ蛋白水平进行了检测。结果显示, ApoCⅢ为 8.8 kD。 ApoCⅢ转基因小鼠来源的 TRLs 中 ApoCⅢ蛋白水平约为 WT 小鼠 TRLs 的 4 倍 ($P < 0.001$, Fig.1)。说明 TRLs-CⅢ组中的 TRLs 富含 ApoCⅢ,可用于研究 ApoCⅢ在 HMCs 细胞转分化中的作用。

2.2 ApoCⅢ促进 HMCs 表型转分化及纤维化

在分别给予 400 mg/L (以相同 TG 浓度量化) 的两种 TRLs 与 HMCs 共孵育 12 h, RT-PCR 结果发现,两种 TRLs 均能引起 HMCs 中转分化标志物 α -平滑肌激动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 及纤维化相关因子转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF)、I 型胶原 (collagen I, Col I)、IV 型胶原 (collagen IV, Col IV) 和纤连蛋白 (fibronectin) 的 mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$), 并且 TRL-CⅢ组较 TRL-WT 组作用更为明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (Fig.2A)。蛋白质印迹结果显示,与 NC 组相比,两种 TRLs 均可引起 α -SMA 及纤连蛋白的蛋白质表达水平增高,且 TRL-CⅢ组较 TRL-WT 组增高得更明显,TRL-CⅢ组中 α -SMA 及纤连蛋白的蛋白质表达

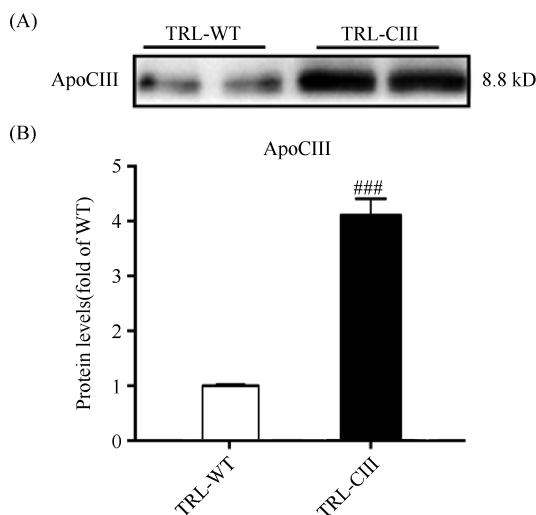


Fig.1 ApoCⅢ protein expression levels in extracted TRLs from the plasma of ApoCⅢ transgenic mice were significantly increased as compared with that of WT

(A) ApoCⅢ protein levels in TRLs from TRL-WT and TRL-CⅢ groups (normalized to the same TG content) were detected by Western blot. (B) The amount of ApoCⅢ protein in each group was normalized to the mean of the TRL-WT group. TRLs, triglyceride-rich lipoproteins; TRL-WT, TRLs of wild type mice; TRL-CⅢ, TRLs of ApoCⅢ transgenic mice. Data is represented as $\text{mean} \pm \text{SEM}$. $n = 6$. ### $P < 0.001$ vs TRL-WT group

水平分别为 TRL-WT 组的 1.4 倍 ($P < 0.05$) 及 2.1 倍 ($P < 0.01$) (Fig.2B, C, D)。说明 TRLs 可诱导 HMCs 转分化及纤维化,富含 ApoCⅢ的 TRLs 可进一步促进这一作用。

2.3 ApoCⅢ促进 HMCs 中氧化应激通路的激活

由于氧化应激通路为促进肾纤维化的一条重要通路,为了探究高表达 ApoCⅢ的 TRLs 促进肾小球系膜细胞表型转分化及纤维化的可能机制,对氧化应激通路相关因子进行检测。首先,DCFH-DA 法检测 HMCs 中 ROS 水平。结果发现,与 NC 组相比,TRL-WT、TRL-CⅢ组绿色荧光均明显增强。提示给予 TRLs 刺激后细胞内 ROS 水平增高。TRL-CⅢ组 ROS 增高更为明显,约为 TRL-WT 组的 1.5 倍 ($P < 0.05$) (Fig.3A, B),说明富含 ApoCⅢ的 TRLs 诱导 ROS 产生的作用更显著。RT-PCR 结果显示,氧化应激相关因子 NADPH 氧化酶 4 (NADPH oxidase 4, Nox4)、NADPH 氧化酶 P22phox 亚基、蛋白激酶 C- β (protein kinase C- β , PKC- β) 的 mRNA 表达水平增高,TRL-CⅢ较 TRL-WT 作用更为明显 ($P < 0.05$) (Fig.3C)。蛋白质印迹结果显示,与 NC 组相比,两种 TRLs 均可引起 Nox4 蛋白表达水平增高,TRL-CⅢ组为 TRL-WT 组的 1.6 倍 ($P < 0.01$) (Fig.3D,

