

[文章编号] 1671-587X(2018)06-1156-07

DOI: 10.13481/j.1671-587x.20180608

NMN在糖尿病肾病大鼠肾脏纤维化中的作用及其机制

崔奇¹, 王曼伊², 农琳琳³, 翟晓雅¹, 冯乐平¹

(1. 桂林医学院公共卫生学院食品卫生与营养教研室, 广西 桂林 541004; 2. 桂林医学院第一附属临床医院 优生优育科, 广西 桂林 541004; 3. 桂林医学院基础医学院实验教学中心, 广西 桂林 541004)

[摘要] 目的: 探讨烟酰胺单核苷酸(NMN)对糖尿病肾病(DN)大鼠肾细胞纤维性变的作用, 阐明NMN通过沉默信息调节因子1(Sirt1)和AKT途径缓解肾实质细胞纤维化的机制。方法: 采用链脲佐菌素(STZ)制备SD大鼠2型糖尿病模型, 模型大鼠随机分为实验组($n=30$)和对照组($n=10$): 实验组大鼠分为糖尿病+NMN组($n=15$, 连续皮下注射NMN)和糖尿病+PBS组($n=15$, 大鼠注射 $200\ \mu\text{L}$ 无菌PBS), 之后断头处死大鼠, 取肾脏组织进行切片和蛋白提取, Western blotting法和免疫共聚焦法检测2组大鼠肾小球细胞中Sirt1、AKT、p-FoxO3a和Cav-1蛋白表达水平。采用高浓度葡萄糖($200\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理大鼠肾小球系膜HBZY-1细胞3~6 d后, 随机将培养细胞分为4组(分别给予0、50、100和 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NMN), 以给予 $5.6\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖不给予NMN的细胞作为对照组, 继续培养24 h后收集细胞提取蛋白, 采用Western blotting法检测各组HBZY-1细胞中Sirt1、AKT和p-FoxO3a蛋白表达水平。结果: 与糖尿病+PBS组比较, 糖尿病+NMN组大鼠肾实质细胞中Sirt1和AKT蛋白表达水平明显升高($P<0.01$), 糖尿病+NMN组大鼠肾实质细胞中p-FoxO3a和Cav-1蛋白表达水平升高($P<0.01$)。与对照组(给予 $5.6\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖)比较, $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NMN组HBZY-1细胞中Sirt1和AKT蛋白表达水平升高($P<0.05$), 100和 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NMN组HBZY-1细胞中Sirt1、AKT和p-FoxO3a蛋白表达水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论: NMN能够通过调节Sirt1与AKT蛋白表达提高DN大鼠肾小球细胞中内源性p-FoxO3a和Cav-1蛋白表达, NMN及其类似物可能具有潜在预防或治疗DN大鼠肾小球纤维化的作用。

[关键词] 糖尿病肾病; 烟酰胺单核苷酸; 沉默信息调节因子1; 蛋白激酶B; 叉头转录因子3a

[中图分类号] R363.1; R587.2 **[文献标志码]** A

Effect of NMN on renal fibrosis of diabetic nephropathy rats and its mechanism

CUI Qi¹, WANG Manyi², NONG Linlin³, ZHAI Xiaoya¹, FENG Leping¹

(1. Department of Food Hygiene and Nutrition, School of Public Health, Guilin Medical University, Guilin 541004, China; 2. Department of Eugenic and Superior Nurture, First Affiliated Clinical Hospital, Guilin Medical University, Guilin 541004, China; 3. Experimental Teaching Center, School of Basic Medical Sciences, Guilin Medical University, Guilin 541004, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of niacinamide mononucleotide (NMN) on the fibrosis of renal cells in the rats with diabetic nephropathy (DN), and to elucidate the mechanism of NMN in regulating the fibrosis of renal parenchymal cells through silent information regulator 1 (Sirt1) and AKT pathways. **Methods:** The rat models of type 2 diabetes mellitus were induced by streptozotocin (STZ) and the model rats were randomly divided into experiment group ($n=30$) and control group ($n=10$). The rats in experiment group were divided into diabetes+NMN group ($n=15$) and diabetes+PBS group ($n=15$). The rats in diabetes+NMN group were given

[收稿日期] 2018-07-16

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(81460164, 31060161); 广西省科技厅自然科学基金资助课题(2015GXNSF)

