



河南师范大学

NENAN NORMAL UNIVERSITY

读书报告

报告人：赵文丽

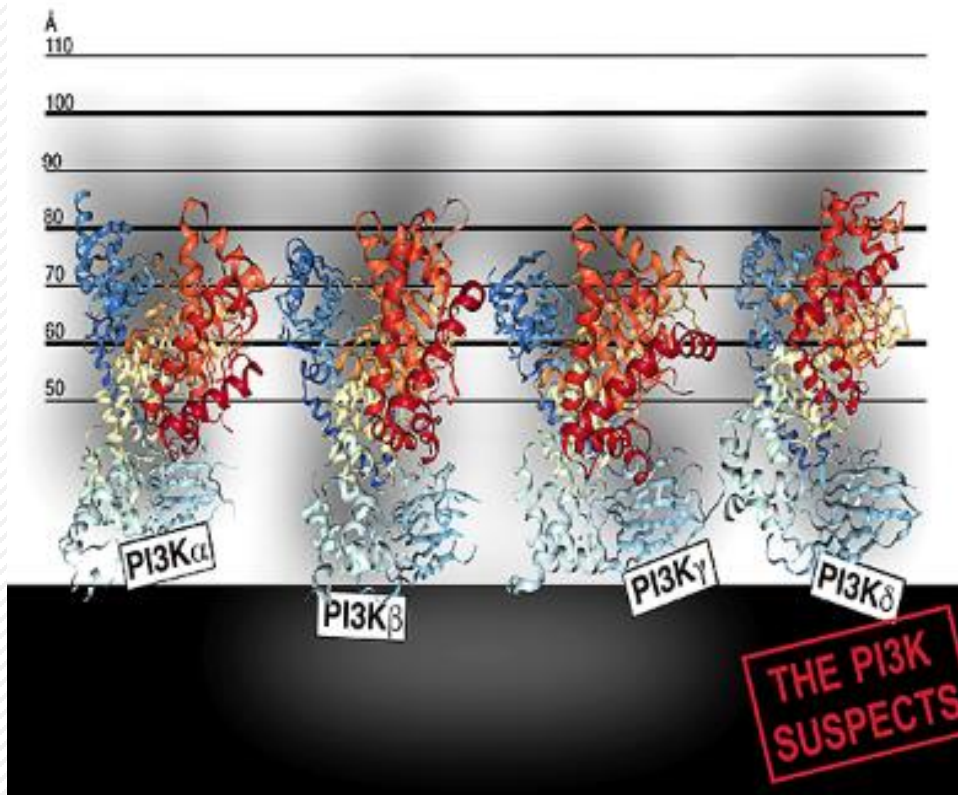
时间：2019年07月07日

Cell Metabolism

Volume 29
Number 6

June 4, 2019

www.cell.com



Article

Cell Metabolism

Sodium Intake Regulates Glucose Homeostasis through the PPAR δ /Adiponectin-Mediated SGLT2 Pathway

钠的摄入通过PPAR δ /脂联素介导的SGLT2通路调节葡萄糖稳态

IF=22.415

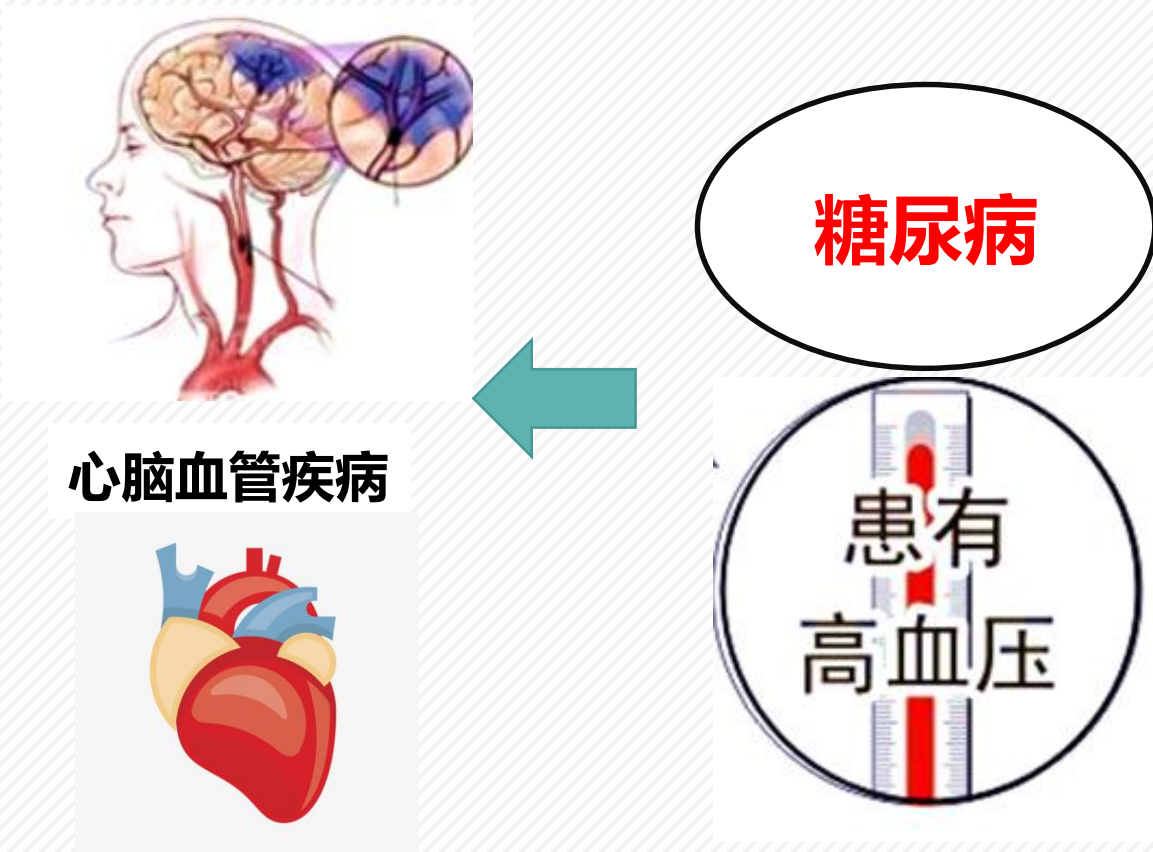


目录

CONTENT

- 1 研究背景
- 2 方法与结果
- 3 结论

1 研究背景



糖尿病和高血压的控制对于降低心血管疾病的死亡率和发病率至关重要。
(Lindholm et al., 2002)

高糖或**高钠**摄入对糖尿病心脑血管疾病的影响一直备受争议。

然而对**钠摄入量**和**葡萄糖稳态**之间确切相互作用的研究还很少，并且其在糖尿病中的影响也有待研究。

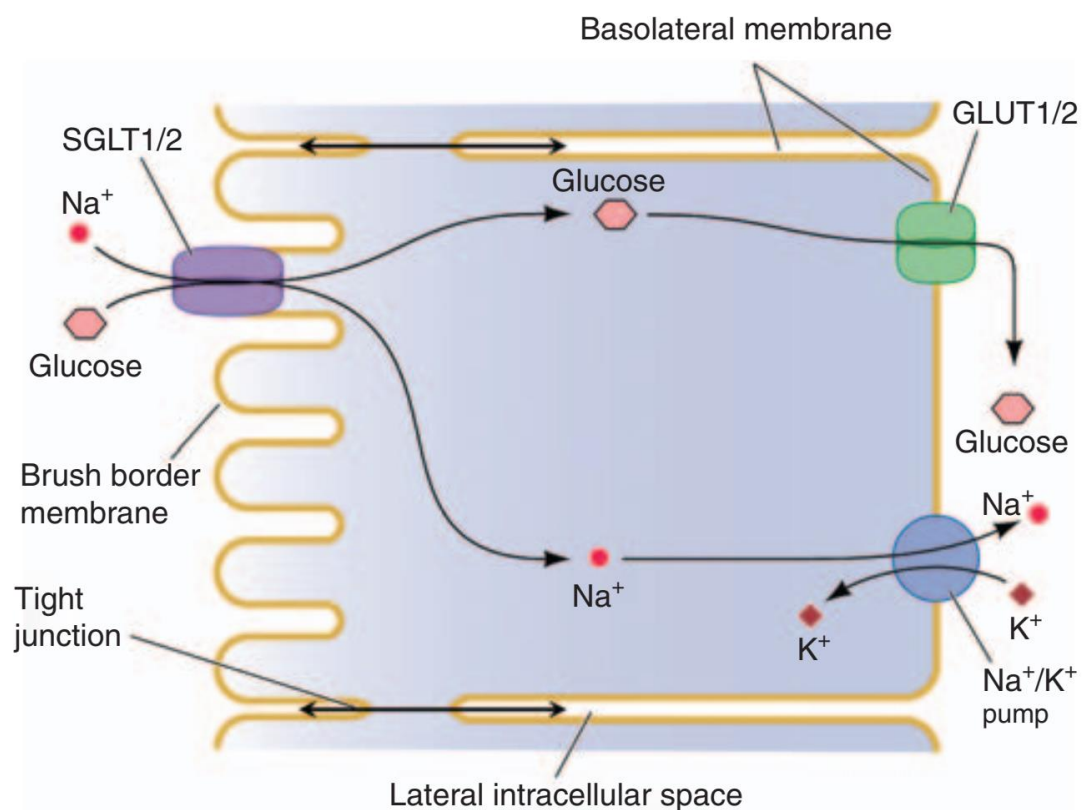


Figure 4 | Glucose reabsorption from the glomerular filtrate through tubule epithelial cells into blood.^{20,30} Copyright 2004, *Int Union Physiol Sci/Am Physiol Soc.*

(Mather and Pollock, 2011)

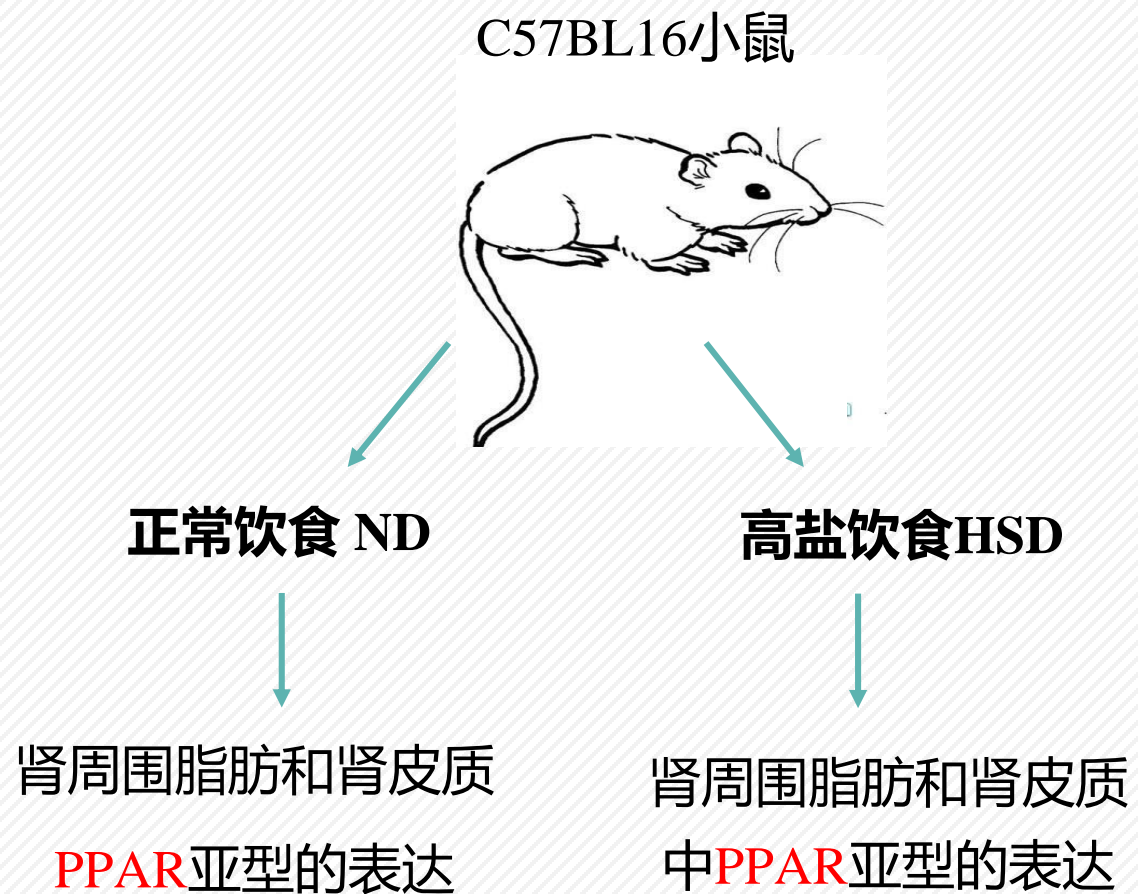
肾脏除了调节体液和渗透压的稳态外，在葡萄糖过滤和重吸收方面也起着至关重要的作用。

