

过表达 Sirt1 对高糖诱导的人肾小球系膜细胞增殖与 TGF- β 1 表达的影响

王星云,朱 剑*,蒋兰兰,丁 波,马建华*

(南京医科大学附属南京医院内分泌科,江苏 南京 210012)

[摘要] 目的:探讨过表达沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, Sirt1)对高糖诱导的人肾小球系膜细胞增殖与转化生长因子- β 1(TGF- β 1)表达的影响。方法:体外培养人肾小球系膜细胞(HMC),利用 Sirt1 重组慢病毒载体感染细胞获得过表达 Sirt1 蛋白的人肾小球系膜细胞并分为 4 组:①NG+LV-CTL 组:正常葡萄糖(5.5 mmol/L)+空白对照慢病毒感染;②HG+LV-CTL 组:高糖(30 mmol/L)+空白对照慢病毒感染;③NG+LV-Sirt1 组:正常葡萄糖+Sirt1 慢病毒感染;④HG+LV-Sirt1 组:高糖+Sirt1 慢病毒感染;再设立 3 组未感染细胞作为对照,分别为:①NG 组(正常葡萄糖);②NM 组(正常糖+甘露醇组 24.5 mmol/L);③HG 组(高糖处理),培养不同时间后以 CCK-8 法检测细胞增殖情况;实时定 PCR 和 Western blot 法检测各组细胞 TGF- β 1 mRNA 和蛋白表达水平。结果:①通过重组慢病毒感染,嘌呤霉素筛选,获取稳定过表达 Sirt1 蛋白的人肾小球系膜细胞系;②与 NG 组相比较,各时间点 HG、HG+LV-CTL、HG+LV-Sirt1 组 CCK8 的吸光值均明显升高(P 均 < 0.01)。处理 24、48 h 后, HG+LV-Sirt1 组的吸光值明显低于 HG、HG+LV-CTL 组。③与 NG 组相比较, HG、HG+LV-CTL、HG+LV-Sirt1 组 TGF- β 1 mRNA 以及蛋白水平明显上调,差异均有显著性(P 均 < 0.01);HG+LV-Sirt1 组的 TGF- β 1 mRNA 以及蛋白水平明显低于 HG、HG+LV-CTL 组(P 均 < 0.01);而 NG、NM、NG+LV-CTL 及 NG+LV Sirt1 组间相比较,无统计学差异($P > 0.05$)。结论:过表达 Sirt1 能够抑制高糖诱导的人肾小球系膜细胞增殖与 TGF- β 1 表达, Sirt1 可能成为防治糖尿病肾病的作用靶点。

[关键词] 沉默信息调节因子 1;高糖;人肾小球系膜细胞;转化生长因子- β 1

[中图分类号] R587.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)04-480-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20150408

Effects of over-expressed Sirt1 on high glucose-induced proliferation and TGF- β 1 expression in human glomerular mesangial cells

Wang Xingyun, Zhu Jian*, Jiang Lanlan, Ding Bo, Ma Jianhua*

(Department of Endocrinology, Nanjing Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210012, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of silent information regulator 1(Sirt1) over-expression on high glucose-induced proliferation and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) expression in human glomerular mesangial cells (HMCs). **Methods:** HMCs were cultured *in vitro*. The HMCs were transfected with either lentiviral vectors containing the Sirt1 cDNA(LV-Sirt1) or empty vectors (LV-CTL). The expression of Sirt1 protein was detected by Western blot. Those HMCs transfected with lentiviral vectors were divided into 4 groups including normal glucose(5.5 mmol/L) plus LV-CTL(NG+LV-CTL), high glucose (30 mmol/L) plus LV-CTL(HG+LV-CTL), normal glucose plus LV-Sirt1(NG+LV-Sirt1), and high glucose plus LV-Sirt1(HG+LV-Sirt1) groups. Those untransfected HMCs were cultured at normal glucose (NG), normal glucose plus mannitol (5.5 mmol/L glucose + 24.5 mmol/L mannitol) (NM) or high glucose (30mmol/L) (HG) as control. After treatment for different periods, the cell proliferation of each group was examined using CCK-8 detection kit, and the levels of mRNA and protein of TGF- β 1 from each group were measured through real-time polymerase chain reaction (PCR) and Western blot, respectively. **Results:** The HMCs, which was stably over-expressed Sirt1 protein, was obtained after recombinant lentivirus infection and puromycin selection. Compared with the NG group, the proliferation levels of HMCs from the HG, HG+LV-CTL and HG+LV-Sirt1 groups on 12, 24 and 48 hours were increased significantly (each $P < 0.01$). However, the proliferation level of the HG+LV-Sirt1 group is significantly lower than that in the HG and HG+LV-CTL groups. As compared to counterparts of the HG and HG+LV-CTL groups, the levels of mRNA and protein of TGF- β 1 from the HG+LV Sirt1 group were decreased significantly

