

血清淀粉样蛋白 A 通过 LOX-1 促进系膜细胞摄取脂质

郝怡然 陈逸歌 李 彧 刘梦妤 刘 华

摘 要 **目的** 探讨 SAA 是否促进人肾小球系膜细胞(human mesangial cells,HMCs)摄取氧化低密度脂蛋白(oxidised low-density lipoprotein,Ox-LDL)及其植物血凝素样受体 1(lectin-like oxidised low-density lipoprotein receptor 1,LOX-1)表达的影响。**方法** 应用油红“O”染色和流式细胞计数观察 SAA 对 HMCs 摄取脂质的影响,采用实时定量 PCR 和 Western blot 法测定 SAA 对 LOX-1 的表达。**结果** 油红“O”染色和流式细胞计数显示 SAA 促进 HMCs 摄取 Ox-LDL,流式细胞计数发现抗 LOX-1 抑制对 Ox-LDL 的摄取。SAA 促进 LOX-1 mRNA 和蛋白的表达,提示 SAA 可能通过 LOX-1 介导对 Ox-LDL 摄取。**结论** SAA 可通过 LOX-1 途径促进 HMCs 摄取脂质,针对 SAA-LOX-1 相关通路的治疗,可能是逆转肾小球硬化的潜在治疗靶点。

关键词 血清淀粉样蛋白 A 脂质稳态 氧化低密度脂蛋白植物血凝素样受体 1

中图分类号 R692 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.08.024

Serum Amyloid A Increases Lipid Uptake by Mesangial Cells via Lectin-like Oxidized Low-density Lipoprotein Receptor 1. Hao Yiran, Chen Yige, Li Yu, et al. Xuanwu Hospital Capital Medical University, Beijing 100053, China

Abstract Objective To reveal whether serum amyloid A (SAA) increased oxidised low-density lipoprotein (Ox-LDL) uptake by human mesangial cells (HMCs) and its effect on expression of lectin-like Ox-LDL receptor 1 (LOX-1). **Methods** Red oil “O” and flow cytometry were used to evaluate the effect of SAA on lipid uptake by HMCs. Effect of SAA on LOX-1 expression were calculated by real-time polymerase chain reaction (PCR) and western blotting. **Results** Red oil “O” and flow cytometry revealed that SAA promoted uptake of Ox-LDL by HMCs. Additionally, increased uptake of Ox-LDL was inhibited by an anti-LOX-1 antibody through flow cytometry. Furthermore, SAA promoted LOX-1 mRNA and protein expression of HMCs, suggesting that enhanced uptake of Ox-LDL may be mediated by LOX-1 pathway. **Conclusion** SAA stimulates lipid uptake of HMC via LOX-1, therapy toward anti-SAA-LOX-1 pathway and related lipid disorders may be potential treatments for glomerulosclerosis.

Key words Serum amyloid A; Lipid homeostasis; Lectin-like Ox-LDL receptor 1

临床研究发现各种肾脏疾病常伴有炎症反应,而炎症促进肾小球硬化的发生、发展^[1]。血清淀粉样蛋白 A (serum amyloid A, SAA) 作为强效炎性因子,在炎症和脂质代谢中起关键作用^[2]。SAA 检测有助于多种疾病的诊断和预后评估,如类风湿关节炎、动脉粥样硬化、肥胖、糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)^[3-6]。最近的证据显示 SAA 是炎症通路的中枢介质,SAA 水平在 DKD 早期升高,促进肾小球硬化和肾间质纤维化^[7]。高脂血症常伴发于多种肾脏疾病,如肾病综合征,是促进肾小球硬化的危险因素^[8]。炎性因子可能与脂质失衡共同参与了肾小球