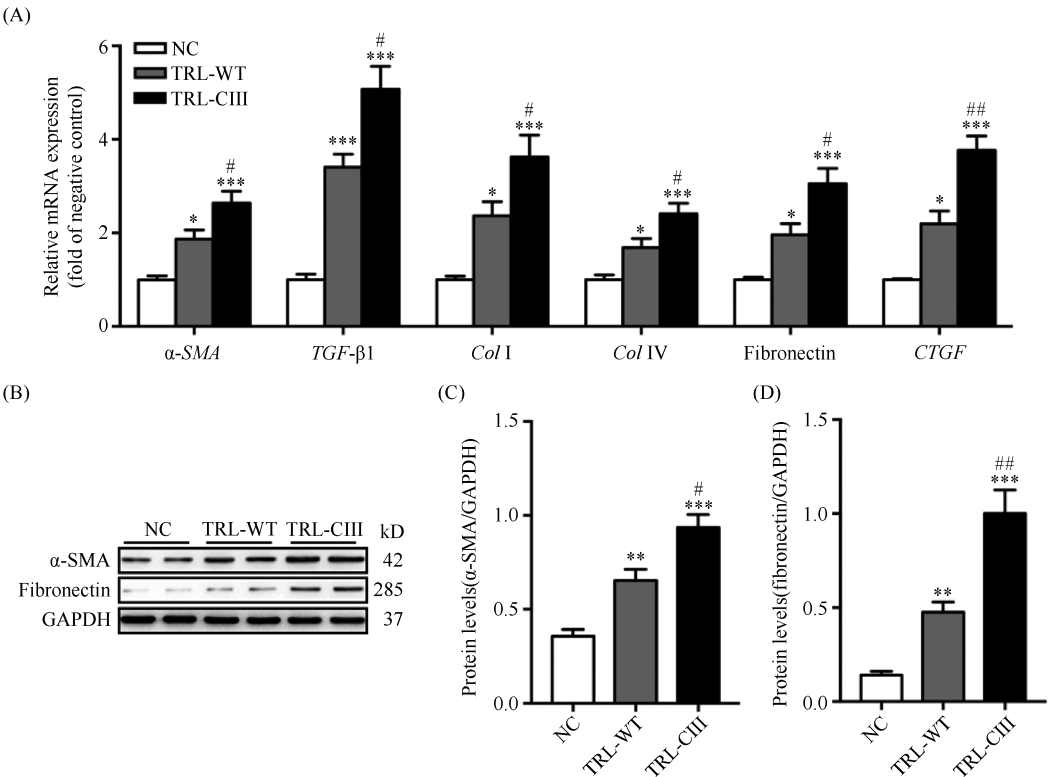


Fig.2 ApoC III promoted phenotypic transdifferentiation and fibrosis in HMCs HMCs were incubated with 400 mg/L TRLs for 12 hours. (A) mRNA expression levels of α -SMA, TGF- β 1, Col I, Col IV, fibronectin and CTGF were analyzed by RT-PCR assay. (B) Protein expression levels of α -SMA and fibronectin were analyzed by Western blot. GAPDH was used as a reference protein. (C) The amount of α -SMA protein was normalized to that of GAPDH. (D) The amount of fibronectin protein was normalized to that of GAPDH. TRLs, triglyceride-rich lipoproteins; NC, negative control; TRL-WT, TRLs of wild type mice; TRL-C III, TRLs of ApoC III transgenic mice; HMCs, human mesangial cells. Data is represented as mean \pm SEM. n = 4-6. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs NC group; # P < 0.05, ## P < 0.01 vs TRL-WT group