[基金项目] 国家自然科学基金(81100576);南京市卫生局杰出青年基金(JQX12006);南京市卫生青年人才培养工程基金(宁卫科[2011]42号)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: drzhujian@hotmail.com; Majianhua@china.com

(each $P < 0.01$). The levels of mRNA and protein of TGF- β 1 from the HG treated groups were higher than those of the NG group(each $P < 0.01$). In addition, there were no difference on the levels of mRNA and protein of TGF- β 1 among NG, NM, NG+LV-CTL and NG+LV Sirt1 groups (each $P > 0.05$). **Conclusion:** Sirt1 over-expression can inhibit cell proliferation and TGF- β 1 expression of HMCs induced by high glucose treatment. Sirt1 gene may become a new therapeutic target of diabetic nephropathy.

[Key words] Sirt1; high glucose; human glomerular mesangial cells; TGF- β 1

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(04):480-484, 509]

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最常见、最严重的微血管并发症,它是导致终末期肾衰竭(end-stage renal failure, ESRF)的首位原因^[1],然而,针对该疾病的临床治疗措施极为有限,缺乏针对性与有效性。因此寻求有效的糖尿病肾病的干预靶点,开发新的药物以延缓其进展具有重要意义。肾小球系膜细胞的增殖和肥大、细胞外基质蛋白(extracellular matrix, ECM)的过量积累是早期糖尿病肾病的病理特征。系膜细胞是肾小球内产生炎症因子与细胞外基质的主要固有细胞,其产生的转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)在 DN 肾小球病变过程中起重要作用^[2]。

沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, Sirt1)是迄今为止在哺乳动物细胞中发现的与沉默信息调节因子 2(Sir2)同源性最高的分子,是一种还原型辅酶 1 依赖的组蛋白脱乙酰基蛋白酶。它可以调节体内众多蛋白酶和转录因子的活性,从而调控机体的能量代谢、细胞衰老、细胞表型变化^[3]。早年研究认为白藜芦醇是 Sirt1 蛋白功能的激动剂,并具有延缓 DN 进展的作用^[4]。然而,近期的研究认为白藜芦醇并不是通过激活 Sirt1 的功能而发挥其肾脏保护作用^[5]。但是,上述的研究中并没有直接在细胞与动物水平过表达或敲除 Sirt1 基因,再观察高糖处理后的表型变化。因此,本研究拟在人肾小球系膜细胞上过表达 Sirt1 蛋白,并观察该细胞在高糖诱导下的增殖以及 TGF- β 1 的表达变化,为探讨 Sirt1 基因能否作为 DN 的干预靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人肾小球系膜细胞系(human mesangial cell line, HMC),为 T-SV40 及 H-ras 原癌基因转染的永生系,由英国伦敦皇家公立医院肾内科阮雄中博士惠赠、南京中大医院肾内科刘必成教授转赠。嘌呤霉素(上海吉凯),DMEM 低糖培养基(Gibco 公司,美国),10%胎牛血清(Hyclone 公司,美国),CCK-8 试剂盒(同仁,日本),TRIzol(Invitrogen 公司,美国),

定量 PCR 试剂盒(大连宝生物),兔抗 Sirt1 多克隆抗体、兔抗 TGF- β 1 多克隆抗体、小鼠抗 β -actin 单克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国),羊抗兔 IgG、羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥),ECL 显色剂(Pierce 公司,美国)。7500 型定量 PCR 仪(ABI 公司,美国),凝胶图像分析系统(Bio-Rad 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 过表达 Sirt1 的 HMC 稳定细胞系的建立