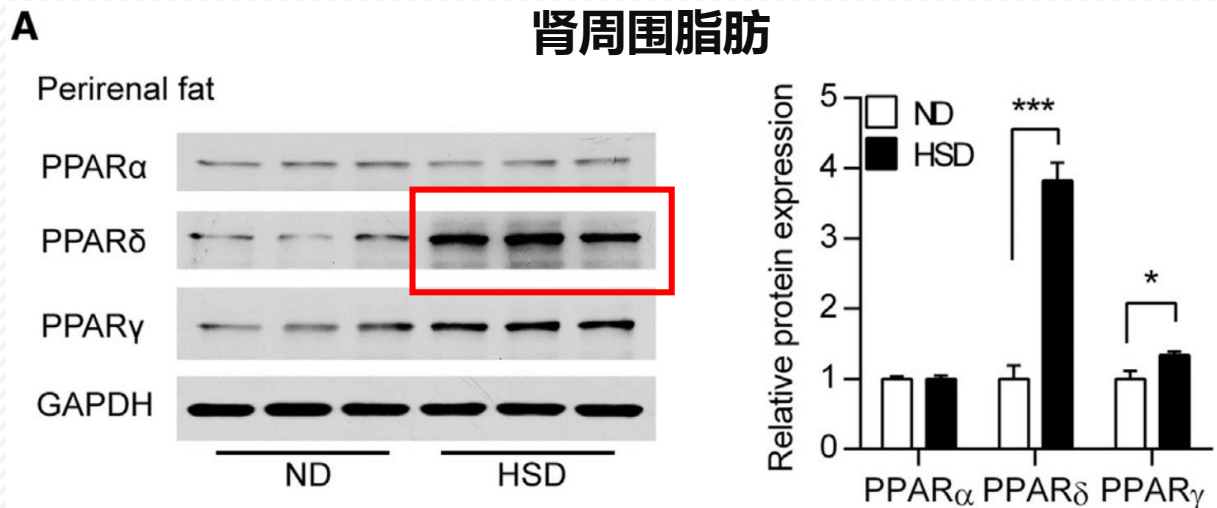
在肾近端小管细胞中，钠-葡萄糖共转运体2 (**SGLT2**)是连接**钠摄取**和**葡萄糖转运**的一个关键因素。SGLT2具有较高的转运能力，能够以1:1的比例将葡萄糖和钠重新吸收。(Kanai et al., 1994)

- ◆ 在过去的十年中，过氧化物酶体增殖激活受体(PPAR)的激活已成为一种新的有效治疗心脏代谢疾病的方法。(Rosenson et al., 2012)
- ◆ 在肾脏中，三种PPAR (PPAR α 、PPAR δ 、PPAR γ) 亚型均有不同的表达量(Thomas et al., 2012)。
- ◆ 有研究表明，无论是通过特异性激动剂还是通过基因调控，PPAR δ 的激活都能减轻啮齿动物肥胖和糖尿病的血脂异常、高血糖和胰岛素抵抗。

假设： PPAR δ 参与了肾脏中钠的转运和葡萄糖的再吸收，从而改善了钠和葡萄糖的稳态。

2 实验方法与结果

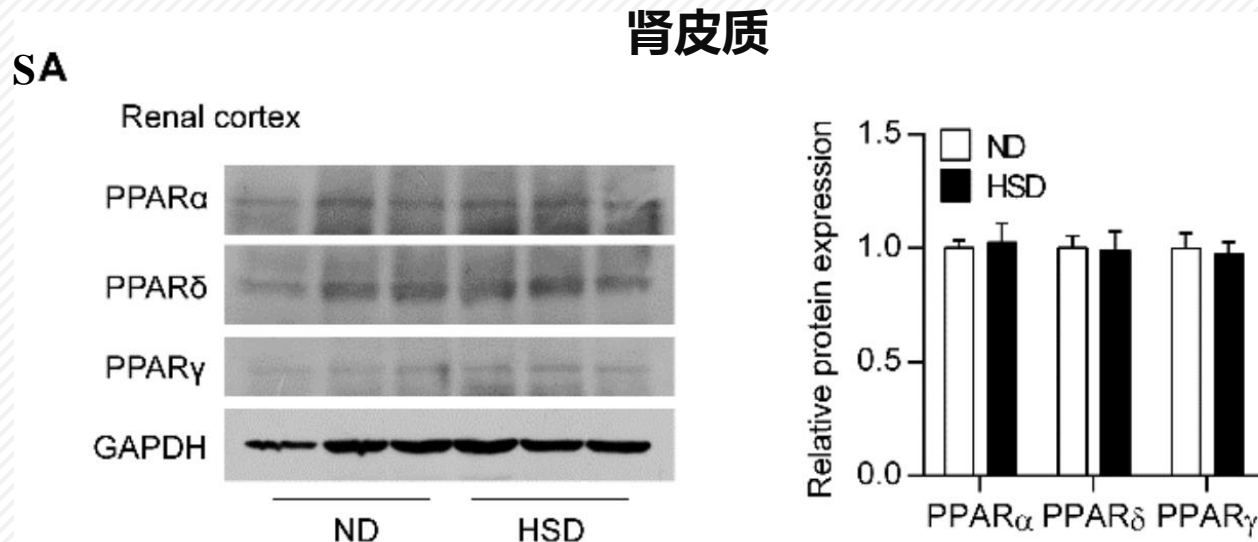




(A) Representative western blots of PPAR α , PPAR δ , PPAR γ , and GAPDH in the **perirenal fat(肾周围脂肪)** of mice fed ND or HSD for 24 weeks. (n = 6).

(SA) Representative western blots of PPAR isoforms and GAPDH in the **renal cortex (肾皮质)** of mice fed with normal diet (ND) or high salt diet (HSD) for 24 weeks.

Quantitative results are shown on the right (n=6).