硬化的进展,观察炎性因子对细胞脂质稳态的影响是探讨脂质介导肾损伤的关键^[9]。氧化低密度脂蛋白(oxidised low-density lipoprotein, Ox-LDL)植物血凝素样受体 1(lectin-like oxidised low-density lipoprotein receptor 1, LOX-1)在炎症和脂质代谢紊乱相关性疾病的发生、进展中发挥重要作用^[10-12]。炎性因子 SAA 对人肾小球系膜细胞(human mesangial cells, HMCs) LOX-1 受体及脂质代谢的相关研究较少。本研究通过观察 SAA 对 HMCs 摄取脂质及 LOX-1 受体表达的变化,探讨炎症在细胞水平影响 HMCs 脂质稳态的病理、生理机制。

材料与方法

1. 材料: RPMI1640 培养液及胎牛血清(Foetal calf serum, FCS)(美国 Gibco Life Technologies 公司),人肾小球系膜细胞由英国皇家医学院肾脏病中心阮雄中教授惠赠, SAA(美国 Peprotech Technologies 公

基金项目:首都医科大学学生创新课题基金资助项目(XSKY2020129)

作者单位:100053 北京,首都医科大学宣武医院

通讯作者:刘华,电子邮箱:suchbj@126.com

司)、Ox-LDL(中国医学科学院基础研究所)、油红“O”(美国 Sigma-Aldrich 公司)、荧光 Dil-Ox-LDL(美国 Biomed Technologies 公司)、LOX-1 抗体(美国 R&D Systems 公司)。PCR 反应体系、反转录酶缓冲液(美国 Promega Corporation 公司)、dNTP、Oligo(dT)、引物(上海生物工程有限公司)合成, LOX-1 引物序列:上游引物:5'-ACAGAGGCCAT-TCCGAAATCA-3',下游引物:5'-GGTAGACTCTG-GAGATGGACCACA-3'。GAPDH 引物序列:上游引物:5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游引物:5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'。

2. HMCs 的培养:用 10% FCS 的 RPMI1640 培养液在 5% CO₂ 培养箱 37℃ 培养 HMCs, 0.01 mol/L PBS 冲洗, 0.25% 胰蛋白酶/0.025 EDTA 消化, 10% FCS 的 RPMI1640 培养液悬浮细胞传代培养。

3. 油红“O”染色:培养 HMCs (5 × 10⁴ 个/毫升)至亚融合状态, 静止后将细胞随机分组, 对照组(0.2% RPMI1640)和 SAA 处理组(5 ng/ml SAA + 0.2% RPMI1640), 加入 Ox-LDL (40 mg/L) 继续培养 24 h, 油红“O”染色后观察摄片。

4. 流式细胞计数:培养 HMCs 至亚融合状态, 静止后将细胞随机分组, 对照组、SAA 组(5 ng/ml SAA)和 LOX-1 受体阻断 + SAA 组(2 ng/ml 抗 LOX-1 抗体 + 5 ng/ml SAA, 抗 LOX-1 抗体提前 2 h 应用), 孵育 12 h 各组加入 10 mg/L 的荧光 Dil-Ox-LDL, 继续培养 5 h。PBS 重复冲洗、消化、离心, 制成细胞悬液, 流式细胞仪计数 6000 个细胞, 计算各组细胞内平均荧光值。

5. 实时定量 PCR 测定:培养 HMCs 至亚融合状态, 静止后随机分为 3 组, 分别用含 0、5、10 ng/ml SAA 的培养基, 培养 12 h 后收获细胞, 提取总 RNA, 合成 cDNA, 25 μl 反应体系进行 PCR 扩增, 95℃ 10 s, 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 共扩增 45 ~ 50 个循环。

6. Western blot 法检测:培养 HMCs 至亚融合状态, 静止后随机分为 3 组, 分别用含 0、5、10 ng/ml SAA 的培养基, 培养 12 h 后收获细胞, 提取总蛋白。上样 100 μg 蛋白质电泳, 转膜 1 h, 封闭缓冲液过夜, 0.2 ng/L 一抗与膜孵育, 室温缓慢振荡 2 h, 洗膜, 1:5000 二抗室温缓慢振荡 1 h, 洗膜, ECL 显影。