Sirt1 慢病毒载体以及对照慢病毒载体由上海吉凯基因化学技术有限公司构建、鉴定、纯化并进行滴度检测。HMC 细胞以 2×10^5 个/ml 密度接种于 12 孔板,细胞汇合度达到 40%~50%时加入不同的感染复数(MOI)重组慢病毒[表达框中未加入绿色荧光蛋白(GFP)],为直观地观察 HMC 的感染效率,设立同样 MOI 值的 GFP 重组慢病毒感染组,感染 3 d 后观察转染效率。细胞在加入重组慢病毒后 2~3 d 传代,细胞贴壁生长 1 d 后,加入嘌呤霉素继续培养 3 d,筛选多克隆稳定表达系。

1.2.2 实验分组

本研究中所涉及的细胞分为 3 种,即未感染的 HMC(HMC)、感染对照慢病毒的 HMC(HMC LV-CTL)及过表达 Sirt1 的 HMC(HMC LV-Sirt1),各种细胞分别置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱培养、传代,待细胞汇合度达 60%~70%时,撤血清并用含 0.1% 无脂肪酸 BSA 的低糖 DMEM 培养液继续培养 24 h,使细胞同步化。慢病毒感染的 HMC 分成 4 组即:① NG+LV-CTL 组:正常葡萄糖(5.5 mmol/L)+空白对照慢病毒感染;② HG+LV-CTL 组:高糖(30 mmol/L)+空白对照慢病毒感染;③ NG+LV-Sirt1 组:正常葡萄糖+Sirt1 慢病毒感染;④ HG+LV-Sirt1 组:高糖+Sirt1 慢病毒感染;再设立 3 组未感染细胞作为对照,分别为:① NG 组(正常葡萄糖);② NM 组(正常糖+甘露醇组 24.5 mmol/L);③ HG 组(高糖处理);各组细胞分别按实验要求培养不同时间。

1.2.3 细胞增殖分析

取对数生长期的细胞,以 0.5×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板各孔中,24 h 后撤血清继续培养 12 h,

使细胞生长同步化。每组设 6 个复孔,再分别以含低糖、低糖+甘露醇、高糖的培养液继续培养 12、24、48 h 后,每孔加入 CCK-8 工作液 10 μ l,继续培养 1 h 后,用酶标仪测定各孔在 450 nm 处的吸光度值。

1.2.4 实时定量 PCR 检测细胞 TGF- β 1 mRNA 转录水平

各组细胞处理 24 h 后,采用 TRIzol 按说明书步骤进行细胞 RNA 抽提。紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度,抽提合格的 mRNA 逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,应用 ABI7500 型定量 PCR 仪,通过 SYBR Green I 嵌合法进行定量检测。以 GAPDH 作为内对照,结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 理论值进行计算。每个样本设立 3 个复孔,重复 3 次。引物序列如下:TGF- β 1: 上游引物 5'-CTAATGGTGGAAACCCACAACG-3', 下游引物 5'-TATCGCCAGGAATTGTTGCTG-3'; GAPDH: 上游引物 5'-CTTTGGTATCGTGAAGGAC-TC-3', 下游引物 5'-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3'。PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火及延伸 34 s,总共 40 个循环。

1.2.5 Western blot 检测细胞 TGF- β 1 蛋白的表达

各组细胞处理 48 h 后,提取细胞总蛋白并测定浓度。取适量蛋白样品与等量样品处理液混匀,100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min,10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至 PVDF 膜上,TBST 封闭 1 h,置入一抗工作液中(稀释度 TGF- β 1 抗体:1:2 000, β -actin 抗体:1:4 000)4 $^{\circ}$ C 杂交过夜,TBST 洗膜后再与相对应的二抗(稀释度 1:2 000)室温下孵育 1 h,再次洗膜后加入 ECL 显色剂。用凝胶图像分析系统对条带进行灰度分析,以 TGF- β 1/ β -actin 光密度比值作为 TGF- β 1 蛋白的相对表达量。各组实验至少重复 3 次。

