

Sirt1活化剂对肾间质纤维化的保护作用及机制研究

杜春阳 王 珊 姜珊珊 马甜甜 李梦琳 任轲卓*

(河北医科大学病理系, 石家庄 050017)

摘要 研究Sirt1活化剂对单侧输尿管结扎导致的小鼠肾间质纤维化及TGF- β 1/CTGF信号通路的影响。CD-1小鼠随机分为假手术组(Sham)、单侧输尿管结扎组(unilateral ureteral obstruction, UUO)和UUO+SRT1720(Sirt1活化剂)组(SRT1720)。Masson染色后光镜下观察肾小管间质病变面积; 分别用Western blot和Real-time PCR检测Sirt1及纤维化相关因子Coll、 α -SMA、TIMP-1、PAI-1蛋白质和mRNA表达水平; TUNEL检测细胞凋亡程度, 同时检测凋亡相关因子Bcl-2/Bax的变化; 检测SOD、MDA、GPx、GSH水平以示氧化应激变化。与Sham组相比, UUO组显示肾间质纤维化病变面积显著升高($P<0.01$); Sirt1水平及活性显著下降; TGF- β 1/CTGF水平、纤维化相关因子表达及凋亡水平显著上升; 氧化应激水平显著升高($P<0.01$)。SRT1720干预能够显著降低UUO引起的肾间质纤维化病变面积($P<0.05$), 同时改善TGF- β 1/CTGF水平、纤维化相关因子及凋亡水平($P<0.01$), 显著降低肾脏氧化应激水平($P<0.01$)。以上说明, Sirt1活化剂SRT1720能显著改善肾间质纤维化水平, 该作用可能是通过TGF- β 1/CTGF信号通路的抑制和氧化应激实现的。

关键词 Sirt1活化; 氧化应激; TGF- β 1/CTGF; 凋亡; 纤维化

The Protective Role of Sirt1 Activator in Renal Tubulointerstitial Fibrosis and Its Mechanism

Du Chunyang, Wang Shan, Jiang Shanshan, Ma Tiantian, Li Menglin, Ren Yunzhuo*

(Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract This study was designed to investigate the effects of the Sirt1 activator, SRT1720, on unilateral ureteral obstruction (UUO)-induced tubulointerstitial fibrosis and whether this effects depended on inhibition of oxidative stress and activation of TGF- β 1/CTGF pathway in CD-1 mouse. Renal fibrosis was induced by UUO in CD-1 mice. The CD-1 mice were divided into Sham, UUO and SRT1720 groups. SRT1720 was administered. The change of histologic were examined by Masson's trichrome stain. The expression of fibrosis-related factors were evaluated by Western blot and Real-time PCR. Apoptosis was examined by TUNEL. The study also examined superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GPx) and reduced glutathione (GSH). SRT1720 increased Sirt1 levels and partially ameliorated renal interstitial fibrosis (RIF) and apoptosis induced by UUO. Furthermore, SRT1720 also attenuated the levels of oxidative stress, including SOD, MDA, GPx

收稿日期: 2015-05-05 接受日期: 2015-06-16

国家自然科学基金(批准号: 81200532)、河北省自然科学基金(批准号: H2012206132)、河北省首批青年拔尖人才项目和2014年度河北医科大学大学生创新实验项目资助的课题

*通讯作者。Tel: 0311-86265734, E-mail: renyunzhuo1978@163.com

Received: May 5, 2015 Accepted: June 16, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81200532), the Natural Science Foundation of Hebei Province (Grant No.H2012206132), the First Batch of Young Talent Support Program of Hebei Province and the 2014 College Student Innovation Experimental Project of Hebei Medical University

*Corresponding author. Tel: +86-311-86265734, E-mail: renyunzhuo1978@163.com

网络出版时间: 2015-08-21 15:54:15 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150821.1554.004.htm>

and GSH. Meanwhile, SRT1720 effectively inhibited TGF- β 1/CTGF induced by UUO. These findings indicated that the Sirt1 activator, SRT1720, had protective effects on UUO-induced tubulointerstitial fibrosis. The mechanism of role performed by SRT1720 may include, at least in part suppressing renal oxidative stress and the TGF- β 1/CTGF signalling pathway.