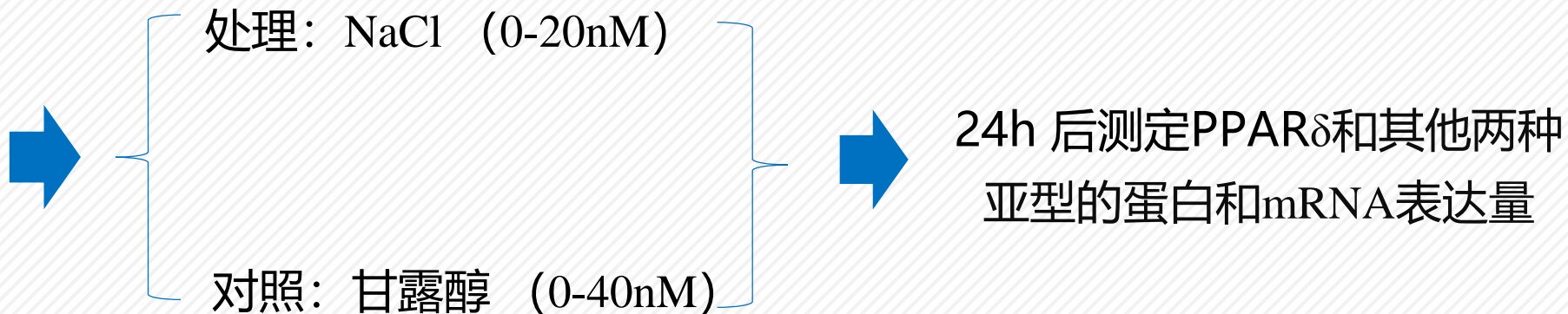


HSD饮食显著提高了肾周围脂肪中 PPAR δ 的表达，而其他PPAR亚型在肾周脂肪中的表达仅略高或未发生变化。

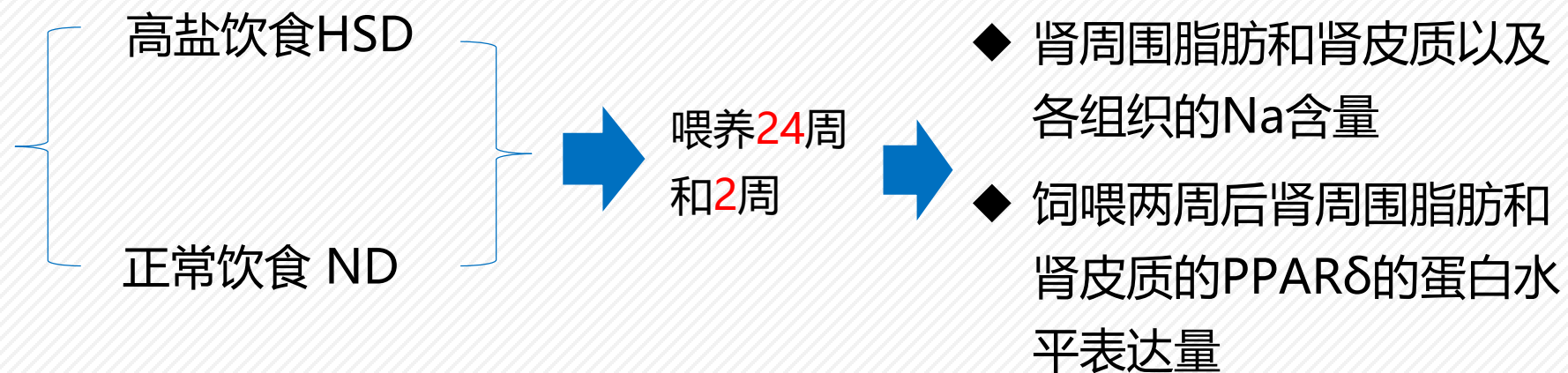
高盐促进肾周围脂肪**PPAR δ** 表达的机制是什么？



3T3-L1脂肪细胞

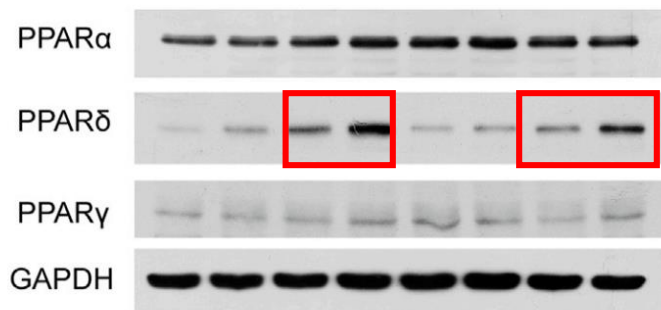


C57BL16小鼠



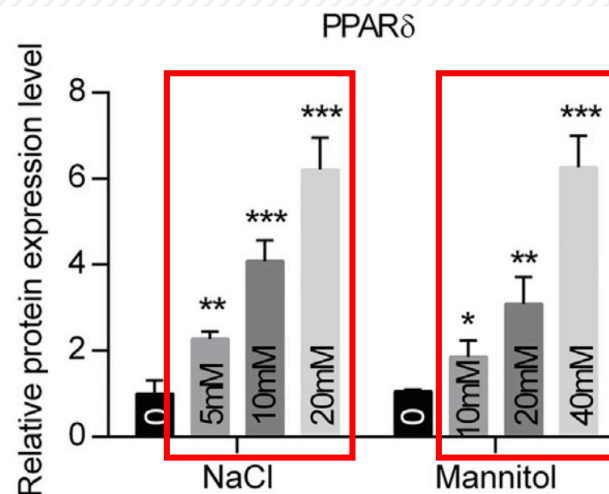
PPAR δ 的蛋白表达水平

B 3T3-L1 adipocyte



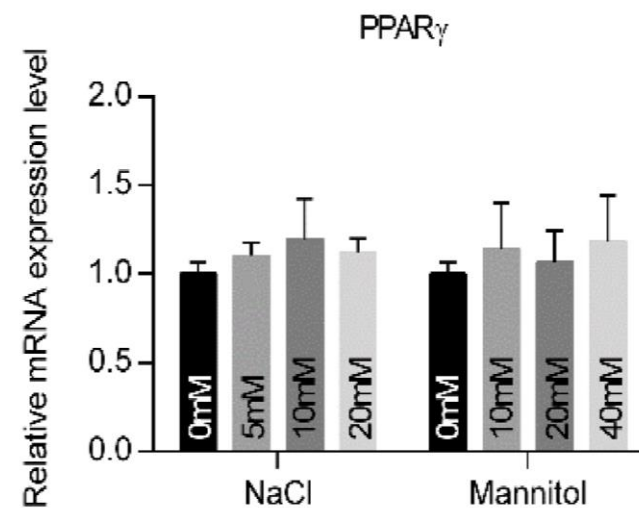
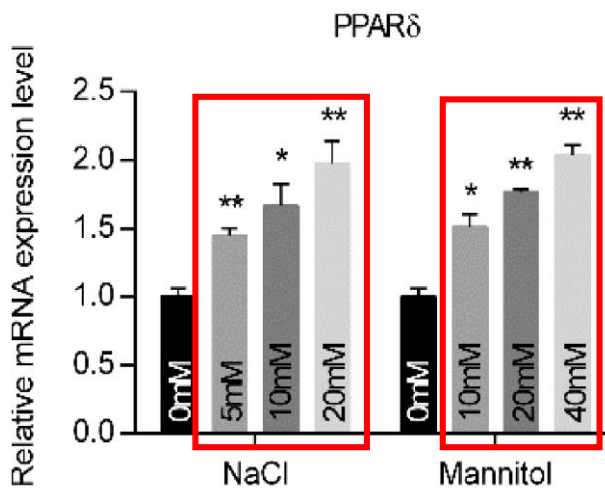
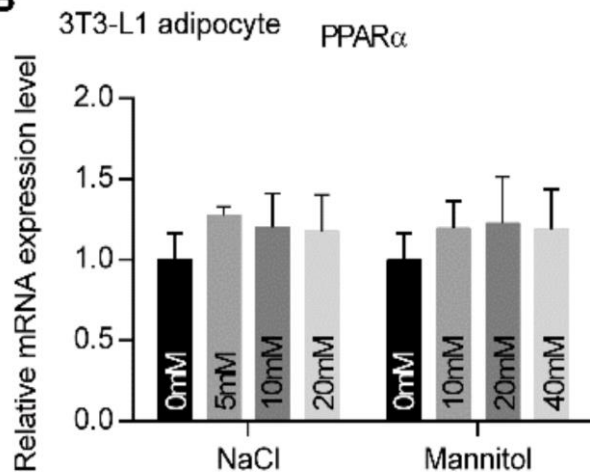
NaCl (mM): 0 5 10 20

Mannitol (mM): 0 10 20 40



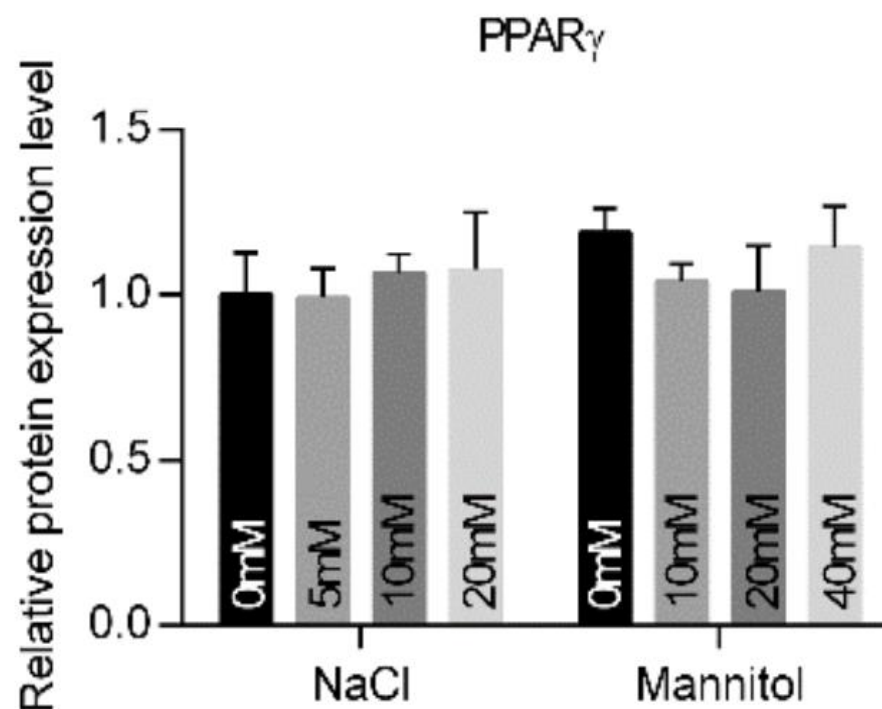
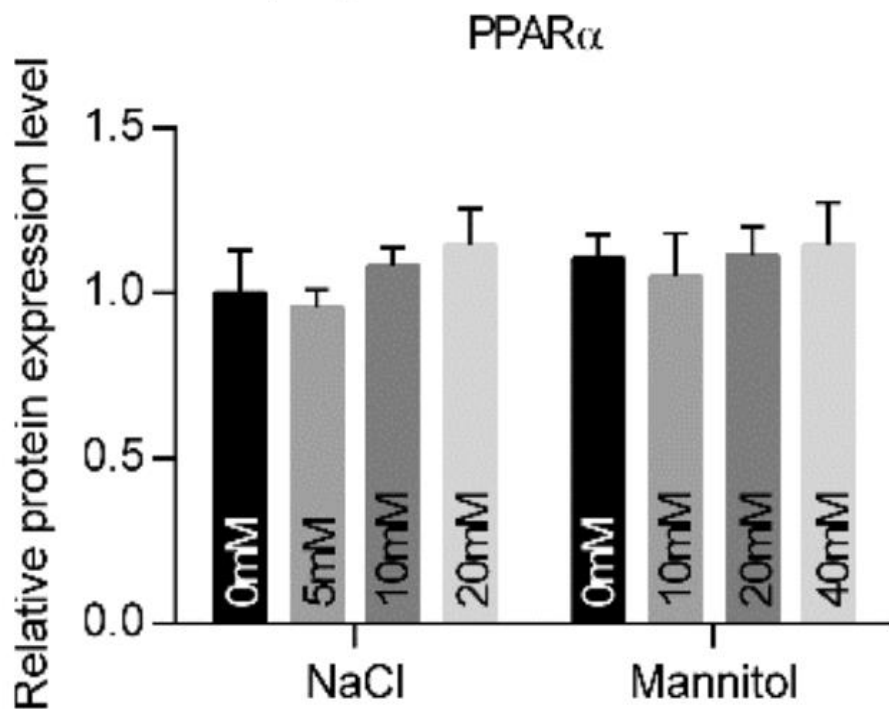
PPAR亚型的mRNA表达水平