1.3 统计学方法

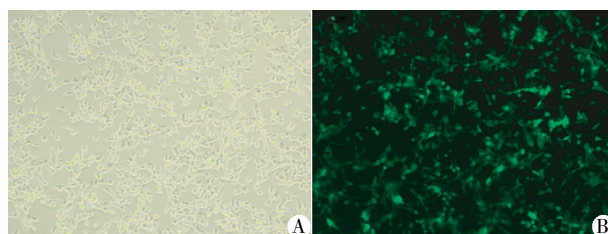
采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间均数比较采用 q 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 过表达 Sirt1 的 HMC 稳定细胞系的建立

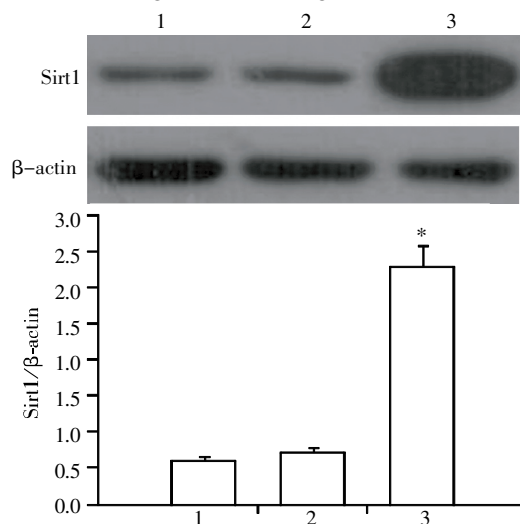
采用 1×10^8 TU/ml 的重组慢病毒感染 HMC,MOI=5 时,几乎所有的 GFP 重组慢病毒感染组细胞均表达绿色荧光蛋白(图 1),以 MOI=5 为实验条件,用 Sirt1 重组慢病毒、对照慢病毒分别感染 HMC 后,再以嘌呤霉素(终浓度 0.75 μ g/ml)筛选 3 d 后再传

代培养 3 代,检测各组细胞的 Sirt1 蛋白表达水平,Sirt1 重组慢病毒感染组细胞中的 Sirt1 蛋白表达水平显著上升,明显高于对照慢病毒感染组以及未感染组(图 2)。



A: 白光视野;B: 荧光视野。

图 1 重组慢病毒感染人肾小球系膜细胞的效率($\times 100$)
Figure 1 The infection efficiency of recombinant lentiviral on human glomerular mesangial cells($\times 100$)



1: 未感染重组慢病毒的人肾小球系膜细胞组(NG 组);2: 感染对照慢病毒的 HMC 细胞(NG+LV-CTL 组);3: 感染 Sirt1 重组慢病毒的 HMC 组(NG+LV-Sirt1 组)。与 NG 组和 NG+LV-CTL 组比较,* $P < 0.01$ 。

图 2 各组肾小球系膜细胞的 Sirt1 蛋白表达水平
Figure 2 The expression level of Sirt1 protein in human glomerular mesangial cells of each group

2.2 过表达 Sirt1 抑制高糖诱导的 HMC 增殖效应

同一时间点 NG、NM 与 NG+LV-CTL 组的吸光值无统计学差异,说明渗透压的改变和对照慢病毒的感染不足以影响系膜细胞的生长(表 1)。同一处理时间点 HG 组的吸光值明显高于 NG 以及 NM 组。同样,与 NG+LV-CTL 组相比较,同一时间点 HG+LV-CTL 组吸光值明显升高($P < 0.05$),差异具有统计学意义。与 NG+LV-Sirt1 组相比较,HG+LV-Sirt1 组处理 48 h 的吸光值明显升高, P 均 < 0.05 ,说明高糖可以明显促进肾小球系膜细胞增殖。HG+LV-CTL 组与 HG 组相比较,分别处理 12、24、48 h 时两组吸光值无明显差异,说明即使在高糖处理时,对照

慢病毒的感染对系膜细胞的生长也无明显影响。分别与 HG、HG+LV-CTL 组相比较,处理 24 h 以及 48 h 时,HG+LV-Sirt1 的吸光值均明显降低,差异具有统计学意义(P 均 < 0.01),提示过表达 Sirt1 可以抑制高糖诱导的肾小球细胞增殖效应。