[作者简介] 崔奇(1994-), 女, 江苏省盐城市人, 在读医学硕士, 主要从事糖尿病发病机制的细胞生物学方面的研究。

[通信作者] 冯乐平, 教授, 硕士研究生导师(Tel: 0773-5835125, E-mail: lpfeng1226@163.com)

subcutaneous injection of NMN for 20 d and the rats in diabetes+PBS group were given 200 μL sterile PBS in the same way. Then the rats were decapitated and the kidney tissues were taken for section and protein extraction. The expression levels of Sirt1, AKT, p-FoxO3a and Cav-1 proteins in kidney tissue of the rats in various groups were detected by Western blotting method and immuno-confocal focusing. The glomerular mesangial HBZY-1 cells were treated with high concentration of glucose ($200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 3–6 d, and then the cells were further randomly divided into 4 groups (treated with 0, 50, 100, and 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NMN) and the cells only treated with $5.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose were regarded as control group. After 24 h culture, the cells were collected and the expression levels of Sirt1, AKT, and p-FoxO3a proteins in the HBZY-1 cells in various groups were detected by Western blotting method. **Results:** Compared with diabetes +PBS group, the expression levels of Sirt1 and AKT proteins in the renal parenchyma cells of the rats in diabetes+NMN group were significantly increased ($P<0.01$) and the expression levels of p-FoxO3a and Cav-1 proteins in the renal parenchyma cells of the rats in diabetes +NMN group were also increased ($P<0.01$). Compared with control group, the expression levels of Sirt1 and AKT proteins in the HBZY-1 cells of the rats in 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NMN group were significantly increased ($P<0.01$), and the expression levels of Sirt1, AKT, and p-FoxO3a proteins in the HBZY-1 cells in 100 and 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NMN groups were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** NMN can increase the expression levels of endogenous p-FoxO3a and Cav-1 proteins in the glomerular cells of the DN rats by regulating the expression levels of Sirt1 and AKT proteins, indicating that NMN and its analogues may play an important role in the prevention and treatment of the renal fibrosis of the DN rats.

KEYWORDS diabetic nephropathy; nicotinamide mononucleotide; silent information regulator 1; protein kinase B; Forkhead box O3

叉头转录因子 3a (Forkhead box O3a, FoxO3a) 作为 FoxO 家族成员之一, 通过调控下游靶基因, 在细胞凋亡、自噬、氧化应激、细胞分化和细胞代谢等过程中发挥重要作用^[1-4]。p-FoxO3a 能够通过细胞凋亡和细胞自噬作用^[5] 促进成纤维细胞凋亡和自噬, 以及抑制上皮-间质转化 (epithelial mesenchymal transformation, EMT) 基因表达^[6], 从而减缓组织纤维化进程。研究显示: 沉默信息调节因子 1 (silent information regulator, Sirt1) 能够导致 p-FoxO3a 去乙酰化, 上调 p-FoxO3a 表达, 进而阻止氧化应激对组织细胞带来的损伤; p-FoxO3a 也同样受到蛋白激酶 B (AKT) 在不同位点的磷酸化调控, 从而在调节细胞凋亡和抵抗氧化应激等方面发挥作用。本文作者采用动物模型和高糖浓度培养肾小球系膜细胞 (HBZY-1) 对糖尿病引起的肾实质细胞炎性-纤维化进行研究, 通过烟酰胺单核苷酸 (NMN) 调控 Sirt1 和 AKT, 间接影响 p-FoxO3a 和小窝蛋白 (caveolin-1, Cav-1) 表达, 阐明 NMN 减缓糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 大鼠肾脏纤维化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 0.56 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DMEM 培养基 (Dulbecco 公司, 美国), 10% 胎牛血清

(Gemini 公司, 美国), 胰蛋白酶 (工作液浓度 0.25%)、青霉素和链霉素 (终浓度分别为 $100 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $100 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$) (Solarbio 公司, 中国), 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) (Sigma-Aldrich 公司, 德国), 烟酰胺和 NMN (Sigma 公司, 美国), Sirt1 单抗 (Abcam 公司, 英国), 兔抗大鼠 (Cav-1) 单抗 (Santa 公司, 美国), 抗大鼠 AKT 单抗 (Bioword 公司, 美国), FoxO3a 和 p-FoxO3a 单抗 (Abcam 公司, 英国), FITC 标记的羊抗兔多抗和 Cy3 标记的羊抗兔多抗 (LIFE 公司, 美国)。血糖诊断试剂盒 (Omron 公司, 日本), GT-1640 血糖检测仪 (ARKRAY 有限公司, 日本), Cobas111 全自动生化分析仪 (Roche 公司, 美国), LSM700 激光共聚焦扫描显微镜 (Zeiss 公司, 德国), Mini-PROTEAN 3 CELL 165-3301 电泳系统和小型垂直电泳转印系统 (Bio-Rad 公司, 美国)。