SB

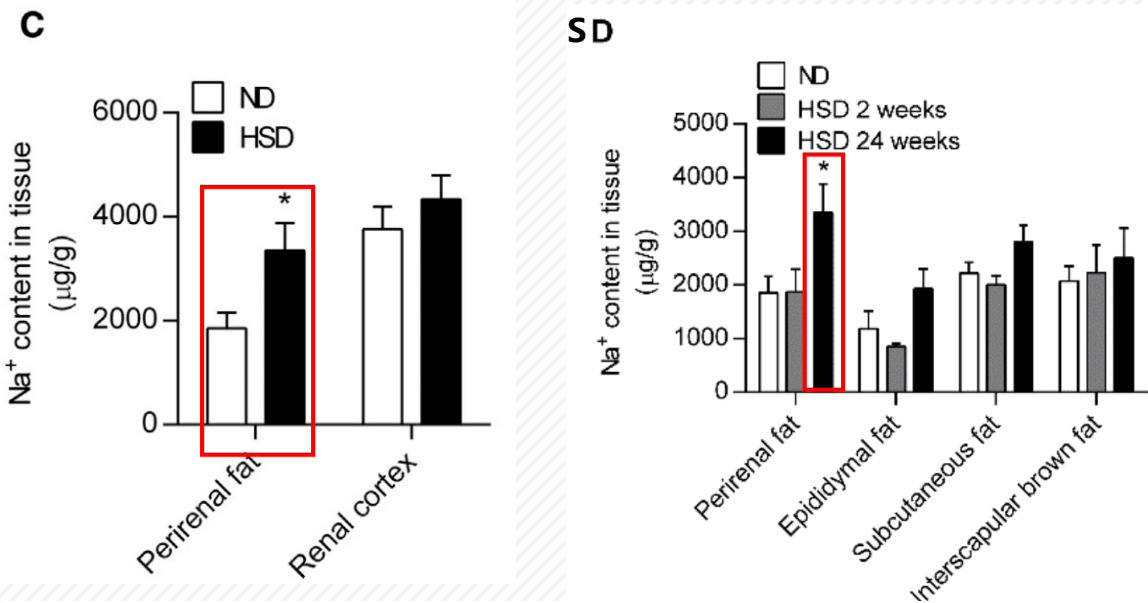


PPAR α 和PPAR γ mRNA表达水平

SC 3T3-L1 adipocyte



高盐处理可显著提高3T3-L1脂肪细胞中PPAR δ 的表达

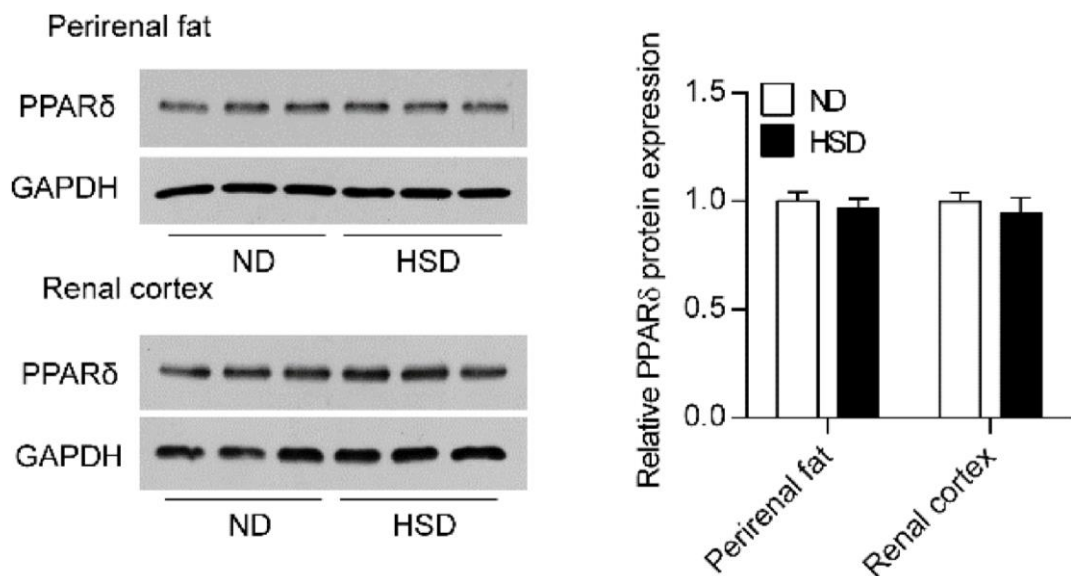


(C) The sodium content in the perirenal fat or renal cortex (dry weight) of wild-type mice fed an ND or HSD for **24 weeks** (n = 6–9).

(SD) The Na⁺ content in the adipose tissues (dry weight) of mice fed with normal or high salt diet for **2 or 24 weeks** (n=6).

(SE) Representative western blots of PPAR δ and GAPDH in the perirenal fat and renal cortex of mice fed with ND or HSD for **2 weeks**. Quantitative results of the protein levels are shown on the right (n = 6).

SE



这些结果表明，高钠摄入可能通过增加渗透压选择性地激活肾周围脂肪中的PPAR δ 表达水平。

实验方法与结果

为了确定脂肪PPAR δ 在高钠摄入的条件下是否有调节钠尿的作用



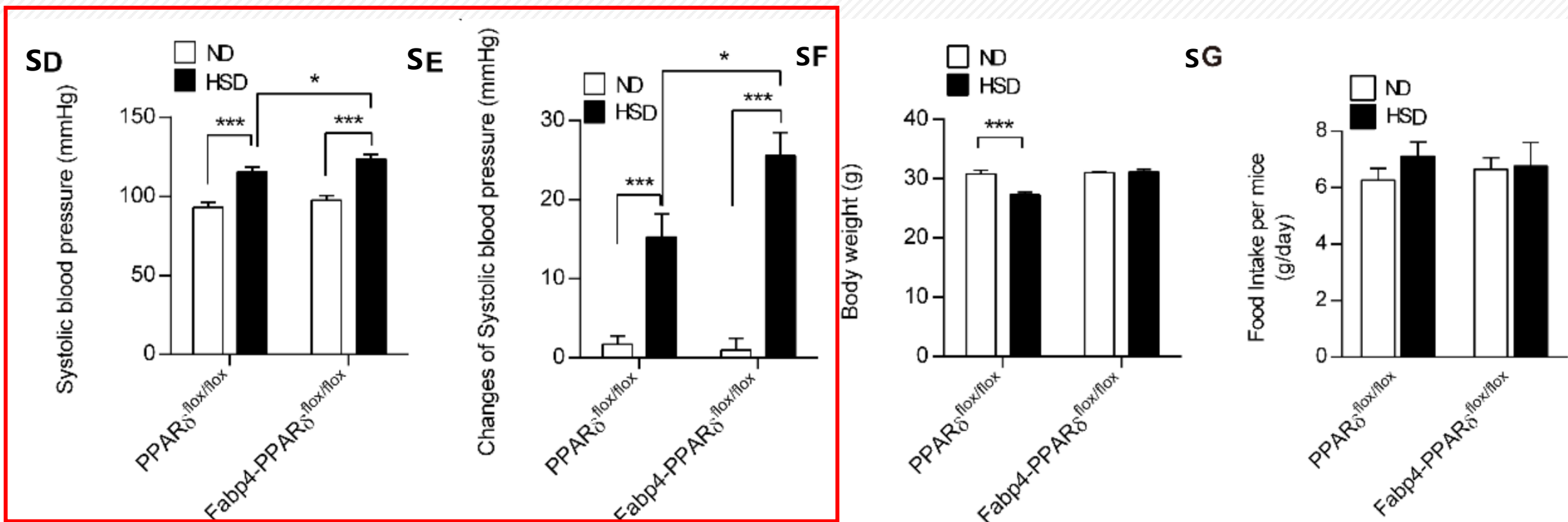
制作脂肪特异性PPAR δ 敲除小鼠 (Fabp4-PPAR $\delta^{\text{flox/flox}}$)



正常和高盐饮食喂养Fabp4-PPAR $\delta^{\text{flox/flox}}$ 和PPAR $\delta^{\text{flox/flox}}$ 两种小鼠24周



- ◆ 检测收缩压及其变化、体重和摄食量
- ◆ 空腹血糖水平、糖耐量能力、胰岛素水平
- ◆ 尿量、Na排泄量、血浆和肾周围脂肪的Na含量、血浆醛固酮含量



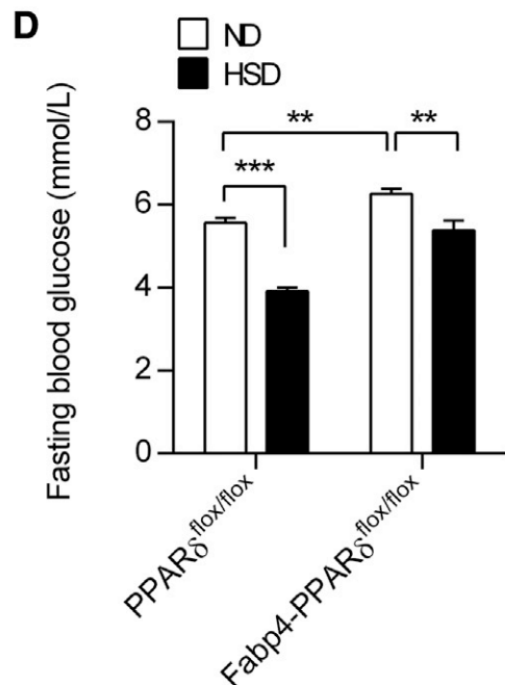
喂养24周后收缩压 (n=25)

喂养前后收缩压的变化 (n=25)

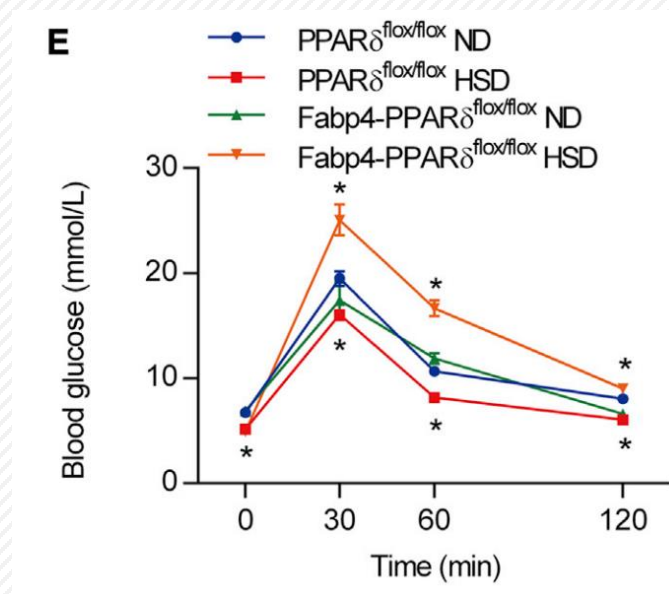
喂养24周后体重(n=6)

喂养24周后摄食量(n=8)

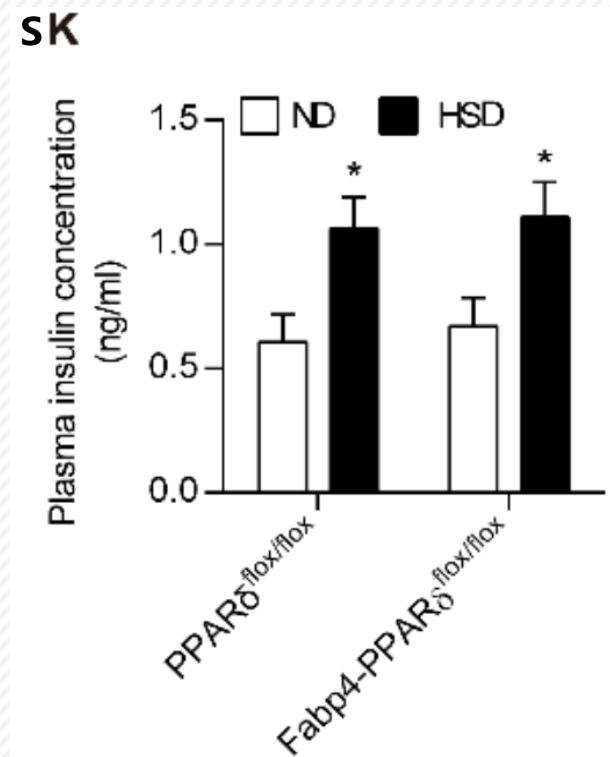
脂肪特异性PPAR δ 敲除可以加重高盐摄食对收缩压的影响，但对体重和摄食量无影响。