表 1 各组肾小球系膜细胞的增殖情况

Table 1 The cell proliferation level of human glomerular mesangial cells in each group

| 组别 | 吸光值 | | |
|-------------|----------------|----------------------------|-----------------------------|
| | 12 h | 24 h | 48 h |
| NG | 0.613 ± 0.012 | 0.660 ± 0.016 | 0.750 ± 0.027 |
| NM | 0.615 ± 0.018 | 0.659 ± 0.017 | 0.754 ± 0.020 |
| HG | 0.633 ± 0.016* | 0.704 ± 0.018* | 0.813 ± 0.023* |
| NG+LV-CTL | 0.607 ± 0.016 | 0.652 ± 0.022 | 0.749 ± 0.019 |
| HG+LV-CTL | 0.632 ± 0.016# | 0.701 ± 0.029# | 0.808 ± 0.021# |
| NG+LV-Sirt1 | 0.607 ± 0.017 | 0.655 ± 0.017 | 0.726 ± 0.014 |
| HG+LV-Sirt1 | 0.618 ± 0.014 | 0.675 ± 0.026 [△] | 0.767 ± 0.025 ^{△△} |

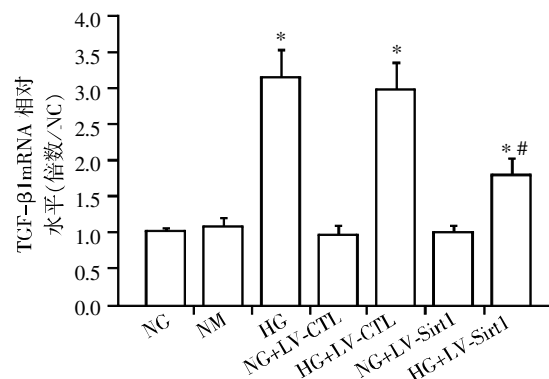
与同一处理时间点的 NG 组比较,* $P < 0.05$;与同一处理时间点 NG+LV-CTL 组比较 # $P < 0.05$;与 NG+LV-Sirt1 组比较,△ $P < 0.05$;与 HG 组和 HG+LV-CTL 组比较,△ $P < 0.05$ 。

2.3 过表达 Sirt1 对高糖诱导的 TGF-β1 mRNA 和蛋白表达的影响

TGF-β1 mRNA 水平在 NG、NM、NG+LV-CTL、NG+LV-Sirt1 组间无明显差异,而 HG、HG+LV-CTL 以及 HG+LV-Sirt1 组的 TGF-β1 mRNA 水平均明显于 NG 组, P 均 < 0.01 ,说明高糖可以显著上调系膜细胞内的 TGF-β1 转录水平。分别与 HG、HG+LV-CTL 相比较,HG+LV-Sirt1 组的 TGF-β1 mRNA 水平显著下降(P 均 < 0.01),差异具有统计学意义,说明过表达 Sirt1 可以抑制高糖对 TGF-β1 转录的诱导作用(图 3)。Western blot 检测各组间的 TGF-β1 蛋白表达水平,结果与定量 PCR 的检测结果相一致,过表达 Sirt1 可以明显下调高糖诱导的 TGF-β1 的表达(图 4)。

