

CTRP3通过调节Sirt1参与高糖条件下 肾小管细胞的胆固醇转运

梁子辉¹ 朱艳² 任韞卓³ 吴明³ 韩伟霞³ 张国宇³ 胡越³ 杜春阳^{3*}

(¹河北医科大学, 外科总论与手术学教研室, 石家庄 050017; ²河北医科大学, 电镜实验中心, 石家庄 050017;

³河北医科大学, 病理学教研室, 石家庄 050017)

摘要 该文探究了C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白-3(C1q/TNF-related protein 3, CTRP3)在高糖条件下肾小管细胞胆固醇转运中的作用及机制。体外培养人肾小管上皮细胞HK-2, 随机分为正常糖对照组(NG)、正常糖+CTRP3干预组(NG+CT)、高糖培养组(HG)、高糖培养+CTRP3干预组(HG+CT)、高糖培养+CTRP3干预组+siRNA转染组(HG+CT+siRNA)和高糖培养+CTRP3干预组+Sirt1 siRNA转染组(HG+CT+siSirt1)。试剂盒检测细胞内胆固醇含量及胆固醇流出情况; Filipin染色观察细胞内胆固醇蓄积情况; 试剂盒检测Sirt1酶活性; Western blot检测CTRP3、Sirt1、ABCA1及LXR α 的蛋白表达; 实时定量PCR检测CTRP3的mRNA表达。结果显示, 重组CTRP3蛋白干预能够抑制高糖条件下HK-2细胞胆固醇蓄积, 上调ABCA1及LXR α 的表达从而促进胆固醇外流; 同时增强Sirt1的蛋白表达及活性; 应用Sirt1 siRNA抑制Sirt1的表达后CTRP3的上述调控作用均消失了。以上结果提示, CTRP3对高糖条件下的肾小管细胞的保护作用, 可能是部分通过调控Sirt1的表达促进高糖条件下肾小管细胞的胆固醇外流实现的。

关键词 C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白3; 沉默信息调节因子2相关酶1; 胆固醇; 肾小管细胞; 高糖

CTRP3 Mediates Cholesterol Transport in Renal Tubular Cells under High Glucose Condition by Regulating Sirt1

LIANG Zihui¹, ZHU Yan², REN Yunzhuo³, WU Ming³, HAN Weixia³, ZHANG Guoyu³, HU Yue³, DU Chunyang^{3*}

(¹Hebei Medical University, Department of General Theory of surgery and Surgical Science, Shijiazhuang, 050017, China;

²Hebei Medical University, Department of Electron Microscope, Shijiazhuang, 050017, China;

³Hebei Medical University, Department of Pathology, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract The purpose of this study is to investigate the role and molecular mechanisms of CTRP3 on cholesterol transport in renal tubular cells under high glucose condition. Cultured HK-2 cells were randomly divided into normal glucose group (NG), NG plus CTRP3 group (NG+CT), high glucose (HG), HG plus CTRP3 group (HG+CT), HG plus CTRP3 treatment plus siRNA transfection group (HG+CT+siRNA), HG plus CTRP3 treatment plus Sirt1 siRNA transfection group (HG+CT+siSirt1). Cholesterol content and efflux levels in different groups were detected using cholesterol detection kits according to instructions of the manufacturer, and cholesterol

收稿日期: 2019-06-05 接受日期: 2019-09-03

河北省教育厅重点研发计划项目(批准号: ZD2018007)、河北省重点研发计划项目(批准号: 18277748D)和河北医科大学大学生创新实验项目(批准号: USIP2018183、USIP2018151)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0311-86265724, E-mail: duchunyang55@163.com

Received: June 5, 2019

Accepted: September 3, 2019

This work was supported by the Education Department of Hebei Province (Grant No.ZD2018007), the Key Research and Development Projects of Hebei Province (Grant No.18277748D) and the College Student Innovation Experimental Project of Hebei Medical University (Grant No.USIP2018183, USIP2018151)

*Corresponding author. Tel: +86-311-86265724, E-mail: duchunyang55@163.com

网络出版时间: 2019-12-11 11:33:53

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191211.1133.040.html>

accumulation was detected by Filipin staining. The activity of Sirt1 enzyme was measured using commercial detection kit. Western blot was used to detect the protein expression of CTRP3, Sirt1, LXR α , and ABCA1 in HK-2 cells. The level of *CTRP3* mRNA was detected by Real-time PCR. Recombinant protein CTRP3 treatment significantly inhibited the HG-induced cholesterol accumulation and promoted the level of cholesterol efflux in HK-2 cells. In addition, down-regulation of CTRP3, Sirt1, LXR α , and ABCA1 protein expression and Sirt1 activity induced by HG were markedly prevented by treatment with recombinant protein CTRP3. After the application of Sirt1 siRNA to inhibit the expression of Sirt1, the above regulatory effects of CTRP3 on HK-2 cells disappeared. These findings indicated that CTRP3 had protective effects on HG-induced cholesterol accumulation in HK-2 cells. The mechanism of role performed by CTRP3 may include, at least in part regulating the expression of Sirt1 and promoting the cholesterol efflux.