1.2 动物分组和给药 SD 大鼠 50 只, 雄性, 体质量 200~250 g, 由桂林医学院实验动物中心提供。大鼠于标准聚丙烯鼠笼中饲养, 室温 (23 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 湿度 50%~60%, 12 h 光/暗光照周期, 1 周后随机分为对照组 ($n=10$, 采用正常饮食, 常规食物包括: 脂肪 5%、碳水化合物 63%、蛋白质 23%、总热值 $25 \text{ kJ} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和实验组 ($n=30$, 采用高脂肪饮食, 高脂肪食物包括: 脂肪 32%、碳水

化合物 48%、蛋白质 20%，总热值 $54.3 \text{ kJ} \cdot \text{kg}^{-1}$)。2 组大鼠均采用灭菌的自来水作为饮用水。实验组大鼠平均体质量为 $(300 \pm 20) \text{ g}$ ，注射 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ STZ，以 $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 冰镇柠檬酸缓冲液 (pH 4.5) 溶解，在 30 min 内通过腹腔注射。对照组大鼠使用柠檬酸盐缓冲液注射。随后从尾静脉中采集血液样本，用于葡萄糖水平测定，当空腹血糖水平持续达到 $16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，SD 大鼠被认为是糖尿病模型大鼠。30 只实验组糖尿病大鼠进一步随机分为糖尿病+NMN 组和糖尿病+PBS 组 (每组 15 只)；糖尿病+NMN 组大鼠静脉注射 NMN ($120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) (NMN 应用 $200 \mu\text{L}$ 无菌磷酸盐缓冲液稀释)，每隔 1 d 在颈部和肩部松散组织皮下注射，持续 20 d；糖尿病+PBS 组大鼠皮下注射接种 $200 \mu\text{L}$ 无菌 PBS，每隔 1 d 在颈部和肩部松散组织皮下注射，持续 20 d，之后断头处死大鼠，摘取肾脏进行组织切片和蛋白提取，分别用于目的蛋白免疫印迹分析及免疫共聚焦分析。本研究经桂林医学院实验动物伦理审查委员会批准。

1.3 细胞培养 大鼠肾小球系膜 HBZY-1 细胞系购自中国医学科学院基础医学研究所。细胞保存于正常浓度葡萄糖 ($5.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 条件下，置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中，于体外 37°C 、5% CO_2 条件下适应性培养 24 h，之后在高浓度葡萄糖 ($200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 氧化应激条件下继续培养 1~6 d，并隔天更换相同条件培养基。高浓度葡萄糖培养细胞按照给予 NMN 浓度的不同，随机分为 0、50、100 和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NMN 组，并设对照组 (未加入高浓度葡萄糖)，继续培养 24 h 后收集细胞，提取蛋白用于相关目的蛋白的免疫印迹分析。

1.4 免疫共聚焦法检测大鼠肾小球细胞中 Sirt1、AKT、p-FoxO3a 和 Cav-1 蛋白表达水平 4% 多聚甲醛固定大鼠肾组织，脱水后石蜡包埋并切片，组织切片经脱蜡和乙醇梯度脱水，枸橼酸微波修复后，加待检蛋白一抗：抗 Sirt1 (1 : 500)、AKT (1 : 1 000)、p-FoxO3a (1 : 1 000) 和 Cav-1 (1 : 400) 单抗进行孵育， 4°C 冰箱静置过夜，加入相应荧光标记的二抗 (1 : 1 000)， 37°C 避光孵育 1 h；采用 PBS 洗涤 3 次，DAPI 避光染色 5 min，N-丙基没食子酸盐 (N-propyl gallate, NPG) (抗荧光淬灭剂) 处理后树脂胶封片，共聚焦显微镜下检测大鼠肾小球细胞质和细胞核中 Sirt1、AKT、

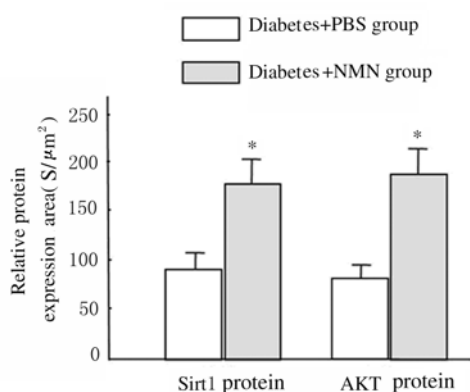
p-FoxO3a 和 Cav-1 蛋白表达水平。绿色荧光代表肾小球细胞中 AKT 和 p-FoxO3a 表达，红色荧光代表肾小球细胞中 Sirt1 和 Cav-1 蛋白表达，采用 ImageJ 2×软件计算 10 个视野的平均荧光强度，以荧光强度表示单位面积蛋白表达水平。