E)。说明 TRLs 可激活 HMCs 中的氧化应激通路, 富含 ApoC III 的 TRLs 可进一步促进这一作用。

2.4 Apocynin 可明显抑制 ApoC III 引起的 HMCs 中 ROS 的产生

为了进一步证明 ApoC III 可通过氧化应激通路促进人肾小球系膜细胞表型转分化, 给予 NADPH 氧化酶抑制剂 apocynin 和 TRL-C III 与 HMCs 共孵育 12 h 后检测 ROS 的产生。结果表明, 与单独 TRL-C III 孵育组相比, 共孵育组细胞内 ROS 水平下降约 2 倍 (P < 0.01) (Fig.4A, B)。说明 apocynin 可抑制 ApoC III 引起的 HMCs 中氧化应激通路的激活。

2.5 Apocynin 降低 ApoC III 引起的 HMCs 表型转分化及纤维化

给予氧化抑制剂 apocynin 后, 在 HMCs 中由于 TRL-C III 引起的氧化应激明显被抑制, 同时细胞内转分化标志物 α -SMA 及纤维化相关因子 TGF- β 1、CTGF、Col I、Col IV 和纤连蛋白的 mRNA 表达水平也有不同程度的下降 (Fig.5A), α -SMA 及纤连蛋白

的蛋白质表达水平受到明显的抑制 (α -SMA, P < 0.05; fibronectin, P < 0.001) (Fig.5B, C, D)。以上结果提示, ApoC III 的确可通过氧化应激通路促进人肾小球系膜细胞表型转分化和纤维化。

3 讨论

本研究首次发现, TRLs 通过氧化应激通路促进 HMCs 表型转分化, TRLs 中 ApoC III 的高表达可进一步促进该作用。结果提示, ApoC III 可能通过促进人肾小球系膜细胞转分化加速 CKD 的进展。ApoC III 有可能成为临床预防及治疗 CKD 的新靶点。

在各种致病条件刺激下, 人肾小球系膜细胞可改变表型转分化成肌纤维母细胞 (myofibroblasts, MFb) 参与肾小球各种病理反应, 影响 CKD 进展。利用体外培养人肾小球系膜细胞进行生物学研究, 对深入探寻 CKD 发病机制具有十分重要的意义。高甘油三酯血症 (hypertriglyceridemia, HTG) 是 CKD 发展的一个重要危险因素^[3], 血浆 ApoC III 浓度升