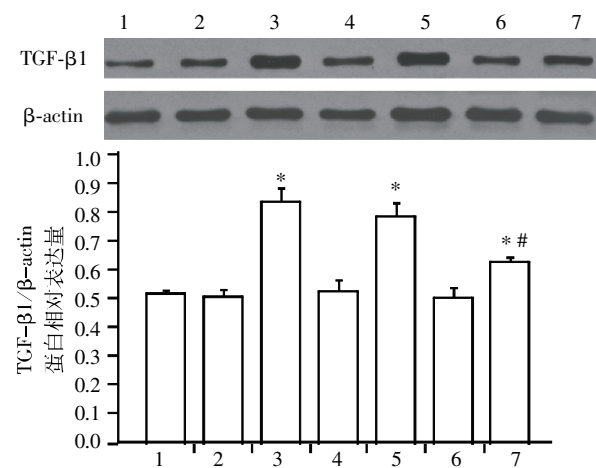
3 讨论

糖尿病肾病的基本病理改变包括肾小球肥大、ECM 产生增多和肾小球硬化,动物以及人体的研究证实肾小球系膜细胞表型改变即细胞增殖、肥大、ECM 产生以及异常细胞因子分泌是糖尿病肾病最突出的病理改变之一^[6]。系膜细胞增生是早期肾小球肥大的主要原因,也是随后进展为肾小球硬化及肾小管间质纤维化等不可逆结构改变的起点。肾小球系膜细胞不仅是 ECM 合成和降解的主要场所,也是多种细胞因子的主要生成细胞。在众多的细胞因



与 NG 组比较,* $P < 0.05$;与 HG 组和 HG+LV-CTL 组比较,# $P < 0.05$ 。实验重复 3 次,图中所示结果为其中 1 次代表性实验结果。
图 3 过表达 Sirt1 对高糖处理的肾小球系膜细胞 TGF-β1 转录的影响

Figure 3 Effects of over-expressed Sirt1 on high glucose induced TGF-β1 transcription in human glomerular mesangial cells



1:NG 组;2:NM 组;3:HG 组;4:NG+LV-CTL 组;5:HG+LV-CTL 组;6:NG+LV-Sirt1 组;7:HG+LV-Sirt1 组。与 NG 组比较,* $P < 0.05$;与 HG 和 HG+LV-CTL 组比较,# $P < 0.05$ 。

图 4 过表达 Sirt1 对高糖处理的肾小球系膜细胞 TGF-β1 表达的影响

Figure 4 Effects of over-expressed Sirt1 on high glucose induced TGF-β1 protein expression in human glomerular mesangial cells

子中,TGF-β1 尤为重要,它可以与系膜细胞上的高亲和性受体相结合,促进系膜细胞的增殖和 ECM 的分泌,在肾小球硬化的过程中起着十分重要的作用^[2]。因此,阻止系膜细胞表型变化对延缓 DN 发生发展具有重要意义。本实验结果显示,高糖能明显促进人肾小球系膜细胞增殖,上调 TGF-β1 mRNA 和蛋白的表达,与众多源自大、小鼠肾小球系膜细胞的实验结果相一致^[7-9]。此外,通过重组慢病毒感染技术,本研究在人肾小球系膜细胞上过表达 Sirt1,并且

观察到过表达 Sirt1 蛋白有效地抑制了高糖诱导的肾小球系膜细胞增殖以及 TGF- β 1 的转录与表达,提示上调 Sirt1 蛋白功能有可能延缓 DN 的发展。

高糖引起肾小球系膜细胞增殖,上调细胞因子、炎症因子表达的机制尚不十分明确,可能与糖基化终末产物的形成、活性氧簇和血管紧张素 II 的增高、己糖胺通路活化等有关。深入研究发现,JAK2/STATs、TGF- β 1-Smad、MAKK 等信号通路以及转录因子如 NF- κ B、FOXO1 的活化均参与了肾小球系膜细胞增殖、肥大以及异常细胞因子的分泌过程。Sirt1 是一种依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的组蛋白去乙酰化酶,与细胞衰老、氧化应激和能量代谢调节等多种功能活动有关。研究表明 SIRT1 可能通过去乙酰化作用调节体内众多蛋白酶如乙酰辅酶 A 合成酶 1、蛋白酪氨酸酶 1B 和转录因子如过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)- γ 、FOXO1、NF- κ B、Smad、STAT3 和 P53 等的活性,从而促进肝脏糖异生、脂质动员,发挥抗炎、阻止细胞表型转化的作用^[10-14]。因此,理论上 Sirt1 可作为 DN 治疗的潜在靶点。近年来的研究证实一种 Sirt1 蛋白功能的激动剂白藜芦醇具有抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞增殖以及 TGF- β 1 表达的作用^[15],动物实验亦证实了白藜芦醇延缓 DN 进展的有效性^[4-5],但是,在白藜芦醇保护效应的机制研究上存在争议,部分学者认为白藜芦醇并不是通过激活 Sirt1 的功能而发挥其肾脏保护作用。本研究直接在人肾小球细胞上过表达 Sirt1 蛋白来观察上调 Sirt1 蛋白功能对高糖诱导下的细胞增殖以及 TGF- β 1 表达的影响,直接证明了通过过表达 Sirt1 基因上调其功能可以有效地阻止高糖的诱导效应。最近的研究亦佐证了本研究的观点,Huang 等^[16]研究发现糖化终末产物可以通过下调 Sirt1 的功能而上调大鼠肾小球系膜细胞纤维连接蛋白(FN)与 TGF- β 1 的表达。杜月光等^[17]通过 RNA 干扰技术下调大鼠肾小球系膜细胞的 Sirt1 蛋白表达水平后,可以明显增强高糖处理后单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)、血管细胞粘附分子 1(VCAM-1)、TGF- β 1 转录与表达水平。

