· 基础研究 ·

烟酰胺单核苷酸对 D-半乳糖诱导肾脏衰老的作用

俞悦,张宇,陈雨婷,倪心冉,赵卫红*
(南京医科大学第一附属医院老年肾科,南京 210029)

【摘 要】 **目的** 探讨烟酰胺单核苷酸(NMN)对 D-半乳糖(D-gal)诱导小鼠肾脏衰老的作用及其可能的抗炎机制。**方法** 将 24 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组:对照组、NMN 组、D-gal 组与 D-gal+NMN 组。采用皮下注射 D-gal 的方法构建肾脏衰老模型。记录各组小鼠体质量;采用苏木精-伊红(HE)和马松(Masson)染色观察小鼠肾脏病理损伤和纤维化;应用衰老相关 β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)染色评估组织衰老水平;使用免疫组化法(IHC)和蛋白免疫印迹法(Western blot)观察衰老指标 p16、p21 的定位及表达;使用 Western blot 测定抗衰老蛋白沉默信息调节因子 1(SIRT1)及炎症指标肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)、核因子-κB(NF-κB)的表达水平。采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。根据数据类型,分别采用单因素方差分析、LSD-*t* 检验或 Kruskal-Wallis 检验进行组间比较。**结果** NMN 对 D-gal 组小鼠体质量未产生显著影响($P>0.05$)。与对照组比较,D-gal 组肾脏出现肾小球萎缩,肾小管肿胀、扩张和间质纤维化改变。IHC 结果示 p16、p21 表达增加,并且主要位于肾小管,同时可见 SA-β-gal 阳性率增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。Western blot 结果示 D-gal 组肾脏衰老蛋白 p16、p21 及炎症指标 TNF-α、IL-1β、NF-κB 表达上调,而抗衰老蛋白 SIRT1 表达下调,差异有统计学意义($P<0.05$)。NMN 处理后,D-gal 组肾小球萎缩,肾小管肿胀、扩张及间质纤维化程度明显降低,衰老及炎症指标显著下降,此外,SIRT1 下调及 SA-β-gal 阳性率增加均得到缓解,差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论** NMN 可能通过促进 SIRT1 表达和抑制 NF-κB 途径介导的炎症反应,延缓 D-gal 诱导的肾脏衰老。

【关键词】 烟酰胺单核苷酸;肾脏衰老;D-半乳糖;炎症
【中图分类号】 R592 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2023.10.163

Effect of nicotinamide mononucleotide on D-galactose-induced aging kidney in mice

Yu Yue, Zhang Yu, Chen Yuting, Ni Xinran, Zhao Weihong*
(Department of Geriatric Nephrology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the role of nicotinamide mononucleotide (NMN) in D-galactose (D-gal) induced aging kidney in mice and its possible anti-inflammatory mechanism. **Methods** Twenty-four male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, NMN group, D-gal group and D-gal+NMN group. The mouse model of renal aging was established by subcutaneous injection of D-gal. The body mass of each group was recorded. All mice were sacrificed and the kidneys were removed and sectioned for HE staining and Masson staining to observe pathological changes and detect the severity of renal interstitial fibrosis. Senescence-related β-galactosidase(SA-β-gal) staining was used to evaluate renal aging. Immunohistochemistry (IHC) staining and Western blot were employed to observe the distribution and abundance of p16 and p21 in the kidneys. The protein levels anti-aging gene silent information regulator 1 (SIRT1), and inflammatory indicators, tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), and nuclear factor-κB (NF-κB) in the kidneys were also detected by Western blot. **Results** NMN had no significant effect on body mass of the mice from the D-gal group ($P>0.05$). Compared with the control group, the D-gal group presented glomerular atrophy, tubule swelling and dilatation, and renal interstitial fibrosis, increased expression of p16 and p21, which mainly located in the renal tubules, as well as enhanced SA-β-gal activity (all $P<0.05$). Western blot showed that the expression levels of p16 and p21, and those of TNF-α, IL-1β and NF-κB were obviously up-regulated, while that of SIRT1 was decreased in the D-gal group ($P<0.05$). NMN treatment remarkably attenuated glomerular atrophy, tubule swelling and dilatation, and renal interstitial fibrosis, reduced the indicators related to aging and inflammation, and alleviated the down-regulation of SIRT1 and increase of SA-β-gal activity in the D-gal group (all $P<0.05$). **Conclusion** NMN may delay D-gal-induced renal aging by promoting SIRT1 expression and inhibiting NF-κB pathway mediated inflammatory response.