1.5 Western blotting 法检测 HBZY-1 细胞中 Sirt1、AKT、p-FoxO3a 和 Cav-1 蛋白表达水平 将 1 mL 含 1×10^6 mL HBZY-1 细胞悬液移至直径为 35 cm 的培养皿中，增加葡萄糖浓度至 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，培养 6 d 后分别加入 NMN，浓度分别为 0、50、100 和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，继续培养细胞 24 h 后，收集并裂解细胞提取蛋白，采用 Western blotting 法检测高浓度葡萄糖条件下 HBZY-1 细胞中 Sirt1、AKT 和 p-FoxO3 表达水平。取出培养细胞加入细胞裂解液置于 Eppendorf 离心管中，超声波粉碎仪裂解蛋白，经 4°C 低温 $12\ 000 \text{ g}$ 、15 min 离心取上清液；蛋白定量后行 SDS-PAGE 电泳，电压 120 V，PVDF 半干式转膜 (电压 150 V、60 min)，牛血清白蛋白封闭滤膜，加入待检蛋白一抗 [Sirt1 (1 : 500)、AKT (1 : 200)、p-FoxO3a (1 : 1 000) 和 Cav-1 (1 : 600)]， 4°C 孵育过夜，次日加入相应二抗 (1 : 2 000) 后孵育 1 h，将 PVDF 膜置于凝胶成像系统中获取相应蛋白条带的积分吸光度 (integrated absorbance, IA) 值，计算蛋白相对表达水平。蛋白相对表达水平 = 目标蛋白的 IA 值/ β -actin 的 IA 值。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析。各组大鼠肾实质细胞中 Sirt1 和 AKT、Sirt1 和 p-FoxO3a 蛋白表达水平以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间均数比较采用 *t* 检验，多组间均数比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

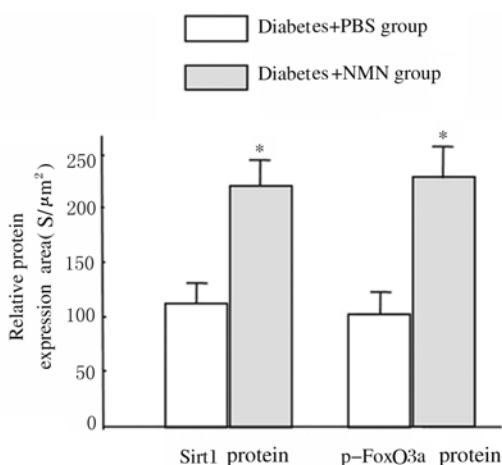
2.1 2 组大鼠肾实质细胞中 Sirt1 和 AKT 蛋白表达水平 免疫共聚焦检测结果显示：与糖尿病+PBS 组比较，糖尿病+NMN 组大鼠肾小球体积相对较小，细胞排列比较密集，且杂乱无章。糖尿病+NMN 组大鼠肾脏实质细胞中 Sirt1 (红色荧光) 表达水平明显高于糖尿病+PBS 组 ($P < 0.01$)，糖尿病+NMN 组大鼠肾实质细胞中 AKT (绿色荧光) 表达水平亦高于糖尿病+PBS 组 ($P < 0.01$)。见图 1 (插页二) 和 2。



* $P < 0.01$ compared with diabetes+PBS group.

图2 2组大鼠肾实质细胞中 Sirt1 和 AKT 蛋白表达水平
Fig. 2 Expression levels of Sirt1 and AKT proteins in renal parenchymal cells of rats in two groups

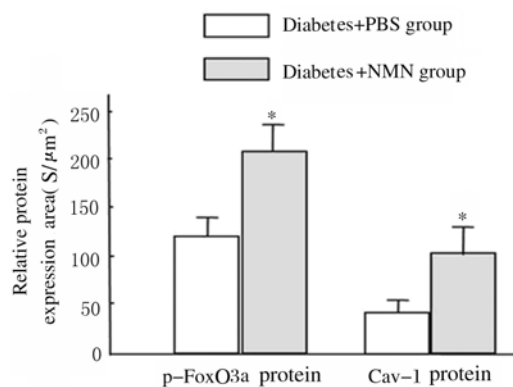
2.2 2组大鼠肾实质细胞中 Sirt1 和 p-FoxO3a 蛋白表达水平 与糖尿病+PBS组比较,糖尿病+NMN组大鼠肾实质细胞中 Sirt1 (红色荧光)蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$),且大鼠肾实质细胞中 p-FoxO3a 表达 (绿色荧光)水平亦明显升高 ($P < 0.01$)。免疫共聚焦检测结果显示:肾小管细胞中 p-FoxO3a 蛋白表达 (绿色荧光)在肾小管细胞中的分布多于肾小球细胞,说明肾小管细胞中 p-FoxO3a 蛋白表达多于肾小球细胞。见图3 (插图三)和4。



* $P < 0.01$ compared with diabetes+PBS group.