Keywords Sirt1 activator; oxidative stress; TGF- β 1/CTGF; apoptosis; fibrosis

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是各种慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)向终末期进展过程中的一种共同病理表现^[1]。RIF程度反映肾功能受损程度,与患者肾病的愈后密切相关。RIF转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)/结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是肾脏纤维化的关键调节因子。研究发现,活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)在纤维化发病中起着重要作用,在多种肾病中ROS积聚进而促进了肾纤维化^[2]。沉默信息调节因子1(silent information regulator type 1, Sirt1)是NAD⁺依赖性的脱乙酰基酶,在肾脏疾病的发病及相关紊乱的病理生理中起着一定的作用^[3]。

有研究报道, Sirt1激活剂白藜芦醇能够通过抑制TGF- β 1/smad3信号通路、氧化应激及stat3,减轻体内外肾纤维化进展^[4-7]。SRT1720是一种比白藜芦醇更有效的小分子Sirt1激活剂^[8]。关于SRT1720对单侧输尿管结扎的肾纤维化保护作用是否部分通过对TGF- β 1/CTGF、ROS的影响实现,目前未见报道。据此,本研究通过单侧输尿管结扎建立肾间质纤维化模型,观察Sirt1活化剂SRT1720对间质纤维化肾脏的保护作用及相关机制,为Sirt1作为多种肾脏疾病的潜在治疗靶分子提供动物实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性CD-1小鼠, 12周龄, 购自北京维通利华实验技术有限公司。SRT1720购自美国Selleck Chemicals公司。小鼠抗Sirt1单克隆抗体购自美国Abcam公司。兔抗TGF- β 1、CTGF、I型胶原(collagen I, Col1)、E-钙粘蛋白(E-cadherin, E-cad)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、组织基质金属蛋白酶抑制剂-1(tissue inhibitory of metalloproteinase-1, TIMP-1)、纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、B细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相

关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)及 β -actin多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司。Real-time PCR试剂和TUNEL试剂盒购自美国Promega公司。Sirt1活性检测试剂盒购自美国GENMED公司。辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠或兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立、分组及取材 实验动物随机分为3组: 假手术组(Sham, $n=8$), 单侧输尿管结扎组(UUO, $n=8$)和UUO+SRT1720(Sirt1活化剂)组(SRT1720, $n=8$)。UUO组小鼠于无菌条件下行左侧输尿管结扎术, 使左肾完全梗阻。sham组除不结扎外均与模型组相同。SRT1720组于术前3 d开始腹腔注射SRT1720(100 mg/kg·d), 至取材前。术后第7 d处死。切取左肾, 部分置于4%多聚甲醛固定, 进行光镜观察、免疫组织化学、TUNEL的测定; 另留取部分置于液氮中保存, 进行总蛋白质和总RNA的提取、测定。

1.2.2 Masson染色 常规Masson染色。应用HPIAS-2000影像分析软件分析纤维化范围, 结果以间质纤维化面积百分比表示^[9]。

1.2.3 末端脱氧核苷酸转移酶介导dUTP缺口标记法(TUNEL)检测细胞凋亡 TUNEL染色按试剂盒说明书操作, 苏木素复染细胞核。计数TUNEL阳性细胞, 凋亡程度以阳性细胞百分比表示。

1.2.4 Sirt1活性测定 提取核蛋白, 并按照GENMED细胞沉默调节蛋白(Sirt1)活性比色法定量检测试剂盒说明书操作。该试剂盒通过比色探针针对硝基苯胺标记人工合成的乙酰化p53多肽底物, 经过Sirt1脱乙酰基后, 被位点特异性氨基肽酶水解, 释放出具有强烈吸光值的黄色对硝基苯胺(波长405 nm), 即采用比色法来测定细胞裂解萃取样品中的酶活性。