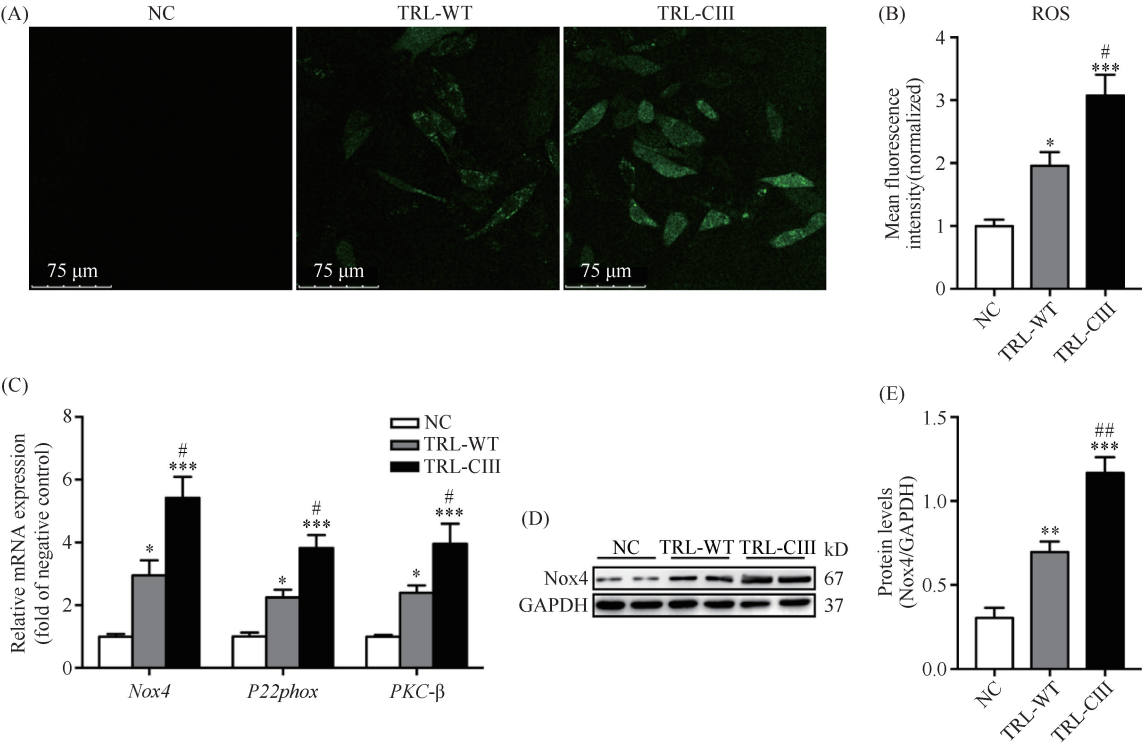


Fig.3 ApoCⅢ promoted activation of oxidative stress pathway in HMCs HMCs were incubated with 400 mg/L TRLs for 12 hours. (A) Representative images of DCFH-DA-staining and (B) quantification of ROS levels (normalized with DMEM negative controls). (C) mRNA expression levels of Nox4, P22phox and PKC-β were analyzed by RT-PCR assay. (D) Protein expression level of Nox4 was analyzed by Western blot. GAPDH was used as a reference protein. (E) The amount of Nox4 protein was normalized to that of GAPDH. TRLs, triglyceride-rich lipoproteins; NC, negative control; TRL-WT, TRLs of wild type mice; TRL-CⅢ, TRLs of ApoCⅢ transgenic mice; HMCs, human mesangial cells. Data is represented as mean±SEM. *n* = 4-6. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001 vs NC group; # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01 vs TRL-WT group

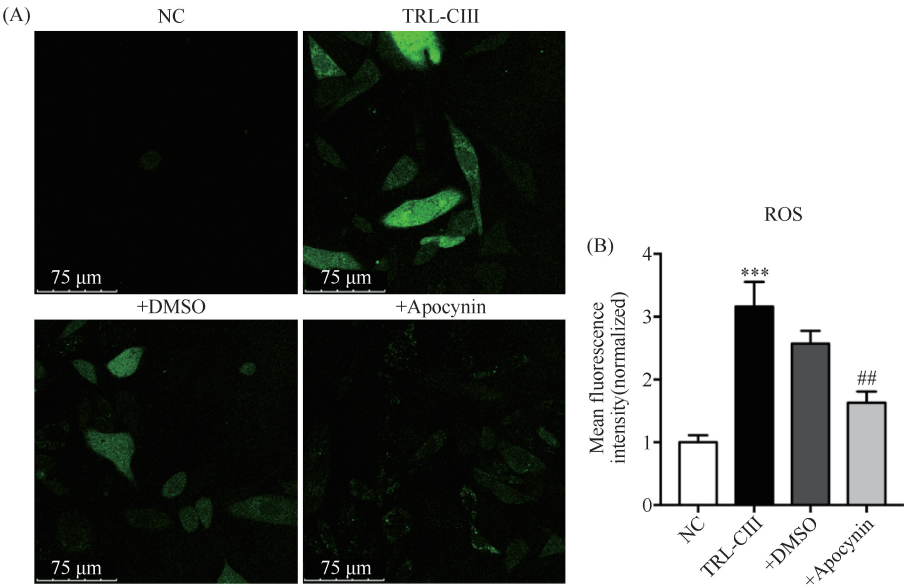


Fig.4 Apocynin significantly inhibited the production of ROS in HMCs induced by ApoCⅢ HMCs were incubated with 400 mg/L TRL-CⅢ alone or co-incubation with 500 μmol/L apocynin and 400 mg/L TRL-CⅢ for 12 hours. (A) Representative images of DCFH-DA-staining and (B) quantification of ROS levels (normalized with DMEM negative controls). TRLs, triglyceride-rich lipoproteins; NC, negative control; TRL-CⅢ, TRLs of ApoCⅢ transgenic mice; +DMSO, TRL-CⅢ + DMSO; + Apocynin, TRL-CⅢ + apocynin; HMCs, human mesangial cells. Data is represented as mean±SEM. *n* = 5. *** *P* < 0.001 vs NC group; ## *P* < 0.05 vs TRL-CⅢ group