图4 2组大鼠肾实质细胞中 Sirt1 和 p-FoxO3a 蛋白表达水平
Fig. 4 Expression levels of Sirt1 and p-FoxO3a proteins in renal parenchymal cells of rats in two groups

2.3 2组大鼠肾实质细胞中 p-FoxO3a 和 Cav-1 蛋白表达水平 免疫共聚焦检测结果显示:与糖尿病+PBS组比较,糖尿病+NMN组大鼠肾小管和肾小球细胞中 p-FoxO3a 蛋白 (绿色荧光)表达水平明显升高 ($P < 0.01$),肾小管和肾小球细胞中 Cav-1 蛋白表达水平亦明显升高 ($P < 0.01$)。见图5 (插图三)和6。



* $P < 0.01$ compared with diabetes+PBS group.

图6 2组大鼠肾脏实质细胞中 p-FoxO3a 和 Cav-1 蛋白表达水平

Fig. 6 Expression levels of p-FoxO3a and Cav-1 proteins in renal parenchymal cells of rats in two groups

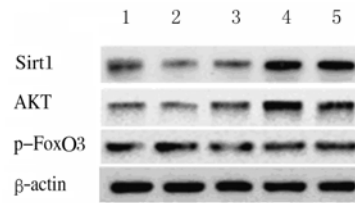
2.4 各组 HBZY-1 细胞中 SIRT1、AKT 和 p-FoxO3a 蛋白表达水平 Western blotting 检测结果显示:200 mmol·L⁻¹葡萄糖处理 HBZY-1 细胞 72 h 后,分别加入不同浓度 (0、50、100 和 200 μmol·L⁻¹)NMN 处理 24 h,与对照组 (未经 200 mmol·L⁻¹葡萄糖处理)比较,50 μmol·L⁻¹ NMN 组 HBZY-1 细胞中 Sirt1 和 AKT 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$),100 和 200 μmol·L⁻¹ NMN 组 HBZY-1 细胞中 Sirt1 和 AKT 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$)。与对照组比较,50 μmol·L⁻¹ NMN 组 HBZY-1 细胞中 p-FoxO3a 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$),但 100 和 200 μmol·L⁻¹ NMN 组 HBZY-1 细胞中 p-FoxO3a 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$)。见图7和8。

2.5 不同浓度葡萄糖培养的 HBZY-1 细胞中 AKT 和 Sirt1 蛋白表达水平 采用正常浓度葡萄糖 (5.6 mmol·L⁻¹) 和高浓度葡萄糖 (200 mmol·L⁻¹) 分别处理 HBZY-1 细胞,随后应用 NMN 分别干预 24 h。在正常葡萄糖浓度或高浓

度葡萄糖培养条件下, 细胞中 AKT 与 Sirt1 蛋白表达水平均较对照组 ($5.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖 + $0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NMN) 明显升高 ($P < 0.01$), 说明 NMN 在调节细胞表达内源性 AKT 与 Sirt1 过程中发挥重要作用。见图 9 和 10。

3 讨论

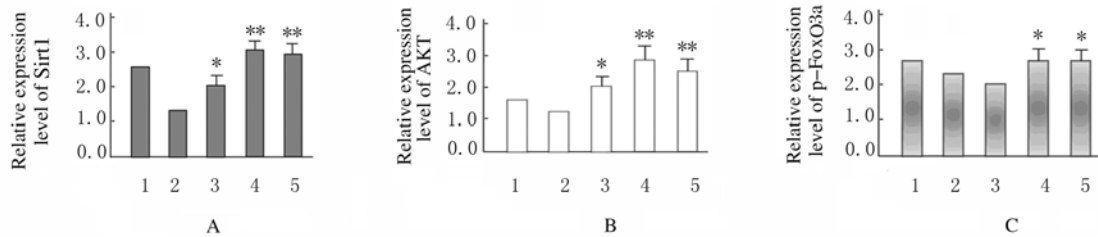
p-FoxO3a 蛋白在应对氧化应激时具有双重作用, 当细胞发生氧化应激时, 细胞处于胰岛素抵抗状态, 细胞中的 PI3K/AKT 信号传导途径受阻, 细胞质中大量 p-FoxO3a 蛋白集聚到细胞核, 参与



Lane 1: Control group; Lane 2-5: 50, 100, and 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NMN groups.