Keywords CTRP3; Sirt1; cholesterol; renal tubular cells; high glucose

高血糖诱导的肾小管上皮细胞损伤在糖尿病性肾脏疾病(diabetic kidney disease, DKD)进展中发挥重要作用,其中胆固醇转运通路异常造成的胆固醇外流减少和细胞内胆固醇大量蓄积是高糖条件下肾细胞的主要病理表现之一,也是造成细胞凋亡和间质转化的重要原因^[1]。我们前期实验证实,高糖条件下培养的人肾小管HK-2细胞24 h即出现异常的胆固醇蓄积、胆固醇外流减少的现象^[2]。C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白-3(C1q/TNF-related protein 3, CTRP3)是一种脂肪细胞因子,在脂肪组织、软骨、心脏及肾脏等多种组织细胞表达。研究显示,2型糖尿病患者血浆中CTRP3的水平显著低于健康人群,进一步分析显示,血浆CTRP3与体重指数、腰围、空腹血糖等指标均呈显著负相关^[3]。动物实验中,重组CTRP3蛋白能够显著降低ob/ob肥胖小鼠的血糖水平;同时CTRP3呈浓度依赖性地增加脂肪细胞对葡萄糖的摄取,提高其糖代谢的能力^[4]。新近有研究显示,给予CTRP3转基因小鼠高脂饮食,其肝脏脂质沉积显著程度显著轻于野生型小鼠^[5]。肥胖小鼠腹腔注射CTRP3重组蛋白5天,其肝脏甘油三酯含量降低了43%,提示CTRP3可能是机体脂质代谢的关键调控点^[6];但CTRP3是否在糖尿病肾小管细胞胆固醇代谢中发挥作用还不清楚。

Sirt1(NAD-dependent deacetylase Sirtuin1)是组蛋白脱乙酰酶Sirtuins家族的重要成员,在细胞凋亡、能量代谢及纤维化过程中发挥重要作用^[7]。研究发现,Sirt1通过调节氧化应激、自噬、细胞凋亡和炎症等参与糖尿病肾病的发生发展^[8]。有意思的是,Sirt1作为CTRP3的下游效应分子参与了阿霉素诱导的心肌细胞炎症和细胞死亡^[9];而Sirt1激活剂E1231通过上调三磷酸腺苷结合区转运蛋白A1(ATP-bind-

ing cassette transporter 1, ABCA1)的表达促进胆固醇外流抑制动脉粥样硬化的进展^[10]。因此,本研究以体外高糖培养的人肾小管上皮细胞HK-2为研究对象,初步观察CTRP3对高糖条件下HK-2细胞胆固醇转运的影响,并进一步观察探讨Sirt1在其中所发挥的关键作用,为糖尿病肾病的治疗提供有效的药物靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

HK-2细胞株(人肾小管上皮细胞株)购自美国标准生物制品收藏中心。细胞常规培养采用含10%胎牛血清的DMEM-F12培养基,培养条件为37℃、含5% CO₂的细胞培养箱。DMEM-F12培养基购自美国Gibco公司。胎牛血清购自美国Hyclone公司。实验中所用到的抗体:兔抗CTRP3、Sirt1和 β -actin多克隆抗体及小鼠抗ABCA1多克隆抗体购自美国Abcam公司。兔抗LXR α 多克隆抗体购自美国signalway公司。重组CTRP3蛋白购自美国Aviscera Bioscience公司。Sirt1 siRNA购自广州锐博生物技术有限公司。Real-time PCR试剂由美国Promega公司提供。Filipin染色试剂盒由美国GenMed公司提供。细胞转染试剂脂质体2000购自Invitrogen公司。细胞内胆固醇检测试剂盒购自上海荣盛生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组及质粒转染 实验以HK-2细胞为研究对象,常规培养,待细胞达到75%左右的融合后,用无血清培养基同步24 h。实验细胞分为六组:正常糖对照组(5.5 mmol/L D-葡萄糖, NG)、正常糖+CTRP3干预组(5.5 mmol/L D-葡萄糖+3 mg/L CTRP3,

NG+CT)、高糖培养组(30 mmol/L D-葡萄糖, HG)、高糖培养+CTRP3干预组(30 mmol/L D-葡萄糖+3 mg/L CTRP3, HG+CT)、高糖培养+CTRP3干预组+siRNA转染组(30 mmol/L D-葡萄糖+3 mg/L CTRP3+siRNA, HG+CT+siRNA)和高糖培养+CTRP3干预组+Sirt1 siRNA转染组(30 mmol/L D-葡萄糖+3 mg/L CTRP3+Sirt1 siRNA, HG+CT+siSirt1)。Sirt1 siRNA及对对照siRNA的转染利用脂质体2000实现, 具体操作步骤按照试剂说明书进行。于刺激不同时间点收集细胞, 进行以下观察。

1.2.2 细胞内胆固醇含量测定 各组培养的细胞按照实验设计完成转染及干预后; 用预冷的生理盐水轻轻洗涤2次后收集细胞, 将氯仿与甲醇按照1:1的比例混合好, 取0.8 mL加入收集好的细胞中并充分研磨, 室温下振荡20 min, 低温离心机内12 000 r/min离心10 min, 取上清并加入1/5体积的生理盐水, 室温下(2 000 r/min)离心10 min, 吸出上清保留含有脂质的下层相。按照说明书分别测定各组细胞内的胆固醇含量。

1.2.3 Filipin染色 将HK-2细胞在干预前先接种于干净的盖玻片上, 按照实验设计分组转染并刺激细胞, 48 h后进行Filipin染色, 操作步骤同试剂盒说明书。主要步骤如下: 磷酸盐缓冲液PBS稍冲洗, 4%的多聚甲醛室温固定30 min, 后用Filipin染料对细胞进行染色(避光条件下染色1 h), PBS漂洗后封片, 荧光显微镜下照相。