1.2.5 Western blot检测蛋白质水平 加入组织蛋白裂解液, 研磨, 4 °C、12 000 r/min离心20 min, Lowry法测定上清液蛋白质浓度。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳后电转移至PVDF膜; 脱脂奶粉封闭2 h, 分别加入抗Sirt1、TGF- β 1、CTGF、Col1、E-cad、 α -SMA、TIMP-1、PAI-1、Bax、Bcl-2及 β -actin抗体, 4 °C过夜, 洗膜后加辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠或兔抗体(1:4 000稀释), 37 °C孵育2 h; 洗膜后加增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂, ODYSSEY远红外双色荧光成像系统显影(LI-COR Gene Company, USA)。用美国UVP公司LabWorks 4.5分析系统软件对Western blot条带进行定量分析。

1.2.6 荧光实时定量PCR(Real-time PCR)检测mRNA水平 Trizol法提取总RNA, 进行反转录。荧光实时定量PCR采用20 μ L反应体系, SYBR Premix Ex TaqTM II (2 $\times$) 10 μ L, ROX Reference Dye (50 $\times$) 0.4 μ L, 反转录产物2 μ L, 上下游引物(终浓度为1 ng/mL)各0.8 μ L, ddH₂O 6 μ L。反应条件为: 95 °C预变性30 s, 95 °C变性5 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共40个循环。根据比较法计算基因表达相对量, 采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因表达的相对倍数变化。

1.2.7 统计学处理 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS 13.0统计软件进行统计, 组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 Sirt1活化剂对UUO引起的小鼠肾间质纤维化的影响

在UUO组(梗阻肾), Sirt1蛋白质水平和活性较

假手术组显著下降, 而UUO+SRT1720组Sirt1蛋白水平和活性较UUO组均显著上升(图1)。Masson染色显示, UUO组术后7 d小管间质区病变面积较假手术组显著增加(图2A)。Western blot显示, 梗阻肾脏中Col1水平显著高于假手术组, Real-time PCR结果显示同样的趋势。SRT1720显著降低了间质纤维化面积(图2A)及Col1(图2D和图2E)的表达。

同时, 与假手术组相比, 在UUO组中TIMP-1、PAI-1及 α -SMA蛋白质及mRNA水平均显著上升, 而E-cad水平显著下降。SRT1720能够显著降低TIMP-1、PAI-1、 α -SMA表达, 增加E-cad水平(图2B~图2E)。

2.2 Sirt1活化剂对UUO组小鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响

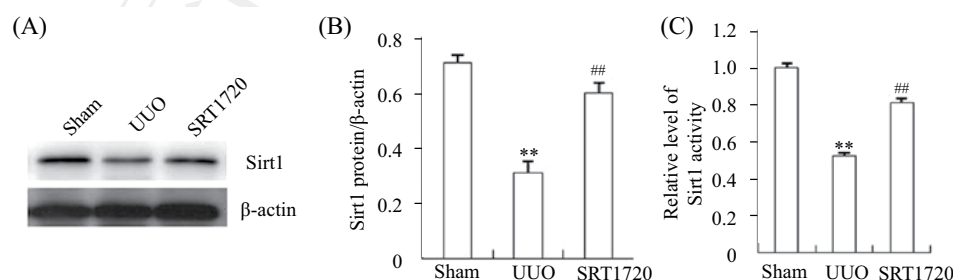
TUNEL法检测显示, UUO组肾小管上皮细胞凋亡显著增加, SRT1720则能改善UUO引起的肾小管上皮细胞凋亡(图3A和图3B)。此外, 与假手术组相比, SRT1720能够显著上调凋亡相关因子Bcl-2蛋白及mRNA的表达, 同时抑制了Bax蛋白及mRNA的高表达(图3C~图3E)。