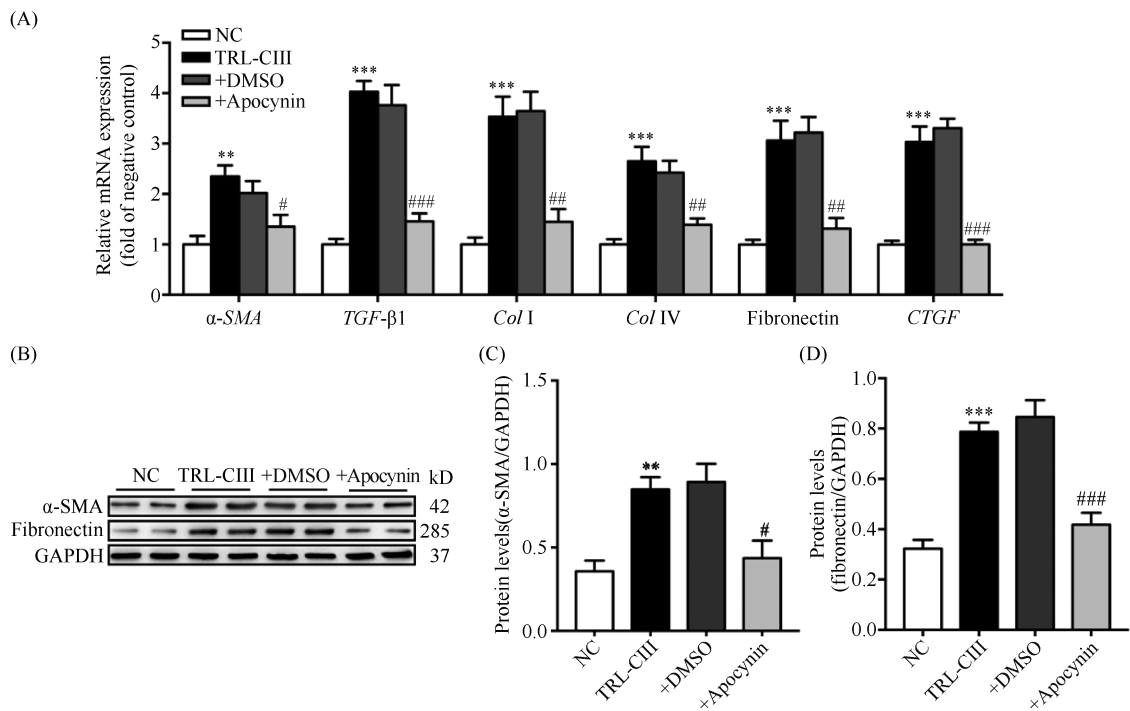


Fig.5 Apocynin reduced the phenotypic transdifferentiation and fibrosis of HMCs induced by ApoC III HMCs were incubated with 400 mg/L TRL-C III alone or co-incubation with 500 μ mol/L apocynin and 400 mg/L TRL-C III for 12 hours. (A) mRNA expression levels of α -SMA, TGF- β 1, Col I, Col IV, fibronectin and CTGF were analyzed by RT-PCR assay. (B) Protein expression levels of α -SMA and fibronectin were analyzed by Western blot. GAPDH was used as a reference protein. (C) The amount of α -SMA protein was normalized to that of GAPDH. (D) The amount of fibronectin protein normalized to that of GAPDH. TRLs, triglyceride-rich lipoproteins; NC, negative control; TRL-C III, TRLs of ApoC III transgenic mice; +DMSO, TRL-C III + DMSO; + Apocynin, TRL-C III + apocynin; HMCs, human mesangial cells. Data is represented as mean \pm SEM. n = 4-6. ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs NC group; # P < 0.05, ## P < 0.01, ### P < 0.001 vs TRL-C III group