图 7 各组 HBZY-1 细胞中 Sirt1、AKT 和 p-FoxO3a 蛋白表达电泳图

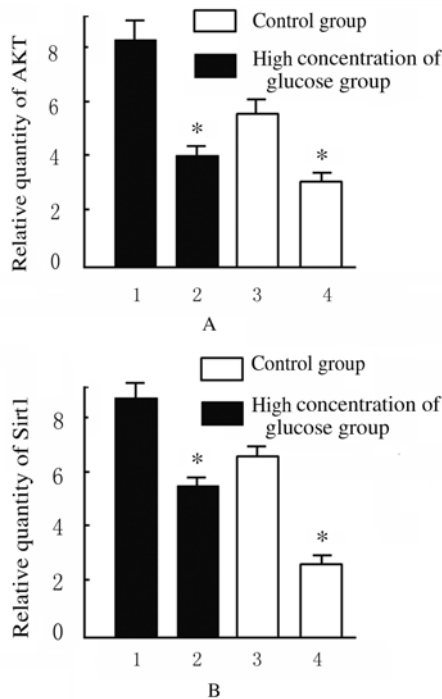
Fig. 7 Electrophoregram of expressions of Sirt1, AKT, and p-FoxO3a proteins in HBZY-1 cells in various groups



A: Sirt1; B: AKT; C: p-FoxO3a. 1: Control group; 2-5: 50, 100, and 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ groups. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group.

图 8 各组 HBZY-1 细胞中 Sirt1、AKT 和 p-FoxO3a 蛋白表达水平

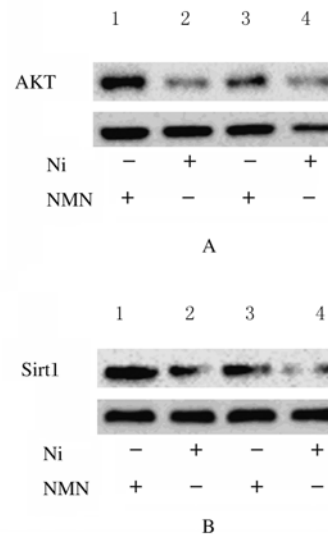
Fig. 8 Expression levels of Sirt1, AKT, and p-FoxO3a proteins in HBZY-1 cells in various groups



A: AKT; B: HBZY-1. 1, 2: Before NMN treatment; 3, 4: After NMN treatment; * $P < 0.01$ compared with control group.

图 9 对照组和高浓度葡萄糖组 HBZY-1 细胞中 AKT 和 Sirt1 蛋白表达水平

Fig. 9 Expression levels of AKT and Sirt1 proteins in HBZY-1 cells in control group and high concentrations of glucose group



Lane 1, 2: High concentration of glucose group; Lane 3, 4: Control group.

图 10 各组 HBZY-1 细胞中 AKT(A) 和 Sirt1(B) 蛋白表达电泳图

Fig. 10 Electrophoregram of expression levels of AKT(A) and Sirt1(B) proteins in HBZY-1 cells in various groups

诱导细胞凋亡^[7]。p-FoxO3a 蛋白是 AKT 分子下游能够启动自噬基因转录的主要分子, 其过度表达能够启动细胞自噬, 并且能够促使成纤维细胞分泌胶原明显减少, 从而改善细胞炎症-纤维化过程^[8-9]。有学者在基因序列分析时发现: Cav-1 启动子基因内包含了几个 p-FoxO3a 结合位点, 使 p-FoxO3a 牢固地绑定到 Cav-1 启动子区域, p-FoxO3a 转录表达增加了 Cav-1 mRNA 和蛋白表达。研究^[11]显示: 通过改变 AKT 通路能够使 p-FoxO3a 蛋白激活, 进而增强成纤维细胞自噬活性, 促进胶原蛋白降解, 可以促进肺部纤维化形成。而具有去乙酰化酶活性的沉默信息调节因子 Sirt1 能够使 p-FoxO3a 蛋白发生去乙酰化作用, 并促使其进入细胞核进而调节细胞生长阻滞。然而, 在氧化应激状态下, 随着 p-FoxO3a 蛋白去乙酰化作用增强, p27kip1、Bim 和 MnSOD 等基因表达水平升高, 从而降低细胞中的活性氧水平, 发挥抗凋亡作用。激活 AKT 轴能够通过抑制细胞自噬, 促进特发性肺纤维化的成纤维细胞维持胶原蛋白形成的病理状态^[12], 说明细胞凋亡是细胞纤维化形成的重要因素^[6,13-14]。但 p-FoxO3a 蛋白在 DN 肾脏纤维化方面的调控作用尚不清楚。本研究结果表明: 在机体处于糖尿病肾脏逐步纤维化过程中, 肾小球和肾小管细胞中内源性 Sirt1 和 AKT 蛋白表达水平均明显降低。本课题组应用 NAMPT 的代谢产物 NMN 通过负反馈调节, 在改善作为前炎症因子 NAMPT 表达的前提下, 试图提高 Sirt1 蛋白的表达和活性, 通过 Sirt1-p-FoxO3a 和 AKT-p-FoxO3a 对 DN 肾脏纤维化的相关基因发挥作用。本研究结果表明: SD 糖尿病大鼠在应用一定量 NMN 后, 肾小管和肾小球细胞中 Sirt1 和 AKT 蛋白表达水平均较未施加 NMN 的对照组明显升高。与此同时, 糖尿病 + NMN 组大鼠肾细胞中 p-FoxO3a 和 Cav-1 蛋白表达水平也明显高于对照组。体外实验中, 应用高浓度葡萄糖 (200 mmol · L⁻¹) 处理 HBZY-1 细胞后, 再应用不同浓度 NMN 处理, 细胞中 AKT 与 Sirt1 也均较未施加 NMN 组增加。本研究结果显示: 当 NMN 浓度达 100 μmol · L⁻¹ 时, Sirt1 与 AKT 蛋白表达水平均达到峰值, 且均明显高于对照组, 在相同高浓度葡萄糖浓度培养条件下, 当 NMN 浓度进一步加大到 200 μmol · L⁻¹ 时, 细胞中 Sirt1 与 AKT 蛋白表达水平均未见明显升高, 说明 NMN 能够使糖尿病状态下大鼠肾小球和肾小管细