2.3 Sirt1活化剂对TGF- β 1/CTGF信号通路表达的影响

TGF- β 1/CTGF信号通路在肾纤维化病理进展中发挥着重要作用。与假手术组相比, UUO组小鼠肾脏中TGF- β 1、CTGF蛋白质及mRNA水平均显著上升, SRT1720能够使TGF- β 1、CTGF蛋白质及mRNA这些物质上升水平得到控制, 从而抑制该信号通路(图4)。

2.4 Sirt1活化剂对UUO组小鼠肾氧化应激水平的影响

与假手术组相比, UUO组显示SOD和GPx活性

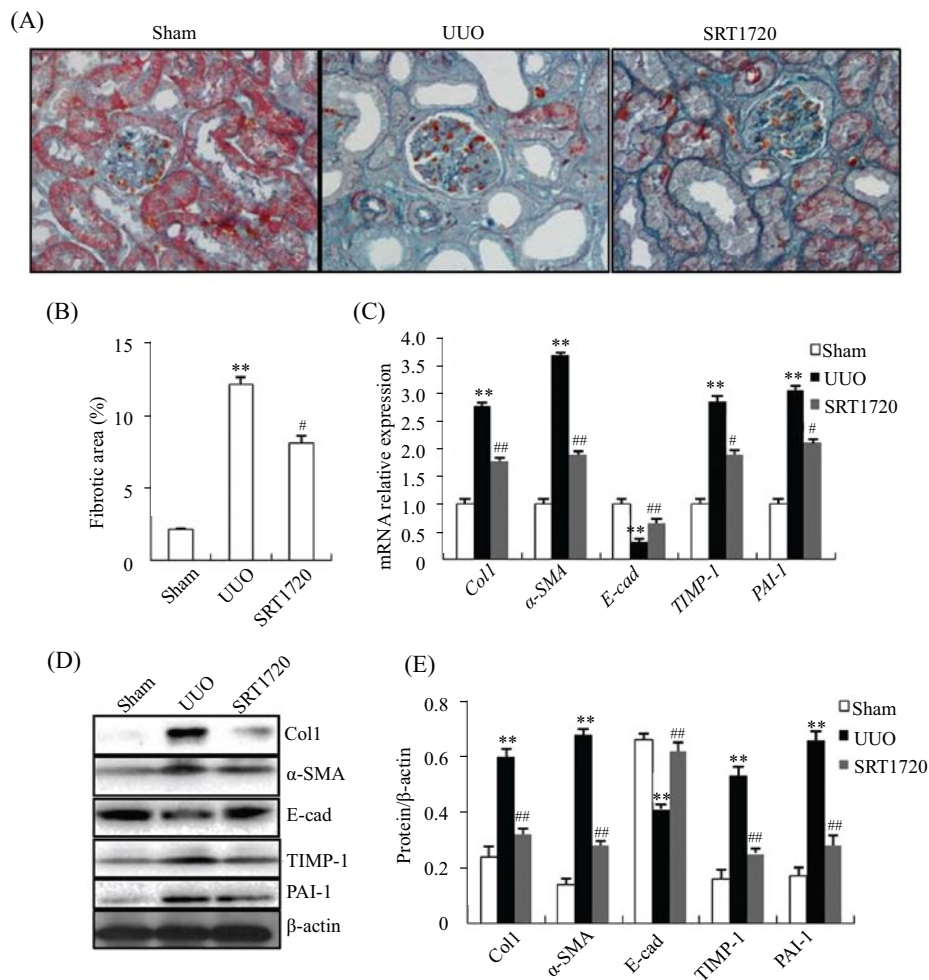


A、B: Western blot检测假手术组、UUO组和SRT1720组Sirt1蛋白表达情况; C: 假手术组、UUO组和SRT1720组Sirt1活性的变化情况。
** $P<0.01$, 与假手术组比较; ## $P<0.01$, 与UUO组比较。

A,B: expression of Sirt1 were detected by Western blot in the Sham, UUO and SRT1720 groups; C: the change of Sirt1 activity was detected in the Sham, UUO and SRT1720 groups. ** $P<0.01$ compared with sham group; ## $P<0.01$ compared with UUO group.