24周之后空腹血糖变化

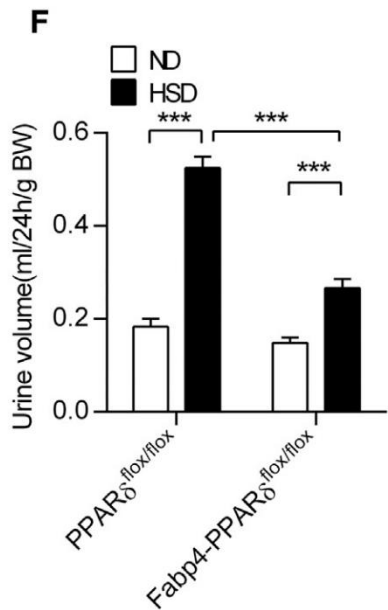


24周之后腹腔糖耐量

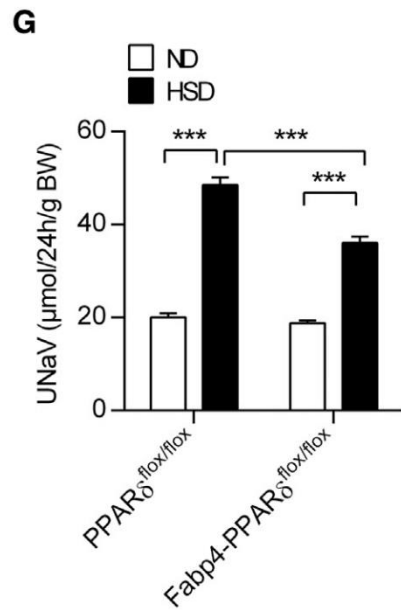


24周后胰岛素水平

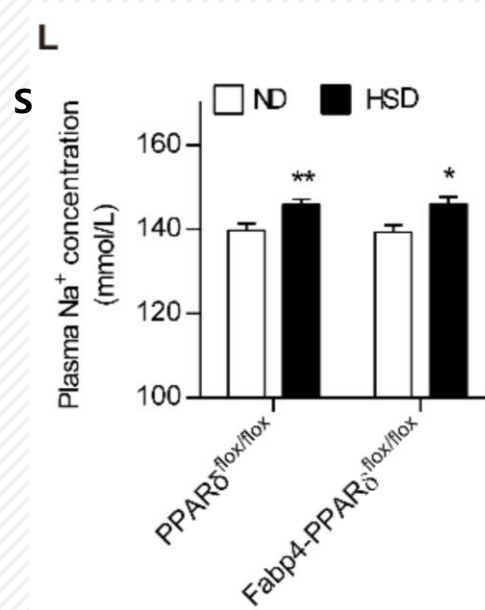
高盐摄入之后，未敲除小鼠的空腹血糖含量降低更为显著；长期高盐饲喂可以显著提高未敲除小鼠的糖耐量能力，而在敲除小鼠中并没有这样的效果；并且高盐摄入均会导致敲除和未敲除小鼠的胰岛素水平显著升高。



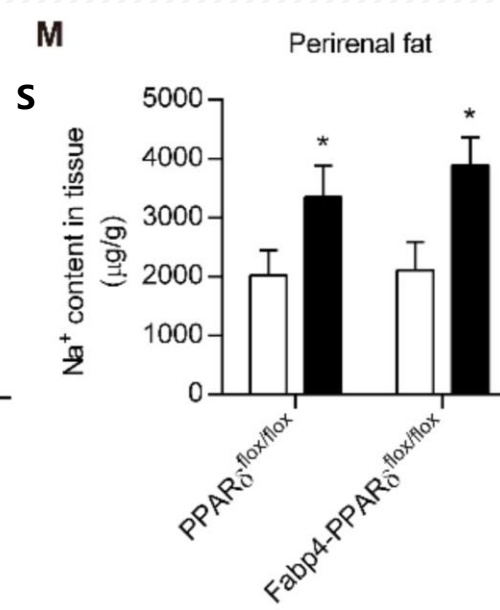
24h的尿量



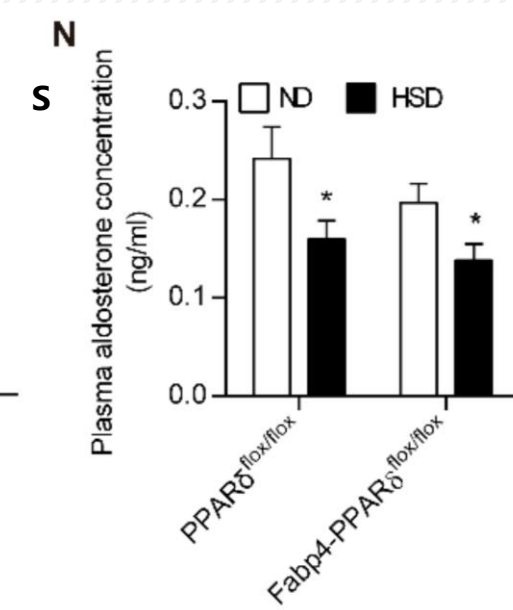
24h的Na排泄量



24h的血浆Na含量



肾周围脂肪的Na含量



血浆醛固酮含量

高钠摄入显著增加 PPAR δ ^{flox/flox} 和 Fabp4-PPAR δ ^{flox/flox} 小鼠的尿量、钠排泄量以及血浆和肾周脂肪中的钠含量，同时降低血浆醛固酮水平。而脂肪特异性 PPAR δ 敲除小鼠显著减弱了高钠对尿量和钠排泄量的促进。

- ◆ 检测收缩压及其变化、体重和摄食量
- ◆ 空腹血糖水平、糖耐量能力、胰岛素水平
- ◆ 尿量、Na排泄量、血浆和肾周围脂肪的Na含量、血浆醛固酮含量



以上这些结果表明，在高钠摄入下，脂肪 PPAR δ 对提高糖耐量和利钠作用至关重要。

已有文献表明，SGLT2在调节肾脏葡萄糖转运和钠再吸收过程中起着重要作用（Mather and Pollock, 2011）。

为了确定**SGLT2是否参与**了脂肪PPAR δ 对小鼠糖耐量和钠尿的影响

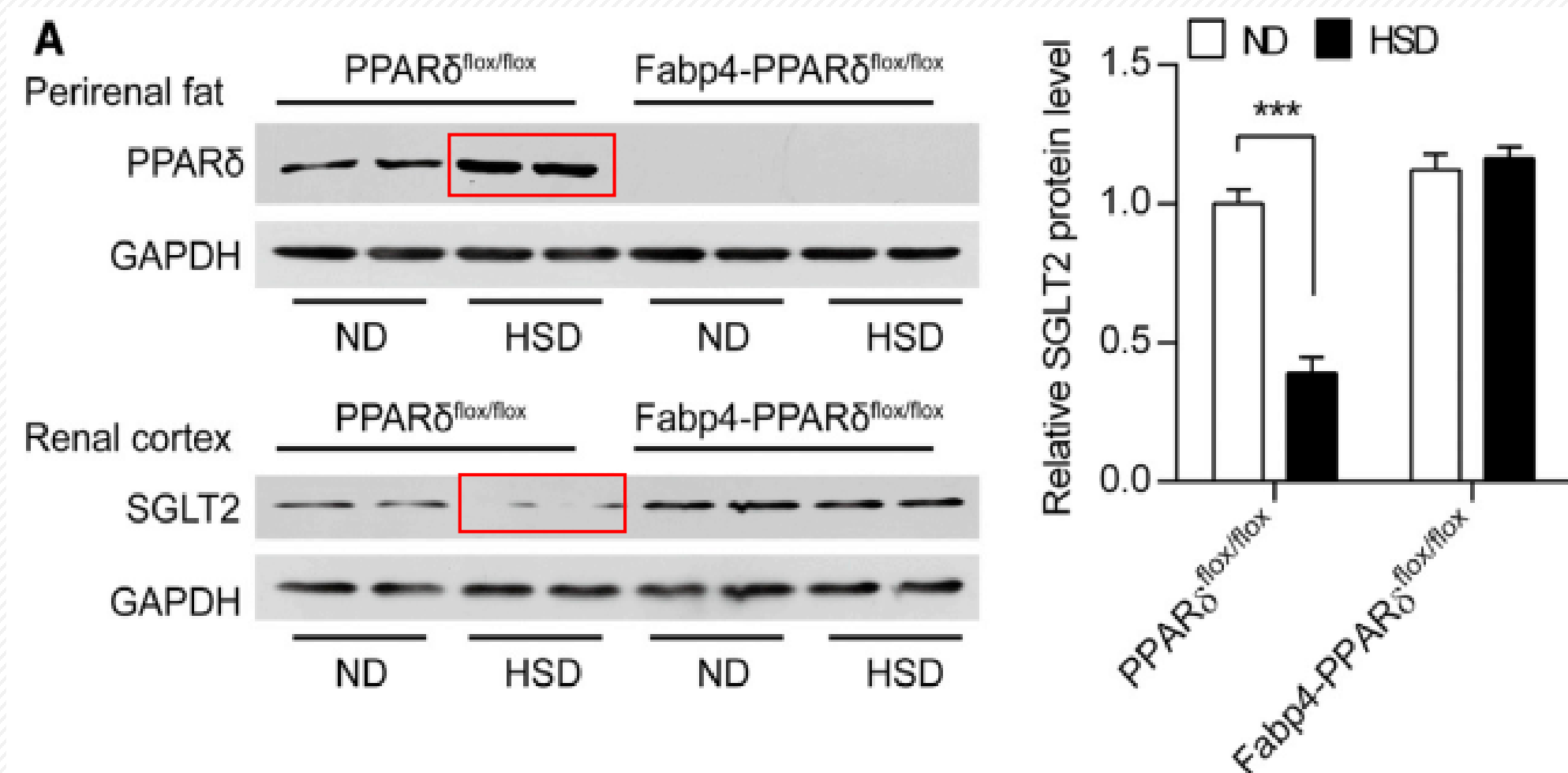


正常（ND）和高盐（HSD）喂养Fabp4-PPAR $\delta^{\text{flox/flox}}$ 和PPAR $\delta^{\text{flox/flox}}$ 两种小鼠24周