1.2.4 胆固醇流出实验 采用Cholesterol Efflux Fluorometric Assay Kit(Biovision, K582-100)对细胞内的胆固醇流出率进行检测。简单步骤如下: 96孔酶标板上培养的细胞干预完成后, 弃去培养基, 用含有标记物的培养基孵育16 h, 后用无血清培养基清洗细胞, 加入含有HDL的诱导胆固醇外流液干预细胞。分别收集细胞上清及细胞的裂解液, 测定荧光强度。最终胆固醇流出率(%)=培养基荧光强度/(培养基+细胞)荧光强度。

1.2.5 Sirt1脱乙酰基酶活性测定实验 提取各组细胞的核蛋白, 后按照Sirt1活性检测试剂盒(美国GENMED公司)说明书步骤测定Sirt1的活性。基本原理为Sirt1对硝基苯胺标记人工合成的乙酰化p53多肽底物进行脱乙酰基处理后, 多肽底物进一步被位点特异性氨基肽酶水解, 释放对硝基苯胺, 在波长405 nm条件下观察吸光度值。

1.2.6 Western blot免疫印记检测 各组干预完成的细胞用预冷的PBS缓冲液冲洗2遍, 加入冰冷的细胞裂解液在冰上进行裂解, 后用细胞刮收集培养板内的所有细胞, 4 °C、12 000 r/min离心20 min, 采用考马斯亮蓝法测定各组细胞的蛋白浓度。取蛋白样品各50 μ g, 经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳后将蛋白转印至PVDF膜上; TBST缓冲液稍洗, 将PVDF膜放于5%脱脂奶粉(TBST配制)中37 °C封闭2 h, 分别加入CTRP3、Sirt1、ABCA1、LXR α 和 β -actin抗体, 4 °C冰箱过夜。用TBST缓冲液稀释(5 000:1)辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗抗体, 37 °C下孵育1.5 h; 将ECL发光液均匀滴在PVDF膜上反应1 min, 在Odyssey FC成像系统中显影并分析各蛋白条带的灰度值, 以各目的条带和 β -actin条带的比值作为统计结果。

1.2.7 Real-time PCR检测细胞内CTRP3的mRNA变化情况 Trizol法提取各组细胞总RNA后反转录呈cDNA。荧光实时定量PCR采用20 μ L反应体系, 将10 μ L的SYBR Premix Ex TaqTM II (2 $\times$)、0.4 μ L的ROX Reference Dye (50 $\times$)、2 μ L的反转录产物、6 μ L的ddH₂O和各0.8 μ L的上下游引物(终浓度为1 ng/mL)按次序混合均匀。Real-time PCR的反应条件为: 95 °C 预变性30 s, 95 °C 5 s $\rightarrow$ 55 °C 30 s $\rightarrow$ 72 °C 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 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算基因表达的相对倍数变化。

1.2.8 统计学处理 采用SPSS 17.0统计软件对各部分实验结果进行统计分析, 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间的比较采用单因素方差分析, 若 $P<0.05$ 判定为差异具有统计学意义。

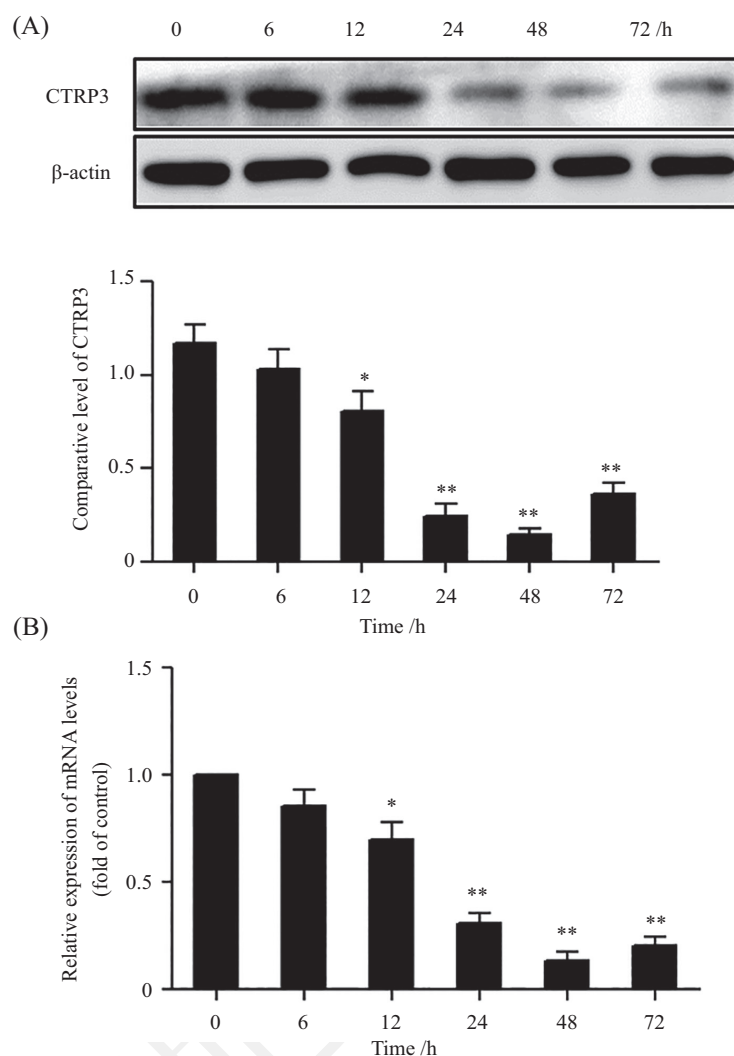
2 结果

2.1 高糖对HK-2细胞CTRP3表达的影响

Western blot结果(图1A)所示, 高糖(30 mmol/L)条件下, CTRP3的蛋白表达在HK-2细胞中明显降低, 6 h开始下降, 48 h表达最低, 呈现明显的时间依赖性; Real-time PCR结果(图1B)表明, CTRP3在高糖(30 mol/L)条件下的HK-2细胞中的mRNA表达趋势与蛋白相一致。

2.2 重组CTRP3蛋白干预对高糖条件下HK-2细胞胆固醇含量的影响

细胞内胆固醇含量测定结果显示, 重组CTRP3蛋白干预48 h明显减轻了高糖条件下HK-2细胞内的胆固醇含量, 其中CTRP3浓度为3 mg/L时, 减轻效果最显著(图2A); Filipin染色结果也进一步证实了



A: Western blot检测CTRP3蛋白表达情况; B: Real-time PCR检测CTRP3 mRNA表达情况。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与0 h相比。

A: the protein expression level of CTRP3 was analyzed by Western blot. B: the mRNA expression level of CTRP3 was analyzed by Real-time PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 h.