本研究尚有不足之处:①由于目前缺乏确凿有效的细胞内 Sirt1 活性的检测方法,无法检测高糖处理后以及过表达 Sirt1 蛋白后细胞内 Sirt1 活性的变化情况;②未进一步研究 Sirt1 阻止高糖诱导效应的分子机制。尽管如此,本研究仍直接证明了过表达 Sirt1 能够抑制高糖诱导的人肾小球系膜细胞增殖与 TGF- β 1 表达,提示 Sirt1 可能成为防治糖尿病肾病的作用靶点。

[参考文献]

- [1] Gray SP, Cooper ME. Diabetic nephropathy in 2010: Alleviating the burden of diabetic nephropathy[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(2): 71-73
- [2] Hills CE, Squires PE. TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and therapeutic intervention in diabetic nephropathy[J]. *Am J Nephrol*, 2010, 31(1): 68-74
- [3] Dong YJ, Liu N, Xiao Z, et al. Renal Protective Effect of Sirtuin 1[J]. *J Diabetes Res*, 2014, 2014: 843786
- [4] Ding DF, You N, Wu XM, et al. Resveratrol attenuates renal hypertrophy in early-stage diabetes by activating AMPK [J]. *Am J Nephrol*, 2010, 31(4): 363-374
- [5] Kitada M, Kume S, Imaizumi N, et al. Resveratrol improves oxidative stress and protects against diabetic nephropathy through normalization of Mn-SOD dysfunction in AMPK/SIRT1-independent pathway[J]. *Diabetes*. 2011, 60(2): 634-643
- [6] 刘志红, 陈朝红, 李颖健, 等. 2 型糖尿病肾病患者肾小球系膜细胞表型及功能改变[J]. *中华医学杂志*, 2001, 81(22): 1369-1373
- [7] Gu J, Ye S, Wang S, et al. Metformin inhibits nuclear factor- κ B activation and inflammatory cytokines expression induced by high glucose via adenosine monophosphate-activated protein kinase activation in rat glomerular mesangial cells in vitro[J]. *Chin Med J(Engl)*. 2014, 127(9): 1755-1760
- [8] Yin D, Yao W, Chen S, et al. Salidroside, the main active compound of *Rhodiola* plants, inhibits high glucose-induced mesangial cell proliferation [J]. *Planta Med*, 2009, 75(11): 1191-1195
- [9] Wang X, Shaw S, Amiri F, et al. Inhibition of the Jak/STAT signaling pathway prevents the high glucose-induced increase in tgf-beta and fibronectin synthesis in mesangial cells[J]. *Diabetes*, 2002, 51(12): 3505-3509
- [10] Herranz D, Serrano M. SIRT1: recent lessons from mouse models[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(12): 819-823
- [11] He W, Wang Y, Zhang MZ, et al. Sirt1 activation protects the mouse renal medulla from oxidative injury[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(4): 1056-1068
- [12] Susanti VY, Sasaki T, Yokota-Hashimoto H, et al. Sirt1 rescues the obesity induced by insulin-resistant constitutively-nuclear FoxO1 in POMC neurons of male mice[J]. *Obesity*, 2014, 22(10): 2115-2119
- [13] Bernier M, Paul RK, Martin-Montalvo A, et al. Negative regulation of STAT3 protein-mediated cellular respiration by SIRT1 protein[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(22): 19270-19279