收稿日期: 2023-03-14; **接受日期**: 2023-05-09
基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC2002100,2018YFC2002102);国家自然科学基金(81971320);江苏省医学重点学科(ZDXKA2016003);江苏省医学人才项目(ZDRCA2016021);江苏省干部保健课题(BJ17018);江苏省人民医院 511 工程(JSPH-511A-2018-5)
通信作者: 赵卫红, E-mail: zhaoweihongny@njmu.edu.cn

【Key words】 nicotinamide mononucleotide; kidney aging; D-galactose; inflammation
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC2002100, 2018YFC2002102), *the National Natural Science Foundation of China* (81971320), *the Jiangsu Provincial Key Discipline of Medicine* (ZDXKA2016003), *the Medicine Talents Program of Jiangsu Province* (ZDRCA2016021), *the Cadres' Healthcare Project of Jiangsu Province* (BJ17018), *and the* 511 *Project of Jiangsu Provincial People's Hospital* (JSPH-511A-2018-5).
Corresponding author: *Zhao Weihong*, *E-mail*: *zhaoweihongny@njmu.edu.cn*

衰老会引起各器官功能减退,导致衰老相关疾病的发生发展。肾脏是最容易衰老的器官之一[1],探究肾脏衰老的发生机制,对延缓肾脏衰老相关疾病的发生并寻找可能的治疗靶点有重要意义。研究表明,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide,NAD^+)水平随年龄的增长而下降,烟酰胺单核苷酸(nicotinamide mononucleotide,NMN)作为NAD^+补救合成途径的重要前体,具有抗炎、抗氧化、减少DNA损伤、恢复线粒体功能等作用,可延缓年龄相关的器官功能衰退[2]。然而,NMN在肾脏衰老中的作用机制尚不明确。因此,本研究采用D-半乳糖(D-galactose,D-gal)诱导小鼠肾脏衰老模型,初步探究NMN对D-gal诱导肾脏衰老的作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要材料

24只SPF级雄性C57BL/6小鼠,6~8周龄,由南京医科大学动物研究中心提供。饲养于温度(22.0℃±2.0℃)、相对湿度(45%~55%)、特定光照周期(光照/黑暗:12h/12h)的通风环境中,所有实验小鼠均可自由饮水进食。本研究中所有动物实验相关操作均获得南京医科大学动物福利和伦理管理委员会批准。

D-gal、NMN(Sigma,美国);p16抗体(CST,美国);p21、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)、核因子-κB(nuclear factor-κB,NF-κB)、沉默信息调节因子1(silent information regulator 1,SIRT1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(Proteintech,中国);β-肌动蛋白(β-actin)抗体(Servicebio,中国);衰老相关β-半乳糖苷酶(senescence-related β-galactosidase,SA-β-gal)染色试剂盒、聚氰基丙烯酸正丁酯(bicinchoninic acid,BCA)蛋白测定试剂盒(碧云天,中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、模型建立及干预 小鼠适应性饲养1周,随机分为4组:对照组;NMN组;D-gal组;D-gal+NMN组,每组6只。D-gal组给予D-gal[300 mg/(kg·d)]颈背部皮下注射8周,建立衰老肾脏模型;NMN组给予NMN[100 mg/(kg·d)]腹腔注射8周;D-gal+NMN组同时给予D-gal[300 mg/(kg·d)]和NMN[100 mg/(kg·d)]注射8周;对照组给予等量磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution,PBS)皮下注射8周。实验中,小鼠定期称量体质量。造模完成后,麻醉处死各组小鼠,收集肾脏组织标本。

1.2.2 HE及Masson染色 将甲醛固定过夜的组织制成4 μm石蜡切片,经脱蜡、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色、脱水封片,在显微镜高倍镜视野下拍照观察。Masson染色完成后,镜下随机选取15个视野,以单个视野下呈现蓝色的区域(去除大血管)为胶原阳性表达,用Image Pro Plus 6.0分析阳性面积占比,取均值比较。