图1 高糖对HK-2细胞CTRP3表达的影响

Fig.1 Effect of high glucose on the expression of CTRP3 in HK-2 cells

3 mg/L的重组CTRP3蛋白能够显著抑制高糖条件下HK-2细胞内胆固醇沉积(图2B)。因此后续实验中重组CTRP3蛋白的浓度均为3 mg/L。

2.3 重组CTRP3蛋白干预对高糖条件下HK-2细胞胆固醇流出的影响

为了验证CTRP3减轻高糖条件下HK-2细胞内胆固醇含量是否通过促进细胞内胆固醇流出实现的,我们检测了细胞内胆固醇流出水平;与正常糖相比,高糖抑制了HK-2细胞的胆固醇流出;重组CTRP3蛋白干预恢复了HK-2细胞内胆固醇流出水平($P < 0.01$, 图3A)。Western blot结果显示,高糖条件下介导胆固醇流出的ABCA1和LXR α 的蛋白表达

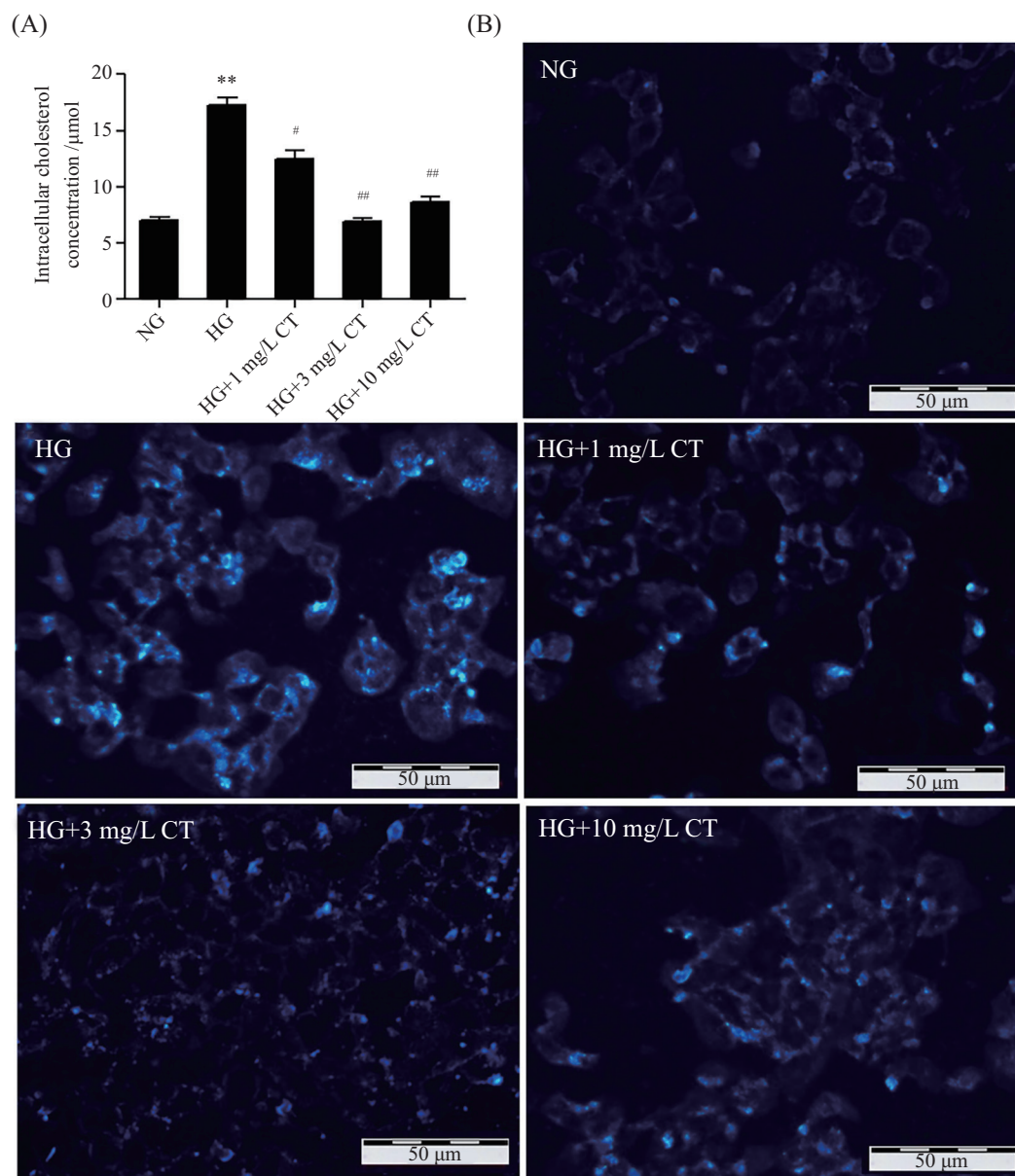
明显降低;重组CTRP3蛋白干预上调了ABCA1和LXR α 的蛋白表达($P < 0.01$, 图3B)。