胞中 Sirt1 与 AKT 蛋白表达水平升高, 即 NMN 能够在高浓度葡萄糖氧化应激状态下使 HBZY-1 细胞中 Sirt1 与 AKT 蛋白表达水平明显升高。在此过程中, 经 NMN 处理的细胞中 p-FoxO3a 和 Cav-1 蛋白表达水平也出现明显升高趋势。共聚焦显微镜下显示: 糖尿病大鼠肾小球明显变小, 且肾小球内细胞排列杂乱无章, 呈明显的纤维化状态, 但给予 NMN 后大鼠肾小球形状明显比未施加 NMN 时规整, 肾小球内细胞排列有序, 说明 NMN 通过增加肾脏细胞表达 Sirt1 与 AKT 蛋白, 间接激活了 p-FoxO3a 和 Cav-1 蛋白表达, 从而在一定条件下改善了 DN 肾脏炎症纤维化过程。本实验结果充分说明了 NMN 能够通过 Sirt1-p-FoxO3a 和 AKT-p-FoxO3a 对 DN 肾脏纤维化的相关基因发挥作用。NMN 既是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 前体物质, 又是 Nampt 合成的底物。在正常情况下, Nampt 是细胞合成 DNA 的关键限速酶^[15]。然而, 在机体处于氧化应激状态下, Nampt 能够作为前炎症因子激活典型的炎症通路因子转录因子 κB (NF-κB), 启动炎症-纤维化通路^[16-17]。离体实验^[18-19]结果表明: 在 200 mmol · L⁻¹ 葡萄糖氧化应激条件下, 50 μmol · L⁻¹ 以上 NMN 即能够通过负反馈抑制内源性 Nampt 表达, 同时在不影响 NAD⁺ 形成的基础上, 促进 Sirt1 和 AKT 蛋白表达水平升高^[18-19]。本研究结果提示: NMN 能够提高糖尿病大鼠肾小球细胞中内源性 Sirt1 与 AKT 的表达水平, 并改善 p-FoxO3a 蛋白的表达和磷酸化状态, 从而通过 Cav-1 改善肾脏细胞的炎症纤维化状态, 提示 NMN 及其类似物可能在预防和治疗 DN 肾小球纤维化中发挥作用。有研究^[20-21]进一步证明: 在 NMN 的作用过程中, Sirt1 蛋白能使 p-FoxO3a 的乙酰基迁移, 使 p-FoxO3a 蛋白发生去乙酰化反应, 从而上调 p-FoxO3a 蛋白与特定靶基因的 DNA 结合能力并增加其转录活性。Sirtuins 是一种 NAD⁺ 依赖性的去乙酰化酶, 即 Sirtuins 的去乙酰化反应需要氧化性的 NAD⁺ 参与^[22]。内源性 Sirt1 蛋白通过加强 p-FoxO3a 蛋白诱导细胞周期阻滞, 允许细胞具有更多时间来修复损伤的 DNA, 并消除自由基的危害^[23]。本研究结果显示: 在糖尿病大鼠肾脏实质细胞中, p-FoxO3a 蛋白能够同时受到 Sirt1 和 AKT 蛋白的共同调控, 这一结果提示 NMN 可能在 DN 肾小球炎症纤维化过程中发挥作用。

[参考文献]