高,特别是其在TRLs及其残余物中的累积增多,是CKD血脂异常的共同特征^[13]。研究表明,ApoC III在CKD中发挥重要作用^[2, 3],但ApoC III促进CKD进展的作用机制以及是否独立于HTG促进CKD进展目前仍不清楚。ApoC III主要是通过TRLs发挥作用,血浆中游离的ApoC III很快被降解。因此,本文比较了2种不同ApoC III含量的TRLs在人肾小球系膜细胞转分化中的作用,以明确TRLs中高表达ApoC III是否有促进人肾小球系膜细胞转分化的作用。

人肾小球系膜细胞转分化成MFb后成为肾小球细胞外基质沉积的一个重要细胞类型,其特征而在于获得 α -SMA阳性表型和细胞外基质的合成^[14]。 α -SMA是肾固有细胞转分化成MFb后合成的一种标志物,其在肾局部表达的高低可间接反映MFb的数量及纤维化程度^[15]。前期预实验结果发现,给予正常TRLs(TG浓度为400 mg/L)孵育12 h, α -SMA可明显增高,因此我们在后续实验中采用该条件来研究ApoC III在HMCs转分化中的作用。既往研究表明,CTGF可介导TGF- β 诱导HMCs中主要基质

成分纤连蛋白和Col IV水平升高^[16]。TGF- β 可促进MFb形成和 α -SMA表达,进而引起纤连蛋白和胶原蛋白的合成增强,导致组织硬化^[17, 18]。本文发现,TRLs可促进HMCs中 α -SMA、fibronectin、CTGF、TGF- β 、Col I和Col IV的mRNA及前2个因子的蛋白质表达水平升高,TRL-C III组较TRL-WT组作用更为明显。结果表明,TRL促进HMCs表型转分化,TRLs中高表达ApoC III能进一步促进转分化的作用。

氧化应激是促进CKD和DN进展的重要原因^[19, 20]。Gorin等^[21]研究证明,Nox4依赖性的ROS产生可介导肾小球肥大和肾小球系膜基质沉积。研究发现,TRLs可诱导人脐静脉内皮细胞及巨噬细胞中的氧化应激水平增强^[22],过表达人ApoC III的小鼠肝细胞中氧化应激水平增强^[23],ApoC III的沉默可使小鼠胎盘细胞中氧化应激水平下降^[24]。研究表明,氧化应激可促进MCs的转分化^[7]。本研究发现,TRLs能刺激HMCs内氧化相关因子及ROS的表达增加,且高表达ApoC III的TRLs的作用更明显。使用了NADPH氧化酶抑制剂apocynin后,高表达

ApoCⅢ的TRLs引起的氧化应激反应受到明显抑制,同时转分化及纤维化相关因子表达下降。以上结果表明,TRLs通过促进HMCs氧化应激水平促进人肾小球系膜细胞表型转分化,引起HMCs的损伤。但ApoCⅢ具体通过什么途径引起氧化通路的激活以及HMCs的转分化还需进一步研究。

综上所述,本研究首次发现,TRLs通过氧化应激通路促进HMCs表型转分化,高表达ApoCⅢ可进一步促进该作用。结果提示,ApoCⅢ可能通过促进人肾小球系膜细胞转分化加速在CKD的进展,为临床CKD的预防和治疗提供了新的思路。

参考文献 (References)