1.2.3 SA-β-gal染色 将冰冻切片按衰老染色试剂盒说明书进行染色,显微镜下可观察到表达β-半乳糖苷酶的蓝色区域,即为衰老染色阳性表达,运用Image Pro Plus 6.0分析阳性面积占比。

1.2.4 免疫组化染色 石蜡切片脱蜡复水、抗原修复、血清封闭,一抗p16、p21(1∶100)4℃孵育过夜;次日加二抗,37 ℃孵育30 min;二氨基联苯胺(diaminobenzidine,DAB)显色,苏木精复染,脱水后封片,光镜下观察棕黄色区域代表蛋白阳性表达,运用Image Pro Plus 6.0分析阳性面积占比。

1.2.5 Western blot 提取组织总蛋白,BCA法检测蛋白浓度及制样。取20 μg/孔蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE),经上样、转膜、封闭,加一抗p16(1∶1 000)、p21(1∶1 000)、IL-β(1∶1 000)、TNF-α(1∶1 000)、SIRT1(1∶1 000)、NF-κB(1∶1000),GAPDH(1∶100 000)、β-actin(1∶1 000)4℃孵育过夜。次日洗膜后加二抗(1∶20000)室温孵育1 h后,洗膜后曝光显影,采用ImageJ v.1.8.0软件进行分析。

1.3 统计学处理

采用SPSS 26.0统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用LSD-t检验;不符合正态分布的计量资料使用中位数(四分位数间距)[$M(Q_1,Q_3)$]表示,组间比较采用Kruskal-Wallis检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NMN 对 D-gal 诱导衰老小鼠体质量的影响

实验期间小鼠体质量均随时间而增加，但差异均无统计学意义（$P>0.05$），且组间比较，差异无统计学意义（$P>0.05$；图 1）。提示 NMN 对 D-gal 诱导衰老小鼠的体质量未产生明显影响。

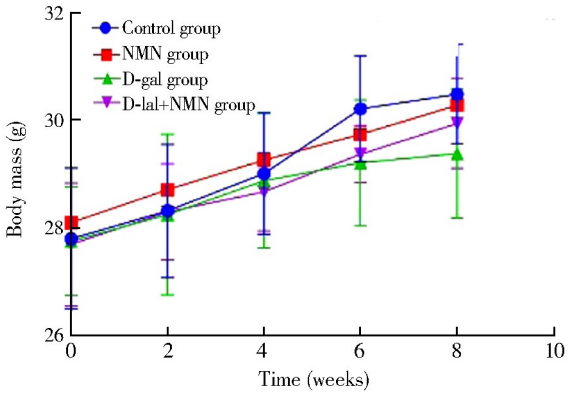


图 1 4 组小鼠体质量变化情况

Figure 1 Changes of body mass in mice of four groups ($n=6$)

NMN: nicotinamide mononucleotide; D-gal: D-galactose.

2.2 NMN 对 D-gal 诱导衰老肾脏病理结构的影响

HE 染色可见，与对照组相比，D-gal 组肾小球分布稀疏、球体缩小，肾小管管腔排列紊乱、明显扩张；而 D-gal+NMN 组肾小球形态较前恢复，肾小管管腔排列规则，且扩张减少。Masson 染色示，D-gal 组肾脏胶原纤维含量较对照组和 NMN 组明显增加，而 D-gal+NMN 组肾脏纤维化程度较 D-gal 组降低（$P<0.05$；图 2）。提示 NMN 可以改善 D-gal 诱导的肾脏衰老病理改变，并缓解肾脏纤维化。