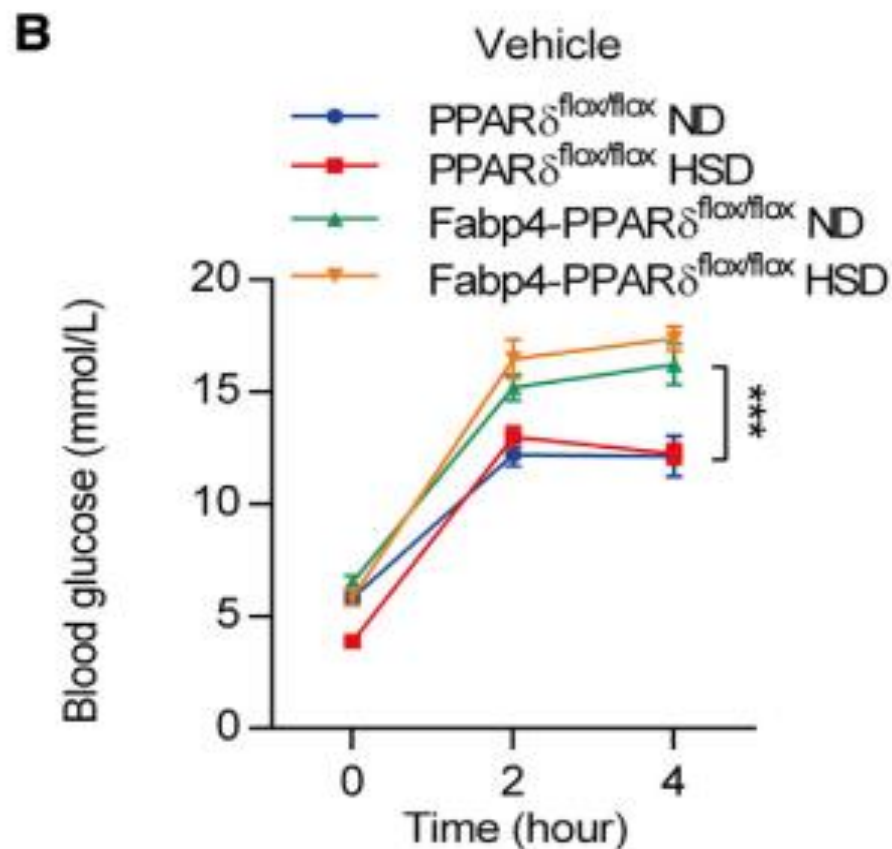
检测SGLT2在小鼠体内的表达和功能。

SGLT2抑制剂处理后，检测葡萄糖变化、Na和糖尿排泄量。

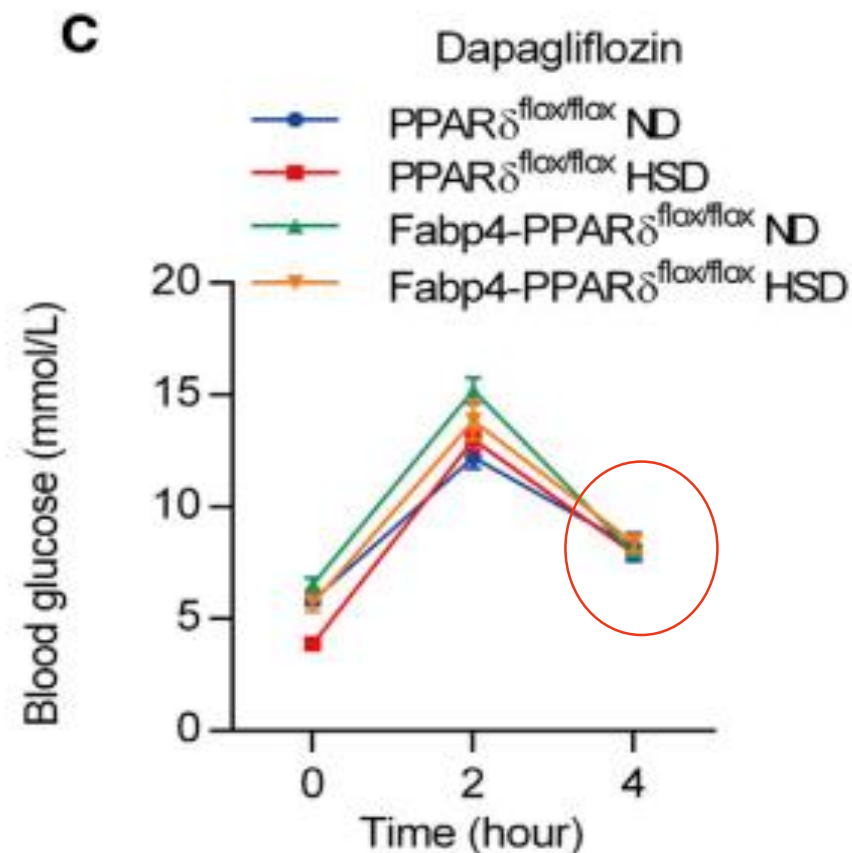


结果表明，高盐饮食对SGLT2的抑制依赖于PPAR δ 的表达。

溶剂对照

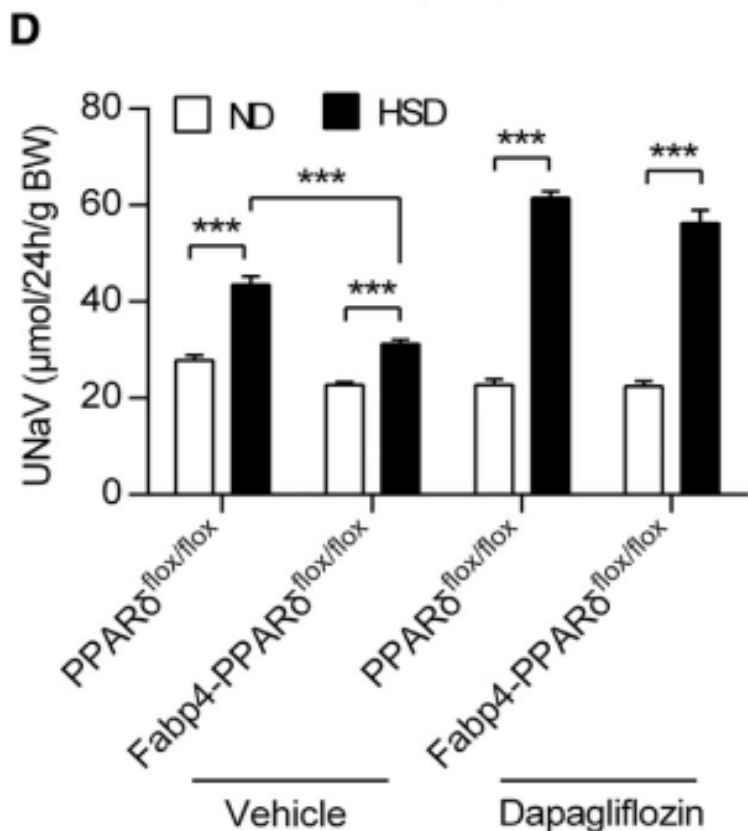


SGLT2抑制剂 (达格列净)

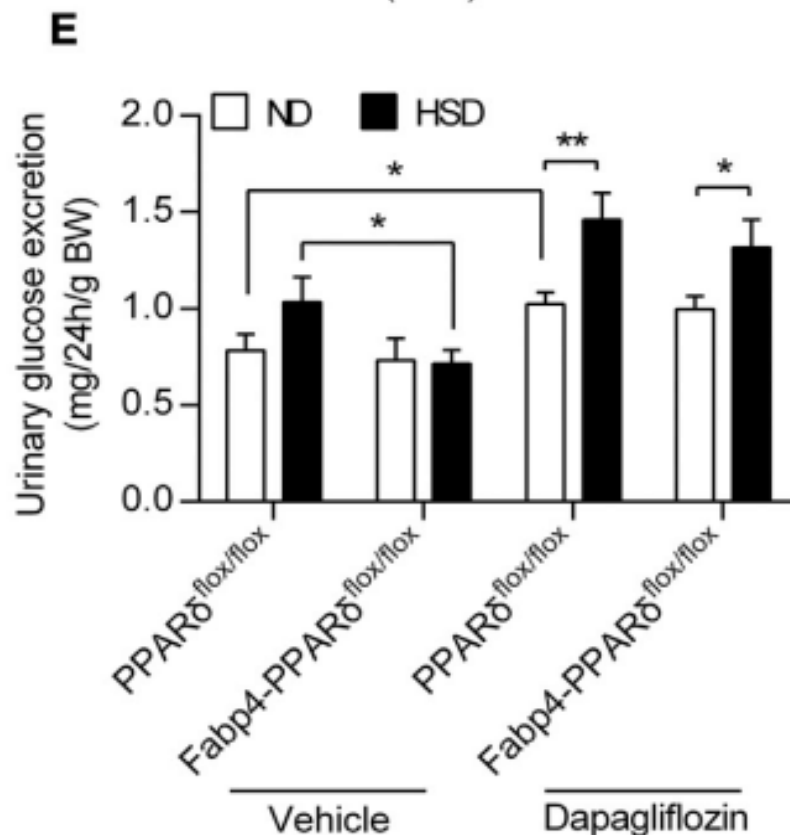


Dapagliflozin 处理后，第4小时的血糖水平明显低于第2小时，但Vehicle处理后却没有效果。

Na尿排泄量



糖排泄量



Dapagliflozin处理之后, PPAR δ ^{flox/flox}小鼠和Fabp4-PPAR δ ^{flox/flox}小鼠的Na排泄和糖排泄增加量都高于Vehicle组。

这些结果表明, HSD 饮食小鼠的Na尿和糖尿排泄量与 PPAR δ 依赖的SGLT2抑制有关

是什么因子介导了脂肪 PPAR δ 对肾脏SGLT2的影响呢?



为了进一步探讨脂肪 PPAR δ 对肾脏 SGLT2 的影响机制



脂联素?