7. 统计学方法:采用 SPSS 23.0 统计学软件对数据进行统计分析, 各组数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间均数比较采用非配对 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 以 *P* <

0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. SAA 促进 HMCs 对 Ox-LDL 的摄取:油红“O”染色发现 HMCs 摄取 Ox-LDL, SAA 组较对照组细胞内红染颗粒明显粗大、增多, 提示 SAA 增强 HMCs 对 Ox-LDL 的摄取(图 1)。

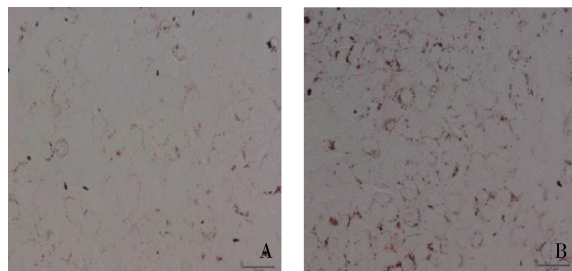


图 1 SAA (5 ng/ml) 促进 HMCs 对 Ox-LDL 的摄取

(油红“O”染色, ×200)

A. 对照组; B. SAA 刺激组

2. 流式细胞仪计数: HMCs 摄取 Dil-Ox-LDL, 对照组 HMCs 平均荧光值为 8.6, SAA 组细胞内平均荧光值为 51.9, 为对照组的 6.03 倍, 提示 SAA 促进 HMCs 摄取 Dil-Ox-LDL, 应用抗 LOX-1 共孵育 2 h, 阻断组细胞内平均荧光值为 41.2, 为对照组的 4.79 倍, 降低为单纯 SAA 刺激组的 79.3% (图 2)。

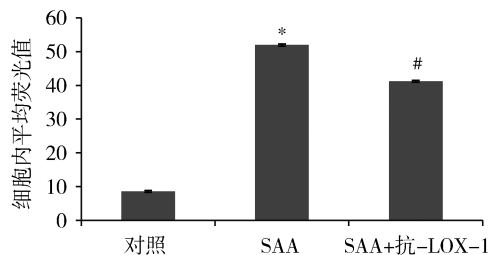


图 2 SAA 刺激及抗 LOX-1 抗体对 HMCs 摄入 Dil-Ox-LDL 的影响

与对照组比较, * *P* < 0.05; 与 SAA 组比较, # *P* < 0.05

3. SAA 对 LOX-1 mRNA 表达的影响: SAA 促进 LOX-1 mRNA 的表达。用 0、5、10 ng/ml SAA 刺激 HMCs 12 h, 5 ng/ml SAA 组 LOX-1 mRNA 水平升高为对照组的 5.12 倍, 10 ng/ml SAA 组 LOX-1 mRNA 水平达高峰, 为对照组的 6.97 倍(图 3)。

4. SAA 对 LOX-1 蛋白表达的影响: SAA 促进 LOX-1 蛋白的表达。用 0、5 和 10 ng/ml SAA 刺激 HMCs 12 h, 5 ng/ml SAA 组 LOX-1 蛋白水平升高为对照组的 2.61 倍, 10 ng/ml SAA 组 LOX-1 蛋白水平达高峰, 为对照组的 3.15 倍(图 4)。