2.4 重组CTRP3蛋白干预对高糖条件下HK-2细胞Sirt1表达及活性的影响

与正常糖相比, HK-2细胞内Sirt1蛋白表达在高糖条件下明显降低;重组CTRP3蛋白干预48 h显著上调了高糖条件下Sirt1的蛋白表达($P < 0.01$, 图4A)。进一步对Sirt1的活性检测发现,重组CTRP3蛋白干预能够逆转高糖对Sirt1活性的抑制作用($P < 0.01$, 图4B)。

2.5 重组CTRP3蛋白通过Sirt1途径参与高糖条件下HK-2细胞胆固醇流出

为了探讨Sirt1在CTRP3介导的高糖条件下HK-2



A: HK-2细胞胆固醇含量检测; B: Filipin染色检测HK-2细胞胆固醇沉积情况。 ** $P<0.01$, 与正常糖培养的HK-2细胞相比; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与高糖培养的HK-2细胞相比。

A: cholesterol levels in different group was detected by commercial kit. B: the accumulation of cholesterol in HK-2 cells was analyzed by Filipin staining. ** $P<0.01$ vs NG; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs HG.

图2 CTRP3对高糖条件下HK-2 细胞胆固醇含量的影响

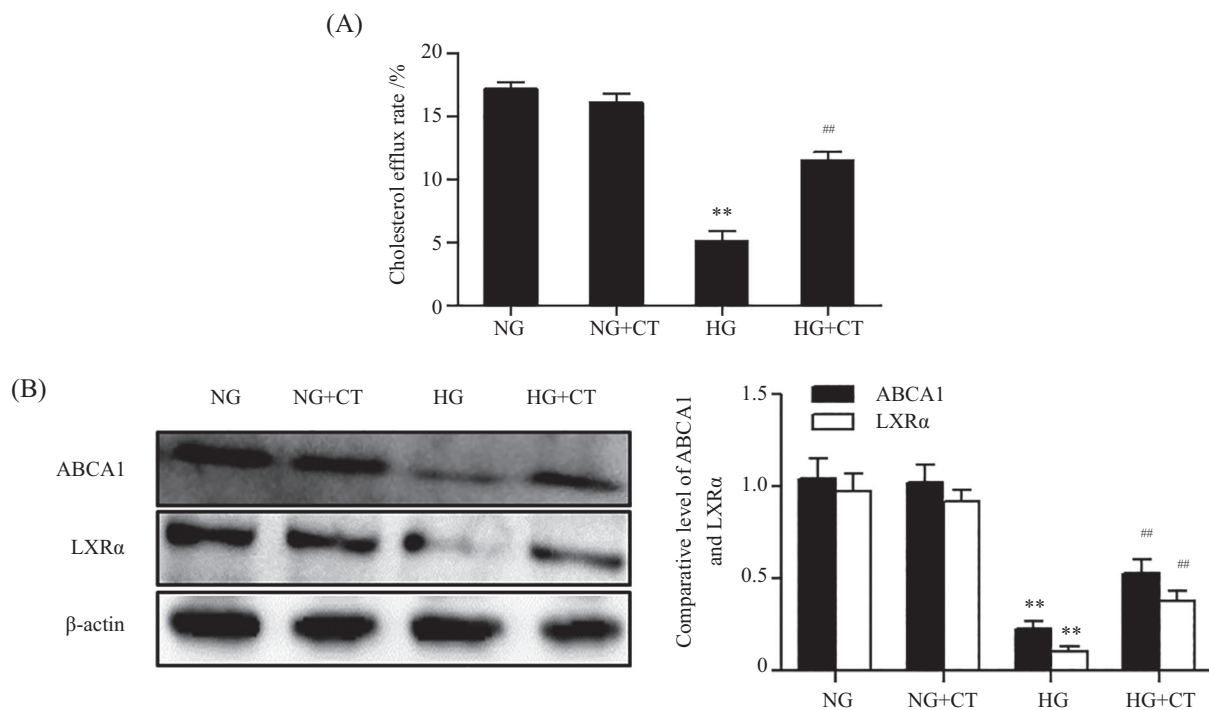
Fig.2 Effect of CTRP3 on cholesterol levels in high glucose cultured HK-2 cells

细胞胆固醇流出中的作用, 我们先将Sirt1的siRNA转染进HK-2细胞, 然后给予重组CTRP3蛋白干预, 观察细胞内胆固醇含量、胆固醇流出及ABCA1和LXR α 的蛋白表达情况。结果显示, 应用Sirt1的siRNA抑制Sirt1的表达后, CTRP3减少高糖条件下HK-2细胞胆固醇含量、促进胆固醇流出及上调ABCA1和LXR α 的蛋白表达的作用均受到了明显的抑制, 提示重组CTRP3蛋白通过Sirt1途径上调ABCA1和LXR α 的表

达, 促进了胆固醇流出而抑制了高糖条件下HK-2细胞的胆固醇蓄积($P<0.01$, 图5)。

3 讨论

DKD是终末期肾脏病的重要原因之一, 其中高血糖诱导的肾小管上皮细胞损伤在DKD进展中发挥重要作用。既往研究显示, 胆固醇转运通路异常造成的胆固醇外流减少和细胞内胆固醇大量蓄积是