有文献发现, 无论是PPAR δ 激活(Choi et al., 2007) 还是高钠摄入(Kamari et al., 2010) 都会增加脂联素的表达量。



用PPAR δ flox/flox小鼠和Fabp4-PPAR δ flox/flox小鼠验证高盐和PPAR δ 对脂联素的影响。



- ◆ 在体实验
- ◆ 3T3-L1细胞系实验
- ◆ 原代脂肪细胞实验

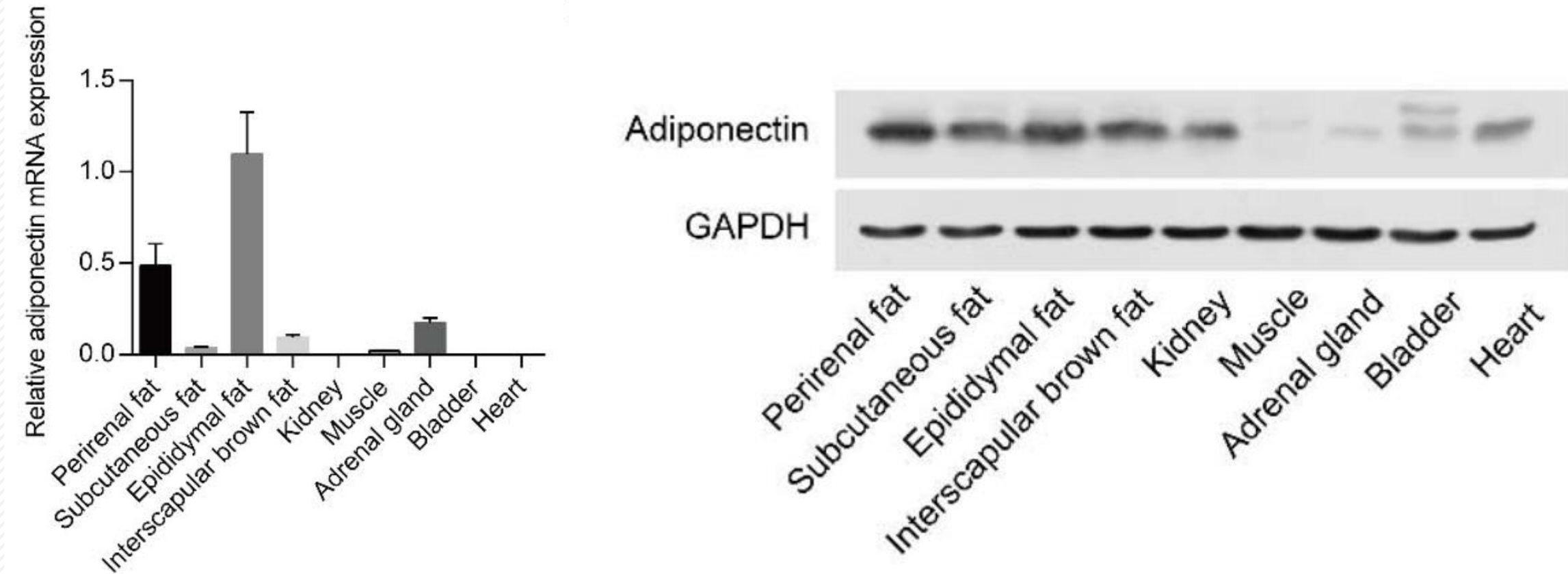
确定脂联素是否通过PPAR δ 对SGLT2表达产生影响。



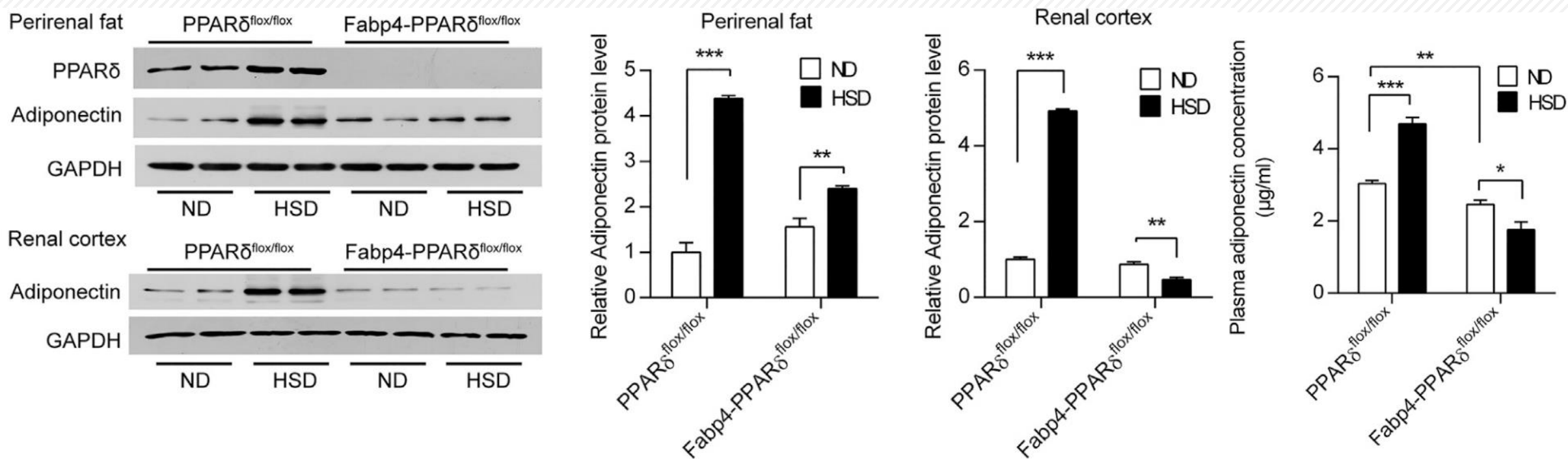
- ◆ HK-2 (人肾小管上皮细胞) 实验
- ◆ 肾皮质组织培养实验
- ◆ 在体实验

脂联素的组织分布

依次是肾周围脂肪、皮下脂肪、附睾脂肪、肩胛棕色脂肪、肾、肌肉、肾上腺、膀胱、心脏、



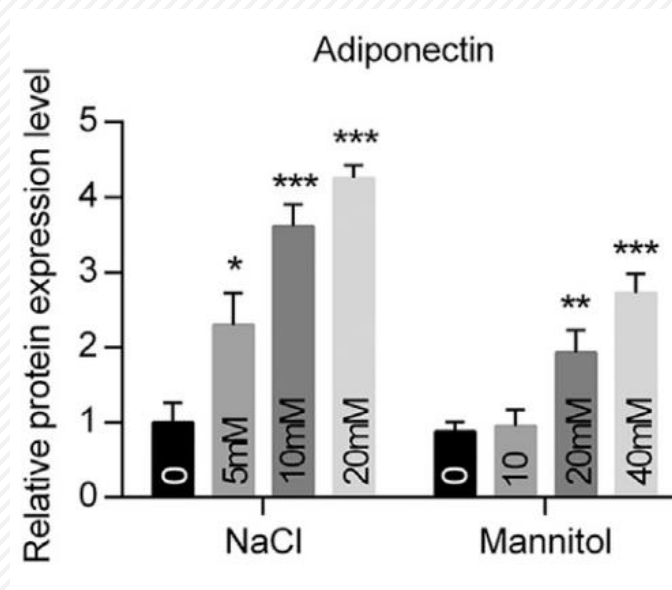
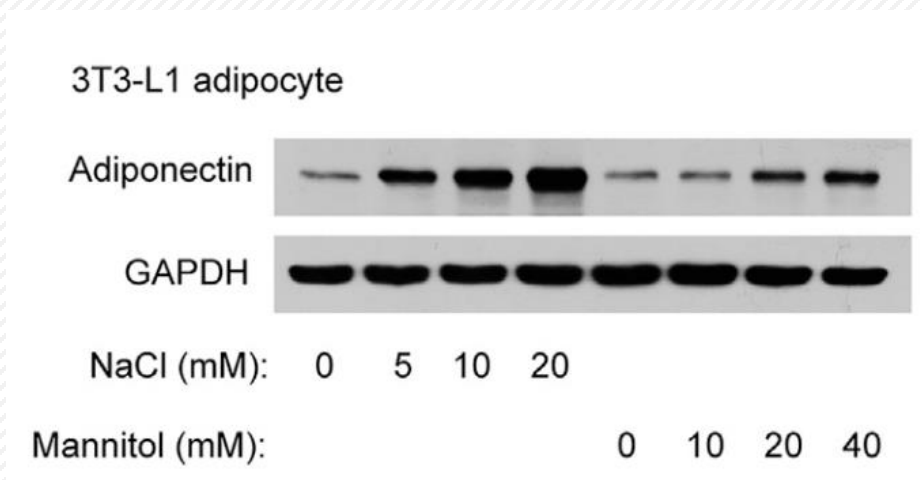
脂联素的mRNA在所有脂肪组织中都有表达，在肾、心脏、膀胱中均无表达，但脂联素蛋白在所有组织中均能检测到。

PPAR δ flox/flox小鼠和Fabp4-PPAR δ flox/flox小鼠的在体实验

- ◆ PPAR δ flox/flox小鼠中，HSD摄食可显著促进肾周脂肪和肾皮质脂联素表达。
- ◆ Fabp4-PPAR δ flox/flox小鼠中，HSD摄食对肾周脂肪和肾皮质脂联素表达的影响减弱。
- ◆ 同时，Fabp4-PPAR δ flox/flox小鼠的血浆脂联素水平也更低。

3T3-L1脂肪细胞系实验

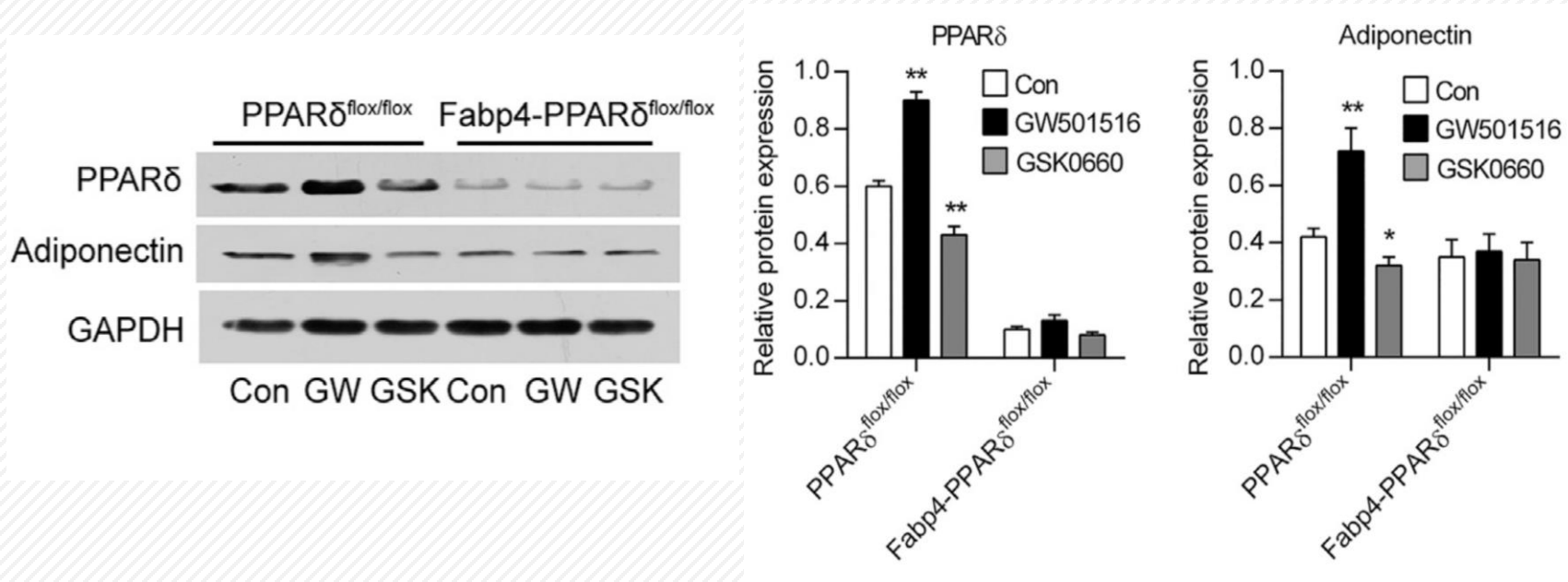
用不同浓度的NaCl和Mannitol处理后，检测脂联素水平



同样在3T3-L1脂肪细胞中，NaCl和Mannitol对脂联素表达水平的促进作用呈剂量依赖性增加。

PPAR δ flox/flox小鼠和Fabp4-PPAR δ flox/flox小鼠原代脂肪细胞实验

用PPAR δ 的激动剂GW501516和PPAR δ 的拮抗剂GSK0660处理之后检测脂联素的蛋白表达水平。

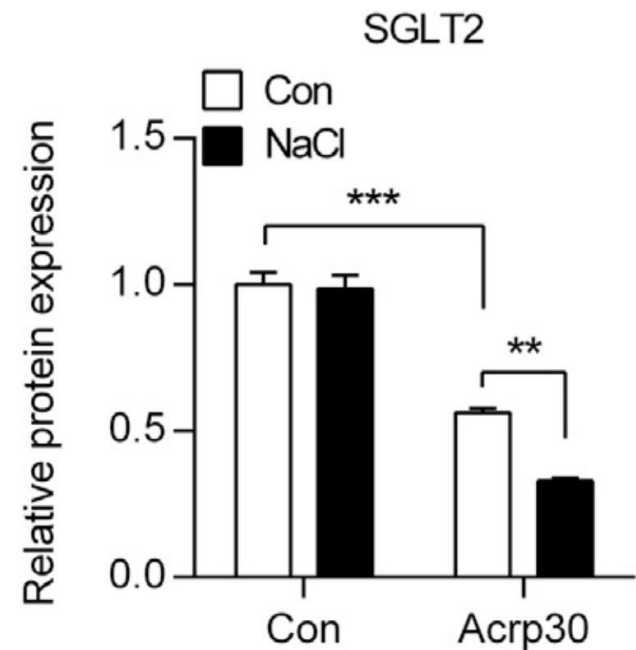
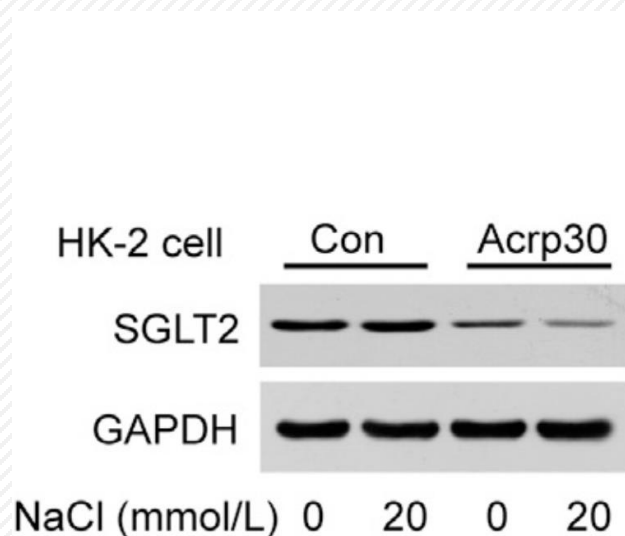
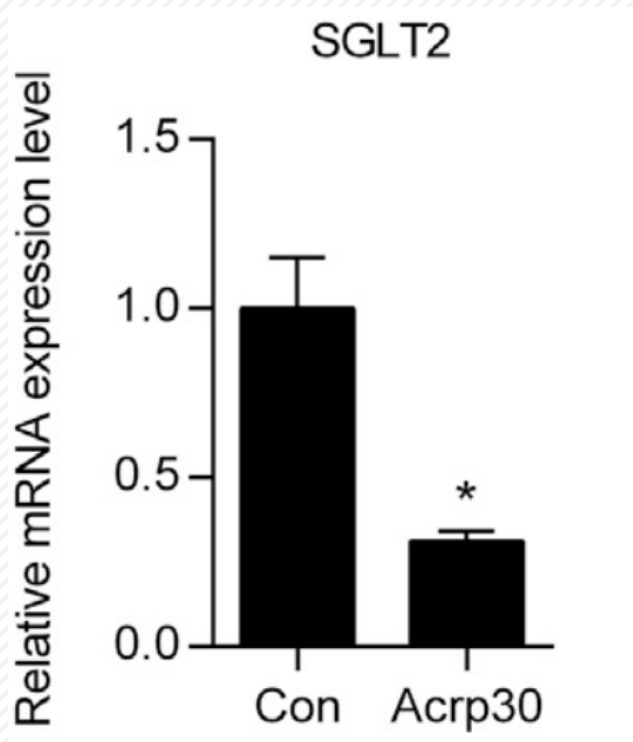