- [1] Nho RS, Hergert P. FoxO3a and disease progression [J]. *World J Biol Chem*, 2014, 5 (3): 346-354.
- [2] van Grevenynghe J, Cubas RA, DaFonseca S, et al. FoxO3a: an integrator of immune dysfunction during HIV infection [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2012, 23 (4/5): 215-221.
- [3] Karadedou CT, Gomes AR, Chen J, et al. FOXO3a represses VEGF expression through FOXM1 dependent and independent mechanisms in breast cancer [J]. *Oncogene*, 2012, 31 (14): 1845-1858.
- [4] Zheng T, Lu Y. Changes in SIRT1 expression and its downstream pathways in age-related cataract in humans [J]. *Curr Eye Res*, 2011, 36 (5): 449-455.
- [5] Kim BC. FoxO3a mediates transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in FaO rat hepatoma cells [J]. *BMB Rep*, 2008, 41 (10): 728-732.
- [6] Ozaki I, Hamajima H, Matsuhashi S, et al. Regulation of TGF- β 1 induced Pro-apoptotic signaling by growth factor receptors and extracellular matrix receptor integrins in the liver [J]. *Front Physiol*, 2011, 2: 78.
- [7] Behzad H, Jamil S, Denny TA, et al. Cytokine-mediated FOXO3a phosphorylation suppresses FasL expression in hemopoietic cell lines: investigations of the role of Fasin apoptosis due to cytokine starvation [J]. *Cytokine*, 2007, 38 (2): 74-83.
- [8] Yoon HE, Kim SJ, Kim SJ, et al. Tempol attenuates renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction: the role of PI3K-Akt-FoxO3a signaling [J]. *J Korean Med Sci*, 2014, 29 (2): 230-237.
- [9] Im J, Hergert P, Nho RS. Reduced FoxO3a expression causes low autophagy in idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts on collagen matrices [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 309 (6): L552-L561.
- [10] Nho RS, Peterson M, Hergert P, et al. FoxO3a (Forkhead Box O3a) deficiency protects idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) fibroblasts from type I polymerized collagen matrix-induced apoptosis via caveolin-1 (cav-1) and Fas [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (4): e61017.
- [11] Zhang M, Lee SJ, An C, et al. Caveolin-1 mediates Fas-BID signaling in hyperoxia-induced apoptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50 (10): 1252-1262.
- [12] Chuang PY, Cai W, Li X, et al. Reduction in podocyte SIRT1 accelerates kidney injury in aging mice [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 313 (3): F621-F628.
- [13] Oellerich MF, Potente M. FOXOs and sirtuins in vascular growth, maintenance, and aging [J]. *Circ Res*, 2012, 110 (9): 1238-1251.
- [14] Yang C, Cao Y, Zhang Y, et al. Cyclic helix B peptide inhibits ischemia reperfusion-induced renal fibrosis via the PI3K/Akt/FoxO3a pathway [J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 355.
- [15] Yaku K, Okabe K, Nakagawa T. NAD metabolism: Implications in aging and longevity [J]. *Ageing Res Rev*, 2018, 47: 1-17.
- [16] Lu Q, Zhai Y, Cheng Q, et al. The Akt-FoxO3a-manganese superoxide dismutase pathway is involved in the regulation of oxidative stress in diabetic nephropathy [J]. *Exp Physiol*, 2013, 98 (8): 934-945.
- [17] Busso N, Karababa M, Nobile M, et al. Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin enzymatic activity identifies a new inflammatory pathway linked to NAD [J]. *PLoS One*, 2008, 3 (5): e2267.
- [18] Jin X, Wei Y, Xu F, et al. SIRT1 promotes formation of breast cancer through modulating Akt activity [J]. *J Cancer*, 2018, 9 (11): 2012-2023.
- [19] Sun W, Li Y, Wei S. miR-4262 regulates chondrocyte viability, apoptosis, autophagy by targeting SIRT1 and activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rats with osteoarthritis [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15 (1): 1119-1128.
- [20] Frazzi R, Valli R, Tamagnini I, et al. Resveratrol-mediated apoptosis of hodgkin lymphoma cells involves SIRT1 inhibition and FOXO3a hyperacetylation [J]. *Int J Cancer*, 2013, 132 (5): 1013-1021.
- [21] Lalmansingh AS, Karmakar S, Jin Y, et al. Multiple modes of chromatin remodeling by Forkhead box proteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1819 (7): 707-715.
- [22] Logan RW, Parekh PK, Kaplan GN. NAD⁺ cellular redox and SIRT1 regulate the diurnal rhythms of tyrosine hydroxylase and conditioned cocaine reward [J]. *Mol Psychiatry*, 2018, doi: 10. 1038/s41380-018-0061-1.
- [23] Hu Q, Wang G, Peng J, et al. Knockdown of SIRT1 suppresses bladder cancer cell proliferation and migration and induces cell cycle arrest and antioxidant response through FOXO3a-mediated pathways [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 3781904.