2.3 NMN 对 D-gal 诱导衰老肾脏 SA-β-gal 活性及衰老相关基因表达的影响

对肾脏组织的衰老染色发现，D-gal 组较对照组及 NMN 组的 SA-β-gal 阳性率明显增加，而 D-gal+NMN 组的 SA-β-gal 阳性率较 D-gal 组明显减少（$P<0.05$；图 3A，图 3E），且 SA-β-gal 染色阳性主要分布在肾小管。结合免疫组化及 Western blot 发现，与对照组及 NMN 组相比，D-gal 组肾脏的衰老蛋白 p16、p21 表达增加，且主要位于肾小管；D-gal+NMN 组的 p16、p21 表达较 D-gal 组明显下调（$P<0.05$；图 3B，图 3C，图 3F，图 3G）。同时，Western blot 示，与对照组相比，D-gal 组抗衰老蛋白 SIRT1 表达下调，而 D-gal+NMN 组的 SIRT1 的表达较 D-gal 组明显增加（$P<0.05$；图 3D）。表明 NMN 干预可以降低 D-gal 诱导衰老肾脏的 SA-β-gal 活性和衰老蛋白的表达，并且促进抗衰老指标 SIRT1 表达。

2.4 NMN 对 D-gal 诱导衰老肾脏组织炎症相关指标的影响

为初步探讨 NMN 对 D-gal 诱导肾脏衰老保护作用的机制，本研究采用 Western blot 检测发现，与对照组相比，D-gal 组肾脏炎症指标 TNF-α、IL-1β、NF-κB 的表达均显著上调（$P<0.05$）；与 D-gal 组相比，D-gal+NMN 组肾脏组织 TNF-α、IL-1β、NF-κB 表达显著下调，差异均有统计学意义（$P<0.05$；图 4）。提示 NMN 改善 D-gal 诱导的肾脏衰老可能是通过抑制 NF-κB 介导的炎症反应发挥作用。

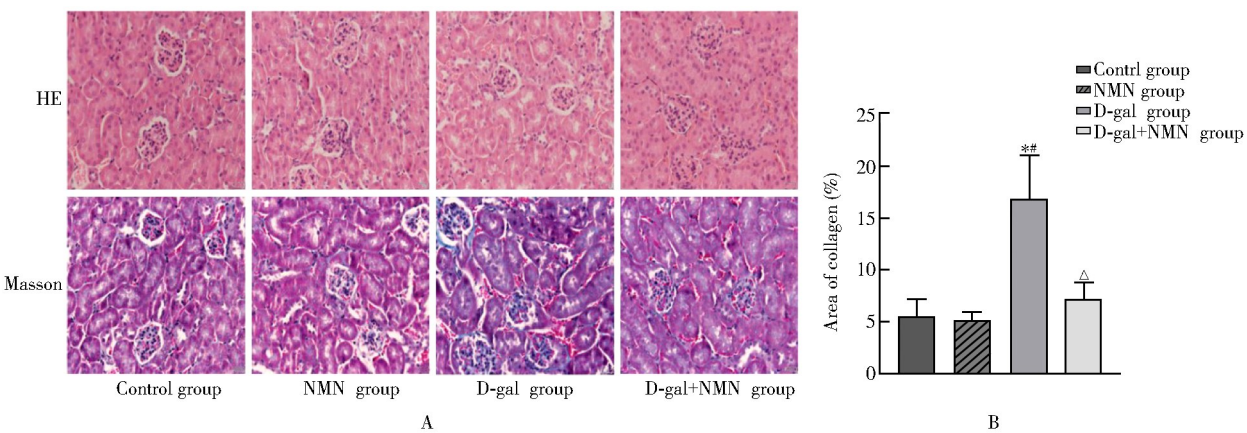


图 2 4 组小鼠肾脏组织病理变化

Figure 2 Pathological changes of kidney tissue in mice of four groups ($n=6$)

A: HE staining (×400) and Masson staining (×400) results; B: changes of area of collagen. Compared with control group, * $P<0.05$; compared with NMN group, # $P<0.05$; compared with D-gal group, △ $P<0.05$. HE: hematoxylin-eosin; NMN: nicotinamide mononucleotide; D-gal: D-galactose.