图1 SRT1720对UUO引起的Sirt1改变的影响

Fig.1 Effect of SRT1720 on the change of Sirt1 reduced by UUO



A: Masson染色检测各组肾脏胶原沉积的情况(200×); B: 假手术组、UUO组及SRT1720组间质纤维化面积百分比; C: Real-time PCR检测SRT1720对*Col1*、*α-SMA*、*PAI-1*、*TIMP-1* mRNA表达影响; D、E: Western blot检测SRT1720对*Col1*、*α-SMA*、*PAI-1*、*TIMP-1*和*E-cad*表达影响。 ** $P < 0.01$, 与假手术组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与UUO组比较。

A: deposition of collagen in different groups were detected by Masson's trichrome staining (200×); B: the percent areas of interstitial fibrosis in the Sham, UUO and SRT1720 groups; C: the effects of SRT1720 on the expression of *Col1*, *α-SMA*, *PAI-1*, *TIMP-1* mRNA were detected by Real-time PCR; D,E: the effects of SRT1720 on the expression of *Col1*, *α-SMA*, *PAI-1*, *TIMP-1* and *E-cad* were detected by Western blot. ** $P < 0.01$ compared with sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with UUO group.

图2 SRT1720对UUO引起的纤维化的影响

Fig.2 Effect of SRT1720 on UUO-induced fibrosis

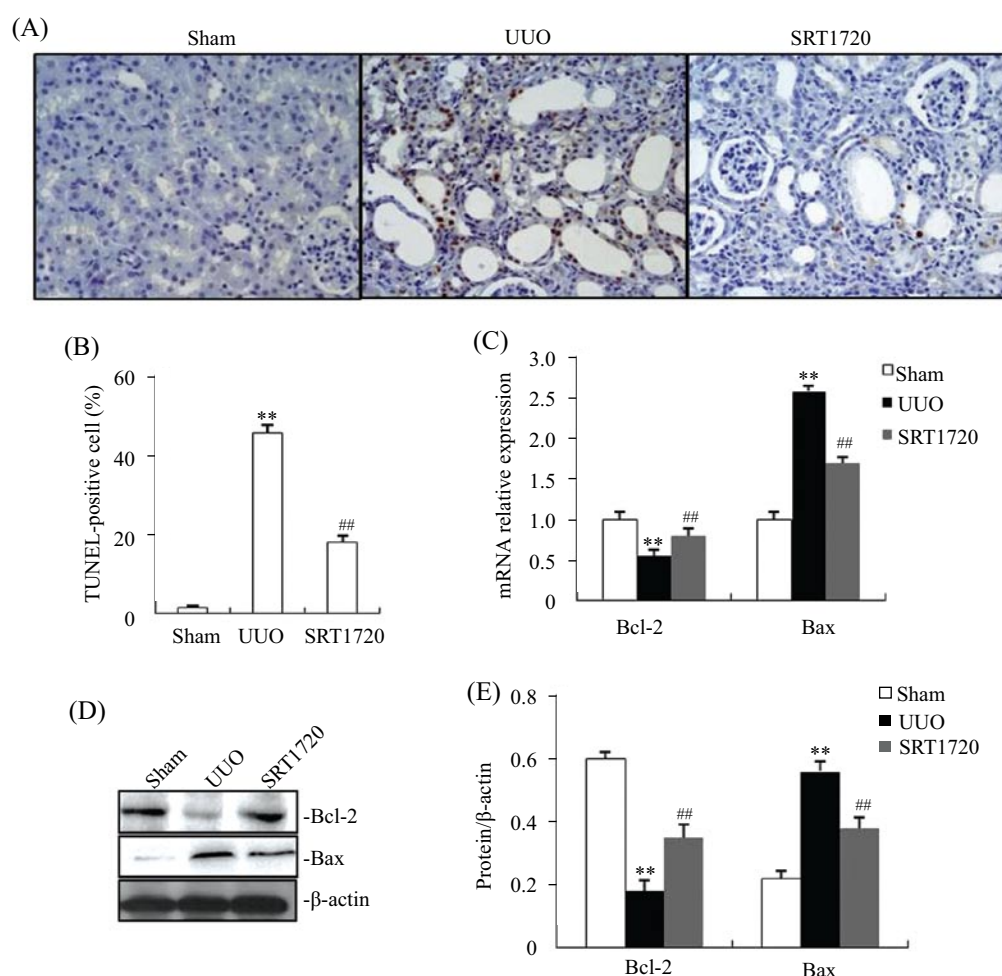
下降, GSH水平无明显变化; SRT1720组SOD、GPx和GSH水平显著增加。而促氧化应激标志物MDA在UUO组肾脏中表达明显上升。与UUO组相比, SRT1720组能够显著降低MDA水平(表1)。