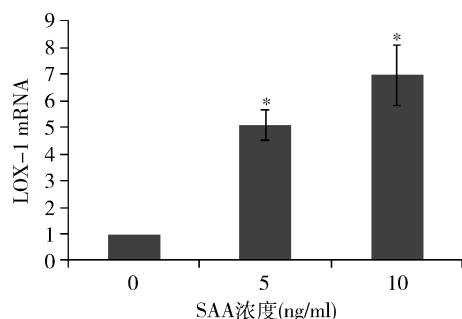


图 3 不同浓度 SAA 作用 12h 对 LOX-1 mRNA 表达的影响

与 0ng/ml 比较, * $P < 0.05$

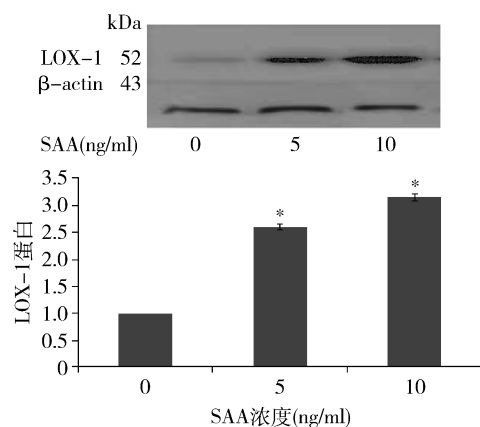


图 4 不同浓度 SAA 作用 12h 对 LOX-1 蛋白表达的影响

与 0ng/ml 比较 * $P < 0.05$

讨 论

研究表明,原发和继发性肾脏疾病常伴发炎症状态,如 IgA 肾病、狼疮性肾炎,抗炎治疗是有效的治疗措施^[13]。SAA 作为急性时相反应蛋白,在炎症反应中迅速升高,并参与慢性炎症疾病的发展。流行病学研究发现,类风湿关节炎、代谢综合征、冠状动脉粥样硬化和 DKD 患者中 SAA 水平显著升高^[14~17]。近年来研究发现 SAA 诱导巨噬细胞形成泡沫细胞,抑制胆固醇的逆向运输,导致细胞内脂质失衡,促进动脉粥样硬化的形成^[18]。因此炎症因子 SAA 与高脂血症共同参与了动脉粥样硬化的发病机制。肾脏疾病常表现为炎症状态,高脂血症是肾脏疾病的独立致病因素,因此研究炎症导致细胞脂质失衡的机制是阐明脂质介导肾损伤的关键路径,目前炎症因子 SAA 是否影响 HMCs 脂质稳态尚不明确。

SAA 可能通过 LOX-1 途径促进 HMCs 摄取 Ox-LDL 影响细胞内脂质稳态。既往研究表明肾小球硬化与动脉粥样硬化类似,是多种细胞因子参与的

慢性炎症过程。HMCs 在生理条件下摄取 Ox-LDL,通过自我调节与脂质代谢相关受体的表达,维持细胞内脂质平衡。炎症因子可以打破脂质水平介导的负反馈调节,导致大量摄入脂质,最终超过其清除能力形成泡沫细胞^[19]。高脂血症的程度与肾小球硬化的程度不平行,近期研究显示炎症是加重脂质异常导致肾损伤的关键^[20]。本研究表明,炎症因子 SAA 促进 HMCs 摄取大量 Ox-LDL,脂质过度积聚导致泡沫细胞形成,HMCs 来源的泡沫细胞可进一步释放细胞因子导致肾小球硬化,提示炎症因子 SAA 在细胞水平影响脂质稳态^[21]。LOX-1 作为 Ox-LDL 的重要受体,能特异性结合 Ox-LDL,在内皮细胞、巨噬细胞、血管平滑肌细胞、成纤维细胞和其他细胞中广泛表达。既往研究已经证实,Ox-LDL 可以正反馈刺激自身 LOX-1 受体,炎症因子进一步促进 LOX-1 表达,LOX-1-Ox-LDL 通路可激活核因子- κ B (NF- κ B) 等细胞因子,引发瀑布级联样炎症反应^[22]。本研究表明,SAA 促进 HMCs 摄取 Ox-LDL,而抗 LOX-1 抗体可部分阻断对 Ox-LDL 摄取,提示 SAA 可通过 LOX-1 受体途径刺激 HMCs 摄取大量 Ox-LDL。因此,SAA 促进 HMCs 通过 LOX-1 途径摄取过度脂质,诱导转化生长因子- β 等细胞因子表达,促进肾小球细胞增殖,提示 LOX-1 在肾小球硬化进展中发挥关键作用^[23]。