- [1] Norata GD, Tsimikas S, Pirillo A, *et al.* Apolipoprotein C-Ⅲ: from pathophysiology to pharmacology[J]. Trends Pharmacol Sci, 2015, **36**(10): 675-687
- [2] Ooi EM, Chan DT, Watts GF, *et al.* Plasma apolipoprotein C-Ⅲ metabolism in patients with chronic kidney disease[J]. J Lipid Res, 2011, **52**(4): 794-800
- [3] Hager MR, Narla AD, Tannock LR. Dyslipidemia in patients with chronic kidney disease [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2017, **18**(1): 29-40
- [4] Hu ZJ, Ren LP, Wang C, *et al.* Associations between apolipoprotein CⅢ concentrations and microalbuminuria in type 2 diabetes[J]. Exp Ther Med, 2014, **8**(3): 951-956
- [5] Kishi S, Abe H, Akiyama H, *et al.* SOX9 protein induces a chondrogenic phenotype of mesangial cells and contributes to advanced diabetic nephropathy [J]. J Biol Chem, 2011, **286**(37): 32162-32169
- [6] Jha JC, Banal C, Chow BS, *et al.* Diabetes and kidney disease: role of oxidative stress [J]. Antioxid Redox Signal, 2016, **25**(12): 657-684
- [7] Barnes JL, Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases [J]. Kidney Int, 2011, **79**(9): 944-956
- [8] Abdelsamie SA, Li Y, Huang Y, *et al.* Oxidized LDL immune complexes stimulate collagen IV production in mesangial cells via Fc gamma receptors I and Ⅲ [J]. Clin Immunol, 2011, **139**(3): 258-266
- [9] Bhatt NP, Park JY, Lee HJ, *et al.* Apocynin protects mesangial cells from lipopolysaccharide-induced inflammation by exerting heme oxygenase 1-mediated monocyte chemoattractant protein-1 suppression[J]. Int J Mol Med, 2017, **40**(4): 1294-1301
- [10] Wu J, Zhang W, Liu X, *et al.* Apocynin protects endothelial cells from endoplasmic reticulum stress- induced apoptosis via IRE1alpha engagement [J]. Mol Cell Biochem, 2018, **449**(1-2): 257-265
- [11] Wang H, Xu PF, Li JY, *et al.* Adipose tissue transplantation ameliorates lipodystrophy-associated metabolic disorders in seipin-deficient mice[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2019, **316**(1): E54-E62
- [12] Li H, Han Y, Qi R, *et al.* Aggravated restenosis and atherogenesis in ApoCⅢ transgenic mice but lack of protection in ApoCⅢ knockouts: the effect of authentic triglyceride-rich lipoproteins with and without ApoCⅢ [J]. Cardiovasc Res, 2015, **107**(4): 579-589
- [13] Chan DT, Irish AB, Dogra GK, *et al.* Dyslipidaemia and cardiorenal disease: mechanisms, therapeutic opportunities and clinical trials[J]. Atherosclerosis, 2008, **196**(2): 823-834
- [14] Faulkner JL, Szykalski LM, Springer F, *et al.* Origin of interstitial fibroblasts in an accelerated model of angiotensin II- induced renal fibrosis [J]. Am J Pathol, 2005, **167**(5): 1193-1205
- [15] Alexopoulos E, Gionanlis L, Papayianni E, *et al.* Predictors of outcome in idiopathic rapidly progressive glomerulonephritis (IRPGN) [J]. BMC Nephrol, 2006, **7**: 16
- [16] Weston BS, Wahab NA, Mason RM. CTGF mediates TGF-β - induced fibronectin matrix deposition by upregulating active α5β1 integrin in human mesangial cells[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, **14**(3): 601-610
- [17] Mack M, Yanagita M. Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis[J]. Kidney Int, 2015, **87**(2): 297-307
- [18] Hinz B. Myofibroblasts[J]. Exp Eye Res, 2016, **142**: 56-70
- [19] Krata N, Zagodzón R, Foronczewicz B, *et al.* Oxidative stress in kidney diseases: the cause or the consequence? [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2018, **66**(3): 211-220
- [20] 吴垣轅, 刘东方. Nox 和氧化应激与糖尿病[J]. 中国生物化学与分子生物学报 (Wu YY, Liu DF. Nox and oxidative stress in diabetes[J]. Chin J Biochem Mol Biol), 2013, **29**(1): 7-12
- [21] Gorin Y, Block K, Hernandez J, *et al.* Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney[J]. J Biol Chem, 2005, **280**(47): 39616-39626
- [22] Yingchun H, Yahong M, Jiangping W, *et al.* Increased inflammation, endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in endothelial and macrophage cells exacerbate atherosclerosis in ApoCⅢ transgenic mice [J]. Lipids Health Dis, 2018, **17**(1): 220
- [23] Ehx G, Gérin S, Mathy G, *et al.* Liver proteomic response to hypertriglyceridemia in human- apolipoprotein C-Ⅲ transgenic mice at cellular and mitochondrial compartment levels[J]. Lipids Health Dis, 2014, **13**: 116
- [24] Li FH, Wang Y, Liu XL, *et al.* The silencing of ApoC3 suppresses oxidative stress and inflammatory responses in placenta cells from mice with preeclampsia via inhibition of the NF-kappaB signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018, **107**: 1377-1384