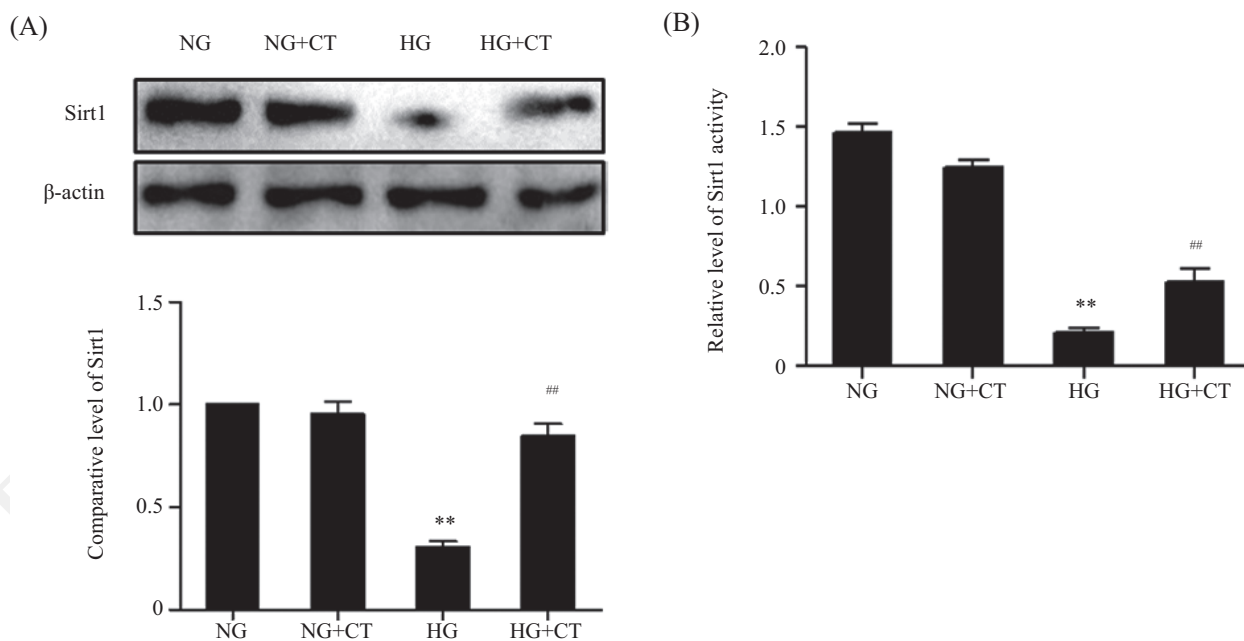


A: 各组HK-2细胞胆固醇流出水平检测; B: Western blot检测高糖条件下HK-2细胞ABCA1和LXRα的表达情况。** $P < 0.01$, 与正常糖培养的HK-2细胞相比; ## $P < 0.01$, 与高糖培养的HK-2细胞相比。

A: cholesterol efflux in different group was detected by commercial kit. B: the expression of ABCA1 and LXRα in HK-2 cells was analyzed by Western blot. ** $P < 0.01$ vs NG; ## $P < 0.01$ vs HG.

图3 CTRP3对高糖条件下HK-2细胞胆固醇流出水平及ABCA1和LXRα表达的影响

Fig.3 Effect of CTRP3 on cholesterol efflux rate and the expression of ABCA1 and LXRα in high glucose cultured HK-2 cells