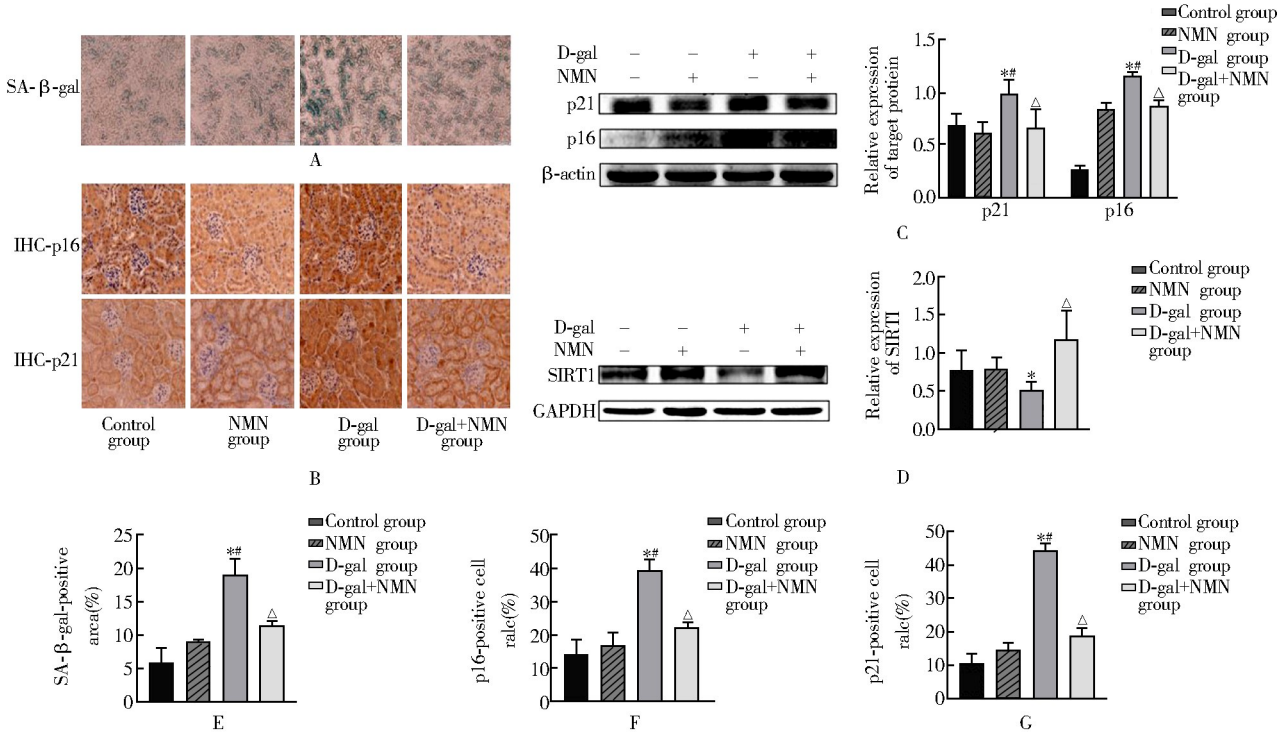


图3 4组小鼠肾脏组织衰老染色及衰老基因表达

Figure 3 Senescence-related β-galactosidase staining and expression of aging gene of kidney tissue in mice of four groups ($n=6$)

A: SA-β-gal staining(×200) results; B: immunohistochemical staining(×400) results of p16 and p21 in kidney tissue; C, D: expression of p21, p16, SIRT1 proteins in kidney tissue of four groups and quantitative analysis results; E, F, G: quantitative analysis results of SA-β-gal staining and immunohistochemical staining. Compared with control group, $^{*}P<0.05$; compared with NMN group, $^{\#}P<0.05$; compared with D-gal group, $^{\triangle}P<0.05$. SA-β-gal: senescence-related β-galactosidase; IHC: immunohistochemistry; NMN: nicotinamide mononucleotide; D-gal: D-galactose; SIRT1: silent information regulator 1.