3 讨论

肾间质纤维化, 无论源自炎症、免疫、梗阻或代谢性, 都将不可避免地走向肾功能衰竭的终末期肾病^[10]。因此, 调控纤维化进展对于预防和治疗慢性肾脏疾病有着重要的意义。本研究显示, Sirt1的缺乏加剧了肾小管上皮细胞凋亡和间质纤维化, 而Sirt1活化剂SRT1720能够保护肾脏在UUO状态下

免受损伤, 其可能的机制是通过部分抑制TGF-β1/CTGF信号通路及氧化应激实现的。

肾间质纤维化的病理表现为: 肾间质单核细胞、淋巴细胞的浸润, 引起炎症性反应, 肾小管足细胞受损, 表型转化、萎缩, 间质成纤维细胞活化增殖以及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积、瘢痕硬化形成。Col1属于间质胶原, 是纤维化形成中的重要细胞外基质成分。本研究Masson染色显示, UUO引起间质纤维化面积增加, Western blot及real time RT-PCR显示Col1蛋白质及mRNA水平显著升高。已知多种因子可影响纤维进程, 如TIMP-1、PAI-1。TIMP-1和PAI-1是ECM降解酶的抑制物。肾

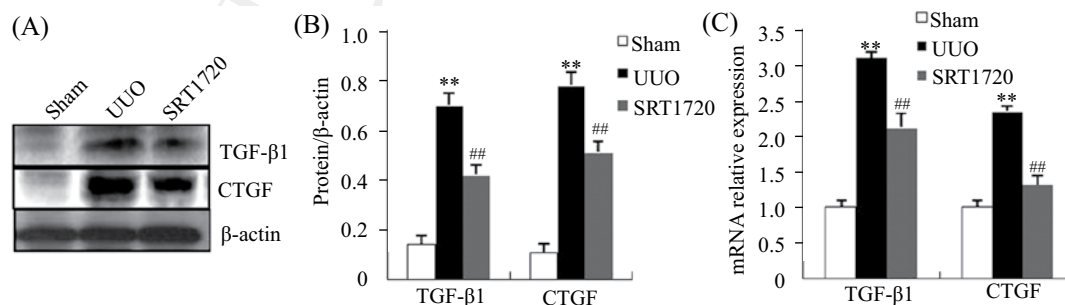


A: TUNEL检测各组肾脏小管上皮细胞凋亡情况(100×); B: 假手术组、UUO组及SRT1720组TUNEL阳性着色细胞百分比; C: Real-time PCR检测各组*Bcl-2*和*Bax* mRNA表达情况; D、E: Western blot检测各组*Bcl-2*和*Bax*的蛋白表达情况。** $P < 0.01$, 与假手术组比较; ## $P < 0.01$, 与UUO组比较。

A: apoptosis was detected by TUNEL in different groups (100×); B: the percentage of TUNEL-positive cells in Sham, UUO, SRT1720 groups; C: expression of *Bcl-2* and *Bax* mRNA were detected by Real-time PCR in different groups; D,E: expression of *Bcl-2* and *Bax* protein were detected by Western blot in different groups. ** $P < 0.01$ compared with Sham group; ## $P < 0.01$ compared with UUO group.