LOX-1 是 Ox-LDL 的重要受体和关键炎症因子,SAA 作为强有力的炎症介质促进 LOX-1 表达。研究发现 SAA 作为炎症因子在多种组织和细胞发挥促炎作用,导致代谢紊乱和动脉粥样硬化的形成。通过对肥胖患者的观察发现,SAA 水平可间接反映胰岛素抵抗的程度。SAA 可以抑制胆固醇的逆向运输升高血浆胆固醇浓度,进一步促进动脉粥样硬化的形成。因此,SAA 作为代谢综合征和炎症相关疾病的危险因素得到广泛重视。越来越多的证据表明,炎症是 DKD 发生、发展的关键环节,SAA 与 DKD 患者组织学严重程度相关,显著参与 DKD 的进展。SAA 在高糖条件培养的足细胞和系膜细胞表达上调,进一步诱导炎症反应促进 DKD 特征性损害。因此,SAA 介导的炎症信号通路成为 DKD 新的生物学标志物和潜在的治疗靶点。SAA 结合高密度脂蛋白通过 NF- κ B 途径刺激低密度脂蛋白受体缺陷小鼠肾脏 LOX-1 表达,促进肾脏纤维化。高糖通过磷酸化丝裂原活化蛋白激酶 P38 途径诱导 LOX-1 的表达,增强 Ox-LDL 诱导的肾小管间质细胞凋亡,为 DKD 的分子机制研

究提供了新思路。抗 LOX - 1 治疗可能是逆转血脂异常和 DKD 致病因素的有效方法,因此 LOX - 1 在糖尿病和慢性肾脏病进展中发挥关键作用^[23]。本研究提示 SAA 可能通过 LOX - 1 途径增强 Ox - LDL 摄取,促进 LOX - 1 表达,导致 HMCs 脂质失衡转化为泡沫细胞,表明与动脉粥样硬化发病机制类似,SAA 水平升高是肾小球硬化的危险因素,阻断或拮抗 SAA 和 LOX - 1 相关炎症通路可能延缓 DKD 进展。

综上所述,炎症因子 SAA 通过 LOX - 1 受体途径促进 Ox - LDL 摄取,而抗 LOX - 1 抗体可降低对 Ox - LDL 摄取,SAA 进一步促进 LOX - 1 mRNA 和蛋白的表达。因此,炎症因子 SAA 通过增强 LOX - 1 受体表达促进脂质的摄取,影响细胞内脂质稳态,进一步可激活多种细胞因子,促进炎症反应加重脂质肾损害。SAA 水平升高可能是 DKD 发展的危险因素和生物学标志物,然而仍需进一步研究阐明具体致病机制,阻断相关炎症通路及脂质代谢紊乱将是治疗肾小球硬化的新靶点。