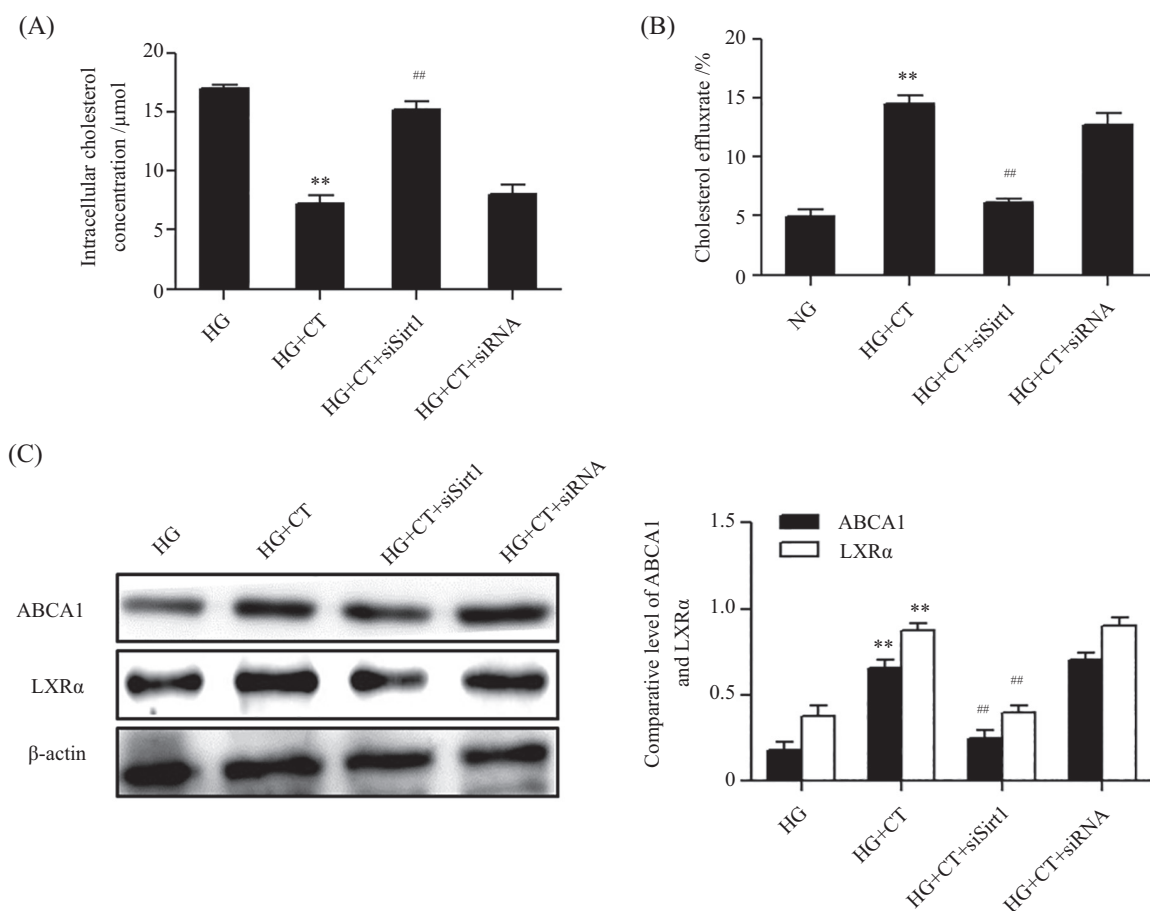


A: Western blot检测高糖条件下HK-2细胞Sirt1的蛋白表达情况; B: Sirt1活性检测。** $P < 0.01$, 与正常糖培养的HK-2细胞相比; ## $P < 0.01$, 与高糖培养的HK-2细胞相比。

A: the protein expression of Sirt1 in HK-2 cells was analyzed by Western blot; B: Sirt1 activity in different group of HK-2 cells was analyzed by commercial kit. ** $P < 0.01$ vs NG; ## $P < 0.01$ vs HG.

图4 CTRP3对高糖条件下HK-2细胞Sirt1表达及活性的影响

Fig.4 Effect of CTRP3 on expression and activity of Sirt1 in high glucose cultured HK-2 cells



A: 各组HK-2细胞胆固醇含量检测; B: HK-2细胞胆固醇流出水平检测; C: Western blot检测高糖条件下HK-2细胞ABCA1和LXRα的表达情况。
 ** $P < 0.01$, 与高糖培养的HK-2细胞相比; ## $P < 0.01$, 与高糖条件下CTRP3干预的HK-2细胞相比。

A: cholesterol levels in different group was detected by commercial kit. B: cholesterol efflux in in different group was detected by commercial kit. C: the expression of ABCA1 and LXRα in HK-2 cells was analyzed by Western blot. ** $P < 0.01$ vs HG; ## $P < 0.01$ vs HG+CT.

图5 Sirt1对CTRP3介导的HK-2细胞胆固醇流出的影响

Fig.5 Effect of Sirt1 on cholesterol efflux mediated by CTRP3 in HK-2 cells under the condition of high glucose

高糖条件下肾细胞的主要病理表现之一,也是造成细胞发生凋亡和间质转化的重要原因^[1]。我们前期实验证实,高糖条件下培养的人肾小管HK-2细胞24 h即出现异常的胆固醇蓄积,胆固醇外流减少^[2]。ABCA1是促进细胞内游离胆固醇和磷脂流出胞外的重要膜整合蛋白,而肝X受体α(liver X Receptor α, LXRα)是调控ABCA1表达的上游基因;其二者稳定表达对于维持外周细胞内胆固醇平衡至关重要^[11-12]。本研究中高糖刺激HK-2细胞48 h后细胞内胆固醇外流明显减少伴细胞内胆固醇蓄积,同时LXRα和ABCA1的蛋白表达下调。因此,探究高糖情况下LXRα和ABCA1表达下调的机制对于防治糖尿病肾组织胆固醇蓄积具有重要意义。

CTRP3是一种高度保守的脂肪细胞因子,其基因定位于5p13.2-13.1,包含6个外显子和5个内含

子。既往的研究显示,CTRP3在调节组织细胞的糖代谢方面发挥着重要作用。CTRP3在2型糖尿病患者血浆中的水平显著低于健康人群,进一步分析显示,血浆CTRP3水平与糖尿病患者的体重指数、腰围、空腹血糖等指标均呈显著负相关^[3]。动物实验中,CTRP3通过激活蛋白激酶B(protein kinase B, PKB)并进一步抑制葡萄糖-6-磷酸酶和磷酸烯醇丙酮酸羧基酶的表达限制细胞糖异生,发挥降糖作用^[13]。新近有课题组给予CTRP3转基因小鼠高脂饮食后发现,小鼠肝脏脂质沉积程度显著轻于野生型小鼠^[5]。肥胖小鼠腹腔注射CTRP3重组蛋白5天,其肝脏甘油三酯含量降低了43%,提示CTRP3可能是机体脂质代谢的关键调控点^[6]。但CTRP3在胆固醇代谢尤其是胆固醇流出中是否同样具有调节作用还不清楚。本研究采用重组CTRP3蛋白干预体外高糖培养的人肾小管HK-2细

胞发现,CTRP3能够有效地抑制细胞内胆固醇含量,促进胆固醇外流,同时上调LXR α 和ABCA1的蛋白表达。本研究结果提示,CTRP3参与了高糖条件下肾小管细胞的胆固醇转运过程,但具体机制如何呢?