图3 SRT1720对UUO引起的凋亡的影响

Fig.3 Treatment with SRT1720 attenuated UUO-induced apoptosis



A、B: Western blot检测各组TGF-1和CTGF的蛋白表达情况; C: Real-time PCR 检测各组*TGF-1*和*CTGF* mRNA表达情况。** $P < 0.01$, 与假手术组比较; ## $P < 0.01$, 与UUO组比较。

A, B: expression of TGF-1 and CTGF were detected by Western blot in different groups; C: expression of *TGF-1* and *CTGF* mRNA were detected by Real-time PCR in different groups. ** $P < 0.01$ compared with Sham group; ## $P < 0.01$ compared with UUO group.

图4 SRT1720对TGF-β1/CTGF信号通路的影响

Fig.4 Effect of SRT1720 on TGF-β1/CTGF pathway

表1 不同组氧化应激结果分析

Table 1 The results of oxidative stress analysis in different groups

Parameters 参数	Unit 单位	Sham 假手术组	UUO 单侧输尿管结扎组	SRT1720 Sirt1活化剂组
MDA	nmol/mg protein	7.12±1.06 ^a	12.01±1.94 ^b	8.01±1.85 ^{c#}
SOD	U/mg protein	15.78±1.25 ^a	10.34±0.96 ^b	14.36±1.44 ^{c#}
GSH	Umol/mg protein	5.44±1.01 ^a	4.89±1.20 ^a	8.62±0.87 ^{b#}
GPx	mU/mg protein	378.34±28.25 ^a	257.75±40.66 ^b	409.30±41.74 ^{c#}

相同字母表示组间不存在显著性差异, 不同字母表示组间存在显著性差异。

Different letters represent significant differences between groups, while same letters represent there has no significant difference between groups.

小管上皮细胞转分化则会丢失上皮的标志, 比如E-cad, 并且同时会表达间质的标志, 如 α -SMA。本研究结果显示, UUO肾中TIMP-1、PAI-1、 α -SMA水平显著升高, 而E-cad水平下降, 提示UUO引起显著的肾间质纤维化。

越来越多的证据显示, Sirt在不同的肾脏疾病进展中起着重要的调节作用。研究表明, 在心衰、心肌纤维化、肝硬化和糖尿病肾病中Sirt1起着抗纤维化的作用^[11-12]。此外, 研究表明, 在内皮细胞、血管平滑肌细胞和支气管上皮细胞中, Sirt1和TGF- β 1有着密切的联系。Sirt1过表达能够显著改善TGF- β 1诱导的系膜细胞的细胞外基质合成^[6]。本研究发现, 在UUO梗阻小鼠肾脏中, Sirt1的表达及活性均显著下降, 而SRT1720能够增加Sirt1表达及活性, 同时与UUO组相比降低了TIMP-1、PAI-1、 α -SMA水平, 升高了E-cad水平, 改善肾间质纤维化程度。

本研究还发现, SRT1720能够有效减少UUO引起的肾小管上皮细胞凋亡百分比。Bcl-2和Bax分别是Bcl-2家族中最有代表性的抑制凋亡和促进凋亡基因。SRT1720能够显著改善UUO引起的Bcl-2的降低及Bax的升高。Sirt1对肾小管上皮细胞凋亡的保护作用也已经在多种器官和组织的损伤中有所报道, 如肝、肺、甲状腺、胰腺等。以上结果提示, Sirt1可能成为肾小管上皮细胞凋亡及肾纤维化治疗的分子靶标。

TGF- β 1是组织纤维化病变中最重要的促发因子之一, CTGF是TGF- β 1的下游信号分子, 明确介导TGF- β 1的促进细胞增生、ECM形成等多种作用。我们的研究结果提示, TGF- β 1/CTGF在UUO肾中表达显著增加。这一结果与在人、慢性肾脏疾病实验模型中有关纤维化的研究结果相一致^[13]。氧化应激破坏了活性氧簇产生和消除之间的平衡。本研究结