参考文献

- Khalili M, Bonnefoy A, Genest DS, *et al.* Clinical use of complement, inflammation, and fibrosis biomarkers in autoimmune glomerulonephritis[J]. *Kidney Int Rep*, 2020, 5(10): 1690 - 1699
- Zhang Y, Zhang J, Sheng H, *et al.* Acute phase reactant serum amyloid A in inflammation and other diseases[J]. *Adv Clin Chem*, 2019, 90: 25 - 80
- Ma MHY, Defranoux N, Li W, *et al.* A multi - biomarker disease activity score can predict sustained remission in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2020, 22: 158
- Shridas P, Tannock LR. Role of serum amyloid A in atherosclerosis[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2019, 30(4): 320 - 325
- Baranova IN, Souza ACP, Bocharov AV, *et al.* Human SR - BII mediates SAA uptake and contributes to SAA pro - inflammatory signaling in vitro and in vivo[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175824
- Meek RL, LeBoeuf RC, Saha SA, *et al.* Glomerular cell death and inflammation with high - protein diet and diabetes[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2013, 28: 1711 - 1720
- Dieter BP, Meek RL, Anderberg RJ, *et al.* Serum amyloid A and Janus kinase 2 in a mouse model of diabetic kidney disease[J]. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0211555
- Pascual V, Serrano A, Pedro - Botet J, *et al.* Chronic kidney disease and dyslipidaemia[J]. *Clin Investig Arterioscler*, 2017, 29(1): 22 - 35
- Banach M, Aronow WS, Serban MC, *et al.* Lipids, blood pressure and kidney update 2015[J]. *Lipids Health Dis*, 2015, 14: 167
- Kattoor AJ, Goel A, Mehta JL. LOX - 1: regulation, signaling and its role in atherosclerosis[J]. *Antioxidants: Basel*, 2019, 8(7): 218
- Stankova T, Delcheva G, Maneva A, *et al.* Serum levels of carbamylated LDL and soluble lectin - like oxidized low - density lipoprotein receptor - 1 are associated with coronary artery disease in patients with metabolic syndrome[J]. *Medicina: Kaunas*, 2019, 55(8): 493
- Hashimoto K, Oda Y, Nakagawa K, *et al.* LOX - 1 deficient mice show resistance to zymosan - induced arthritis[J]. *Eur J Histochem*, 2018, 62(1): 2847
- Tao J, Mariani L, Eddy S, *et al.* JAK - STAT activity in peripheral blood cells and kidney tissue in IgA nephropathy[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2020, 15(7): 973 - 982
- 孟海妹, 魏蔚, 焦亚冲, 等. 血清淀粉样蛋白 A 通过 Toll 样受体 4 途径诱导类风湿关节炎中性粒细胞胞外诱捕网形成[J]. *中华风湿病学杂志*, 2017, 21(6): 404 - 408
- Poitou C, Divoux A, Faty A, *et al.* Role of serum amyloid A in adipocyte - macrophage cross talk and adipocyte cholesterol efflux[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(5): 1810 - 1817
- Webb NR. High - Density lipoproteins and serum amyloid A (SAA) [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2021, 3(2): 7
- Saulnier PJ, Dieter BP, Tanamas SK, *et al.* Association of serum amyloid A with kidney outcomes and all - cause mortality in American indians with type 2 diabetes[J]. *Am J Nephrol*, 2017, 46(4): 276 - 284
- Cai X, Ahmad G, Hossain F, *et al.* High - density lipoprotein (HDL) inhibits serum amyloid A (SAA) - induced vascular and renal dysfunctions in apolipoprotein E - deficient mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4): 1316
- Kelly KJ, Wu P, Patterson CE, *et al.* LOX - 1 and inflammation: a new mechanism for renal injury in obesity and diabetes[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294(5): 1136 - 1145
- Nagase M, Kaname S, Nagase T, *et al.* Expression of LOX1, an oxidized low - density lipoprotein receptor, in experimental hypertensive glomerulosclerosis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11: 1826 - 1836
- Twigg MW, Freestone K, Homer - Vanniasinkam S, *et al.* The LOX - 1 scavenger receptor and its implications in the treatment of vascular disease[J]. *Cardiol Res Pract*, 2012: 632408
- Lee HY, Kima SD, Baek S, *et al.* Serum amyloid A stimulates macrophage foam cell formation via lectin - like oxidized low - density lipoprotein receptor 1 upregulation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 433(1): 18 - 23
- Deng S, Jin T, Zhang L, *et al.* Mechanism of tacrolimus - induced chronic renal fibrosis following transplantation is regulated by ox - LDL and its receptor, LOX - 1[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5): 4124 - 4134

(收稿日期: 2021 - 05 - 19)

(修回日期: 2021 - 06 - 06)