Sirt1是组蛋白去乙酰化酶家族成员之一,参与机体组织细胞增殖、凋亡、氧化应激、胰岛素分泌和葡萄糖合成等生理活动,而这些生理活动与糖尿病、心血管疾病、代谢综合症、炎症和衰老等密切相关。研究发现,Sirt1在胆固醇代谢过程中有重要作用。Sirt1激活剂E1231通过上调ABCA1的表达促进胆固醇外流抑制动脉粥样硬化的进展^[10]。而中药姜黄素通过激活AMPK-SIRT1-LXR α 信号途径上调ABCA1的蛋白表达,促进了THP-1源性泡沫细胞内的胆固醇外流,改善了动脉粥样硬化^[14]。有意思的是,Sirt1作为CTRP3的下游效应分子参与了阿霉素诱导的心肌细胞炎症和细胞死亡^[9]。我们在本研究中也观察了CTRP3和Sirt1的作用关系,重组CTRP3蛋白干预抑制了高糖诱导的Sirt1蛋白表达和活性的降低。为了进一步探讨Sirt1在CTRP3参与高糖条件下肾小管细胞胆固醇转运中的作用,我们应用Sirt1 siRNA抑制Sirt1的表达后给予高糖培养的HK-2细胞重组CTRP3蛋白干预发现:抑制Sirt1的表达后,CTRP3对于高糖条件下HK-2细胞胆固醇流出的促进作用及LXR α 和ABCA1蛋白的上调作用均不能发挥。以上结果说明,CTRP3参与高糖条件下肾小管细胞的胆固醇转运过程是通过调控Sirt1的表达和活性实现的。

综上所述,我们的研究表明,CTRP3对高糖条件下的肾小管细胞具有保护作用,其机制可能是部分通过调控Sirt1-LXR α -ABCA1的表达促进高糖条件下肾小管细胞的胆固醇外流、抑制肾小管细胞的胆固醇蓄积实现的。

参考文献 (References)

- 1 Merscher-Gomez S, Guzman J, Pedigo CE, Lehto M, Aguillon-Prada R, Mendez A, *et al.* Cyclodextrin protects podocytes in diabetic kidney disease. *Diabetes* 2013; 62(11): 3817-27.
- 2 杜春阳, 史永红, 朱艳, 任韞卓, 吴海江, 韦金英, 等. 高糖对肾小管细胞胆固醇转运的影响及花青素的干预研究. *中国药理学通报* (Du Chunyang, Shi Yonghong, Zhu Yan, Ren Yunzhuo, Wu Haijiang, Wei Jinying, *et al.* Effect of high glucose on cholesterol efflux in renal tubular cell and intervention of anthocyanins. *Chinese Pharmacological Bulletin*) 2016;32(1): 114-8.
- 3 Moradi N, Fadaei R, Khamseh ME, Nobakht A, Rezaei MJ, Aliakbary F, *et al.* Serum levels of CTRP3 in diabetic nephropathy and its relationship with insulin resistance and kidney function. *PLoS One* 2019; 14(4): e0215617.
- 4 Peterson JM, Wei Z, Wong GW. C1q/TNF-related protein-3 (CTRP3), a novel adipokine that regulates hepatic glucose output. *J Biol Chem* 2010; 285(51): 39691-701.
- 5 Peterson JM, Seldin MM, Wei Z, Aja S, Wong GW. CTRP3 attenuates diet-induced hepatic steatosis by regulating triglyceride metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013; 305(3): G214-24.
- 6 Trogen G, Bacon J, Li Y, Wright GL, Degroot A, Hagood KL, *et al.* Transgenic overexpression of CTRP3 prevents alcohol-induced hepatic triglyceride accumulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2018; 315(5): E949-60.
- 7 杜春阳, 王珊, 姜珊珊, 马甜甜, 李梦琳, 任韞卓. Sirt1活化剂对肾间质纤维化的保护作用及机制研究. *中国细胞生物学学报* (Du Chunyang, Wang Shan, Jiang Shanshan, Ma Tiantian, Li Menglin, Ren Yunzhuo. The protective role of Sirt1 activator in renal tubulointerstitial fibrosis and its mechanism. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(8): 1115-21.
- 8 Hong Q, Zhang L, Das B, Li Z, Liu B, Cai G, *et al.* Increased podocyte Sirtuin-1 function attenuates diabetic kidney injury. *Kidney Int* 2018; 93(6): 1030-43.
- 9 Yuan YP, Ma ZG, Zhang X, Xu SC, Zeng XF, Yang Z, *et al.* CTRP3 protected against doxorubicin-induced cardiac dysfunction, inflammation and cell death via activation of Sirt1. *J Mol Cell Cardiol* 2018; 114: 38-47.
- 10 Feng T, Liu P, Wang X, Luo J, Zuo X, Jiang X, *et al.* SIRT1 activator E1231 protects from experimental atherosclerosis and lowers plasma cholesterol and triglycerides by enhancing ABCA1 expression. *Atherosclerosis* 2018; 274: 172-81.
- 11 Du C, Shi Y, Ren Y, Wu H, Yao F, Wei J, *et al.* Anthocyanins inhibit high-glucose-induced cholesterol accumulation and inflammation by activating LXR α pathway in HK-2 cells. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 5099-113.
- 12 Fan J, Zhao RQ, Parro C, Zhao W, Chou HY, Robert J, *et al.* Small molecule inducers of ABCA1 and apoE that act through indirect activation of the LXR pathway. *J Lipid Res* 2018; 59 (5): 830-42.
- 13 Li X, Jiang L, Yang M, Wu YW, Sun JZ. Impact of weight cycling on CTRP3 expression, adipose tissue inflammation and insulin sensitivity in C57BL/6J mice. *Exp Ther Med* 2018; 16(3): 2052-9.
- 14 Lin XL, Liu MH, Hu HJ, Feng HR, Fan XJ, Zou WW, *et al.* Curcumin enhanced cholesterol efflux by upregulating ABCA1 expression through AMPK-SIRT1-LXR α signaling in THP-1 macrophage-derived foam cells. *DNA Cell Biol* 2015; 34(9): 561-72.