果显示, 在正常情况下, 肾脏表达低水平促氧化标志物MDA。足够的抗氧化酶(例如SOD、GPx)在保护肾脏免受氧化应激损伤中发挥着重要作用^[14]。结果显示, 与假手术组相比, UUO引起GPx和SOD的活性下降, 对GSH水平无明显影响。同时, MDA水平显著升高。以上结果表明, Sirt1活化剂SRT1720能够显著降低TGF- β 1/CTGF的水平, 同时改善了UUO引起的氧化应激。

综上所述, Sirt1活化剂SRT1720对UUO引起的肾小管间质纤维化的保护作用可能是部分通过抑制肾脏氧化应激和TGF- β 1/CTGF信号通路实现的。因此, 靶向Sirt1的药物活化剂或许能够起到保护肾脏功能的作用。此外, Sirt1是一种脱乙酰基酶, Sirt1能够逆转smad3、stat3乙酰化从而减轻体内外肾纤维化进展^[4-7], 在肾脏疾病的潜在治疗靶分子有很高的应用价值。

参考文献 (References)

- Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: A final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(1): 17-25.
- Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(6): 1503-20.
- Kim DH, Jung YJ, Lee JE, Lee AS, Kang KP, Lee S, *et al.* SIRT1 activation by resveratrol ameliorates cisplatin-induced renal injury through deacetylation of p53. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; 301(2): F427-35.
- Liang J, Tian S, Han J, Xiong P. Resveratrol as a therapeutic agent for renal fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *Ren Fail* 2014; 36(2): 285-91.
- Li J, Qu X, Ricardo SD, Bertram JF, Nikolic-Paterson DJ. Resveratrol inhibits renal fibrosis in the obstructed kidney: Potential role in deacetylation of Smad3. *Am J Pathol* 2010; 177(3): 1065-71.
- Huang XZ, Wen D, Zhang M, Xie Q, Ma L, Guan Y, *et al.* SIRT1 activation ameliorates renal fibrosis by inhibiting the TGF-beta/Smad3 pathway. *J Cell Biochem* 2014; 115(5): 996-1005.

- 7 Ni J, Shen Y, Wang Z, Shao DC, Liu J, Fu LJ, *et al.* Inhibition of STAT3 acetylation is associated with angiotensin renal fibrosis in the obstructed kidney. *Acta Pharmacol Sin* 2014; 35(8):1045-54.
- 8 Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, *et al.* Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 2007; 450(7170): 712-6.
- 9 Shimizu H, Maruyama S, Yuzawa Y, Kato T, Miki Y, Suzuki S, *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuated renal injury induced by protein-overload proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2002; 14(6): 1496-1505.
- 10 Bitzer M, Sterzel RB, Böttinger EP. Transforming growth factor-beta in renal disease. *Kidney Blood Press Res* 1998; 21(1): 1-12.
- 11 Costa dos S, Hammes TO RF, Rohden F, Margis R, Bortolotto JW, Padoin AV, *et al.* SIRT1 transcription is decreased in visceral adipose tissue of morbidly obese patients with severe hepatic steatosis. *Obes Surg* 2010; 20(5): 633-9.
- 12 Kitada M, Takeda A, Nagai T, Ito H, Kanasaki K, Koya D. Dietary restriction ameliorates diabetic nephropathy through anti-inflammatory effects and regulation of the autophagy via restoration of Sirt1 in diabetic Wistar fatty (fa/fa) rats: A model of type 2 diabetes. *Exp Diabetes Res* 2011; 2011: 908185.
- 13 Yokoi H, Sugawara A, Mukoyama M, Mori K, Makino H, Suganami T, *et al.* Role of connective tissue growth factor in profibrotic action of transforming growth factor-beta: A potential target for preventing renal fibrosis. *Am J Kidney Dis* 2001; 38(4 Suppl 1): S134-8.
- 14 Sunami R, Sugiyama H, Wang DH, Kobayashi M, Maeshima Y, Yamasaki Y, *et al.* Acatalasemia sensitizes renal tubular epithelial cells to apoptosis and exacerbates renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(6): F1030-8.