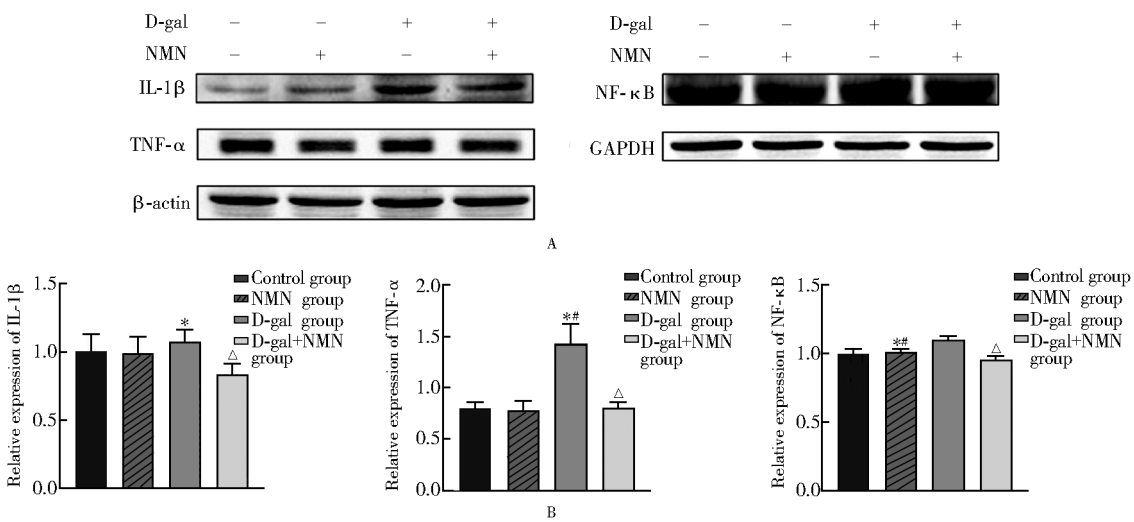


图4 4组小鼠肾脏组织炎症相关蛋白表达

Figure 4 Expression of inflammasome-related proteins in mice of four groups ($n=6$)

A: expression of IL-β, TNF-α, NF-κB proteins in kidney tissue by western blot; B: quantitative analysis results. Compared with control group, $^{*}P<0.05$; compared with NMN group, $^{\#}P<0.05$; compared with D-gal group, $^{\triangle}P<0.05$. NMN: nicotinamide mononucleotide; D-gal: D-galactose; IL-1β: interleukin-1β; TNF-α: tumor necrosis factor-α; NF-κB: nuclear factor-κB.

3 讨 论

肾脏衰老时会出现结构和功能的改变[3],包括肾小球硬化、肾小管扩张及肾间质纤维化等病理改变。细胞衰老是肾脏衰老的重要驱动因素,且主要以肾小管细胞衰老为主[4]。D-gal 可诱发啮齿类动物产生类似自然衰老的表现[5]。本研究应用 D-gal 诱导的肾脏衰老模型初步探讨 NMN 对肾脏衰老的作用及其可能机制。

NAD^+是氧化还原反应的重要辅酶,参与新陈代谢、DNA 损伤修复等过程[6]。NMN 可以提高衰老体内下降的 NAD^+水平,通过抗炎、线粒体保护等机制发挥对衰老神经血管、眼、生殖系统等的保护作用[2]。既往研究显示,补充 NMN 可提高老年小鼠肾脏中的 NAD^+和 SIRT1 水平,对急性肾脏损伤后的慢性肾脏纤维化有保护作用[7,8]。此外,NMN 还可改善糖尿病肾病模型鼠的肾功能[9]。本研究中,给予 D-gal 模型小鼠 NMN 处理后,D-gal 诱导的肾小球萎缩、肾小管纤维化等病理改变好转,SA-β-gal 活性及 p16、p21 的表达水平显著降低,表明补充 NMN 可以改善肾脏衰老。

全身慢性炎症是衰老相关疾病的重要原因,包括肾脏衰老及慢性肾脏病[10]。SIRT1 作为 NAD^+依赖的去乙酰化酶,在调节细胞衰老及炎症反应中发挥重要作用[11]。NMN 对衰老肾脏和年龄相关疾病的保护作用依赖 SIRT1 的上调[8,9]。SIRT1 与 NF-κB 信号通路以相互拮抗的方式维持细胞和组织内的能量代谢和免疫反应平衡。研究发现,SIRT1 可以使 NF-κB 内 RelA/p65 亚基的赖氨酸 310 位点去乙酰化,抑制 NF-κB 依赖性基因的转录活性和降低下游抗凋亡基因和促炎基因的表达。RelA/p65 在赖氨酸 310 位点的去乙酰化还促进了赖氨酸 314 和 315 位点的甲基化,使 RelA/p65 发生泛素化和降解,对炎症反应起到抑制作用,如改善衰老血管的内皮功能障碍[12,13]。调节 SIRT1-NF-κB 轴可降低肝炎中的炎症反应,并且也被证实可以改善顺铂诱导的急性肾损伤[14,15]。在本研究 D-gal 诱导肾脏衰老模型中,可见炎症因子增加,补充 NMN 可以下调炎症因子,提示可能与改变 SIRT1 和 NF-κB 途径有关。本研究发现,NMN 处理后可以减低 NF-κB,缓解 SIRT1 的下降。

综上,衰老肾脏可见炎症因子升高,SIRT1 下调,NF-κB 上调,通过补充 NMN 可以增加 SIRT1,减轻炎症反应,从而减轻肾脏衰老相关病理损伤,改善肾脏衰老,NMN 缓解肾脏衰老的机制有待进一步研究。

【参考文献】

[1] Fang Y, Gong AY, Haller ST, *et al*. The ageing kidney:molecular mechanisms and clinical implications[J]. Ageing Res Rev, 2020, 63: 101151. DOI: 10.1016/j.arr.2020.101151.

[2] Nadeeshani H, Li J, Ying T, *et al*. Nicotinamide mononucleotide (NMN) as an anti-aging health product — promises and safety concerns[J]. J Adv Res, 2021, 37: 267-278. DOI: 10.1016/j.jare.2021.08.003.

[3] 张娟, 魏璐, 张宇, 等. 肾小球滤过率增龄变化及其影响因素的研究[J]. 中华老年医学杂志, 2021, 40(10): 1250-1254. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-9026.2021.10.007.

[4] Docherty MH, O′sullivan ED, Bonventre JV, *et al*. Cellular senescence in the kidney[J]. J Am Soc Nephrol, 2019, 30(5): 726-736. DOI: 10.1681/ASN.2018121251.

[5] 张宇, 柏云, 魏璐, 等. 构建肾小管上皮细胞衰老模型的研究[J]. 中华老年医学杂志, 2021, 40(10): 5. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-9026.2021.10.008.

[6] Yoshino J, Baur JA, Imai SI. NAD(+) intermediates: the biology and therapeutic potential of NMN and NR[J]. Cell Metab, 2018, 27(3):513-528. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.11.002.

[7] Jia Y, Kang X, Tan L, *et al*. Nicotinamide mononucleotide attenuates renal interstitial fibrosis after AKI by suppressing tubular DNA damage and senescence[J]. Front Physiol, 2021, 12: 649547. DOI: 10.3389/fphys.2021.649547.

[8] Guan Y, Wang SR, Huang XZ, *et al*. Nicotinamide mononucleotide, an NAD(+) precursor, rescues age-associated susceptibility to AKI in a sirtuin 1-dependent manner[J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28(8): 2337-2352. DOI: 10.1681/asn.2016040385.

[9] Yasuda I, Hasegawa K, Sakamaki Y, *et al*. Pre-emptive short-term nicotinamide mononucleotide treatment in a mouse model of diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2021, 32(6): 1355-1370. DOI: 10.1681/asn.2020081188.

[10] Furman D, Campisi J, Verdin E, *et al*. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span[J]. Nat Med, 2019, 25(12): 1822-1832. DOI: 10.1038/s41591-019-0675-0.

[11] Hwang JW, Yao H, Caito S, *et al*. Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 61: 95-110. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.015.

[12] Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, *et al*. Modulation of NF-kappa B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase[J]. EMBO J, 2004, 23(12): 2369-2380. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600244.

[13] Gano LB, Donato AJ, Pasha HM, *et al*. The SIRT1 activator SRT1720 reverses vascular endothelial dysfunction, excessive superoxide production, and inflammation with aging in mice[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014, 307(12): H1754-H1763. DOI: 10.1152/ajpheart.00377.2014.

[14] de Gregorio E, Colell A, Morales A, *et al*. Relevance of SIRT1-NF-κB axis as therapeutic target to ameliorate inflammation in liver disease[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 3858. DOI: 10.3390/ijms21113858.

[15] Fu Y, Wang Y, Liu Y, *et al*. p53/sirtuin 1/NF-κB signaling axis in chronic inflammation and maladaptive kidney repair after cisplatin nephrotoxicity[J]. Front Immunol, 2022, 13: 925738. DOI: 10.3389/fimmu.2022.925738.

(编辑: 郑真真)