这三个结果说明，高钠摄入介导的肾脂联素升高与脂肪PPAR δ 的激活有关。

在PPAR δ flox/flox小鼠脂肪细胞中，PPAR δ 的激动剂显著促进了脂联素的表达，而PPAR δ 的拮抗剂显著抑制了脂联素的表达。而在Fabp4-PPAR δ flox/flox小鼠脂肪细胞中对脂联素的表达没有显著影响。

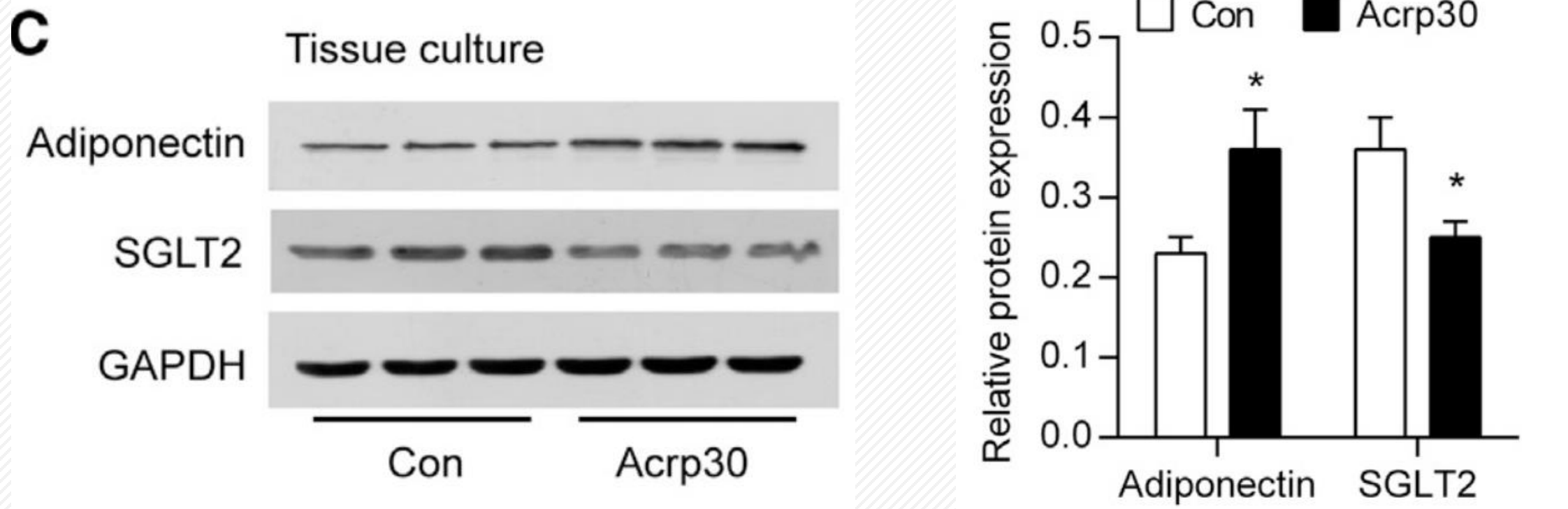
为了确定脂联素是否通过PPAR α 对SGLT2表达产生影响。

使用Acrp30对HK-2细胞在高钠介质存在或不存在的条件下进行处理。



单独用Acrp30处理，可显著抑制SGLT2 mRNA表达水平。高钠和Acrp30共同处理可加重对SGLT2的抑制作用。

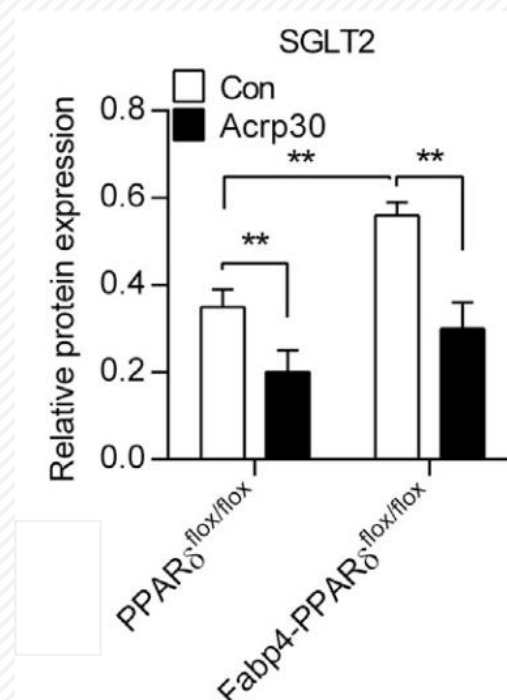
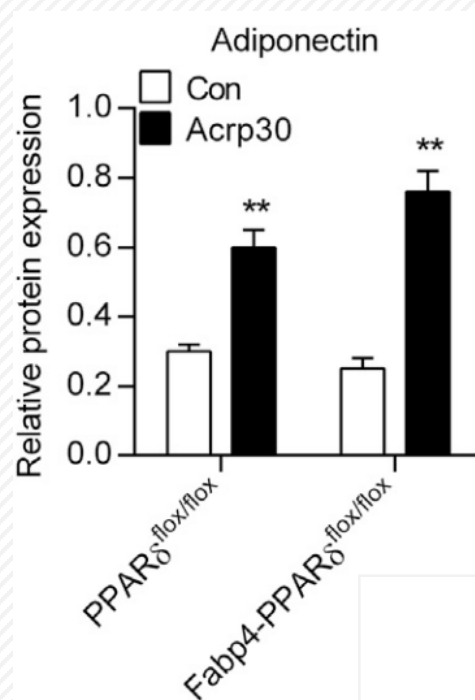
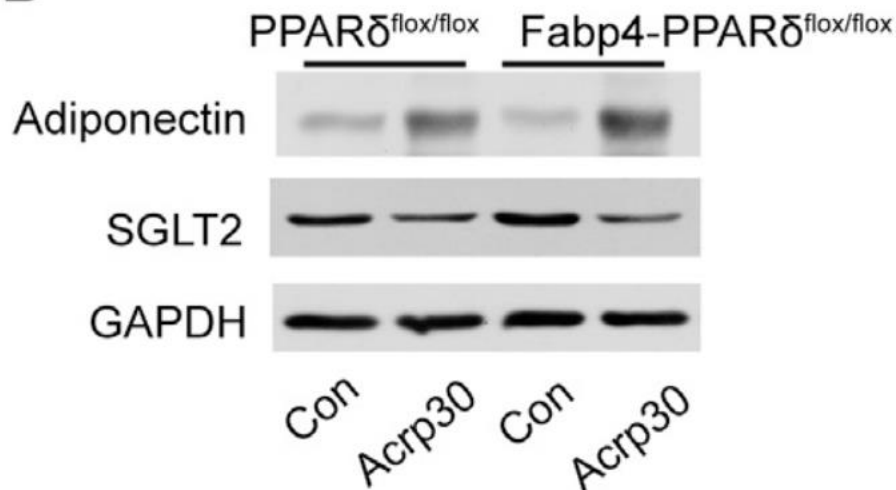
用 Acrp30 处理体外培养的C57BL/6小鼠肾皮质组织



同样，在体外C57BL/6小鼠肾皮质组织培养中，Acrp30显著抑制了SGLT2的表达。

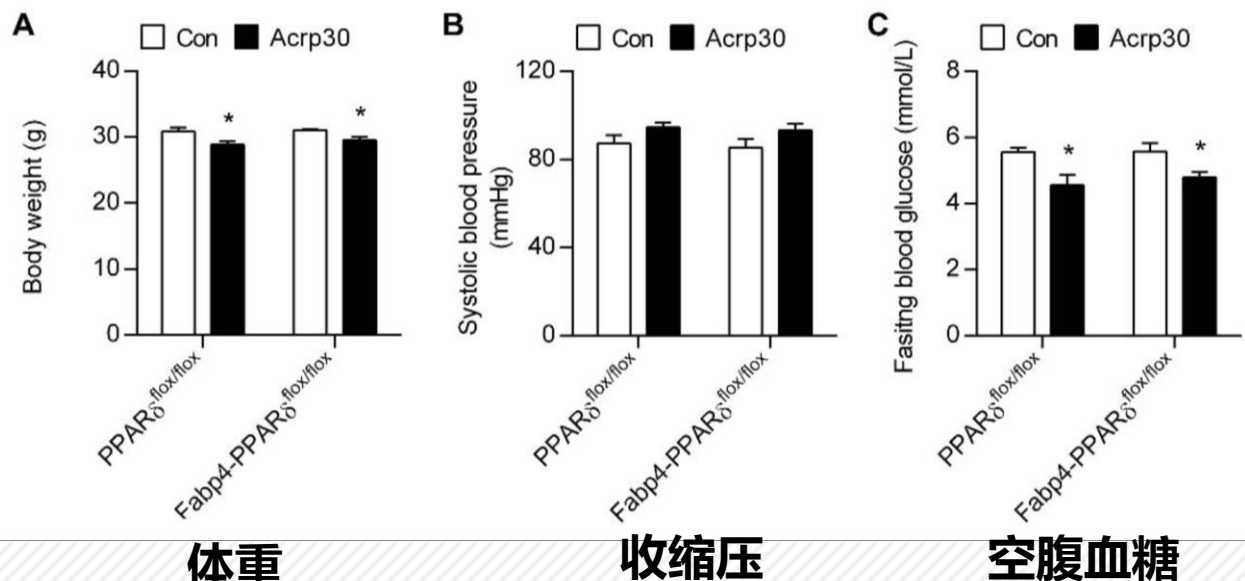
对PPAR δ ^{flx/flx}小鼠和Fabp4-PPAR δ ^{flx/flx}小鼠进行4周的Acrp30处理

D



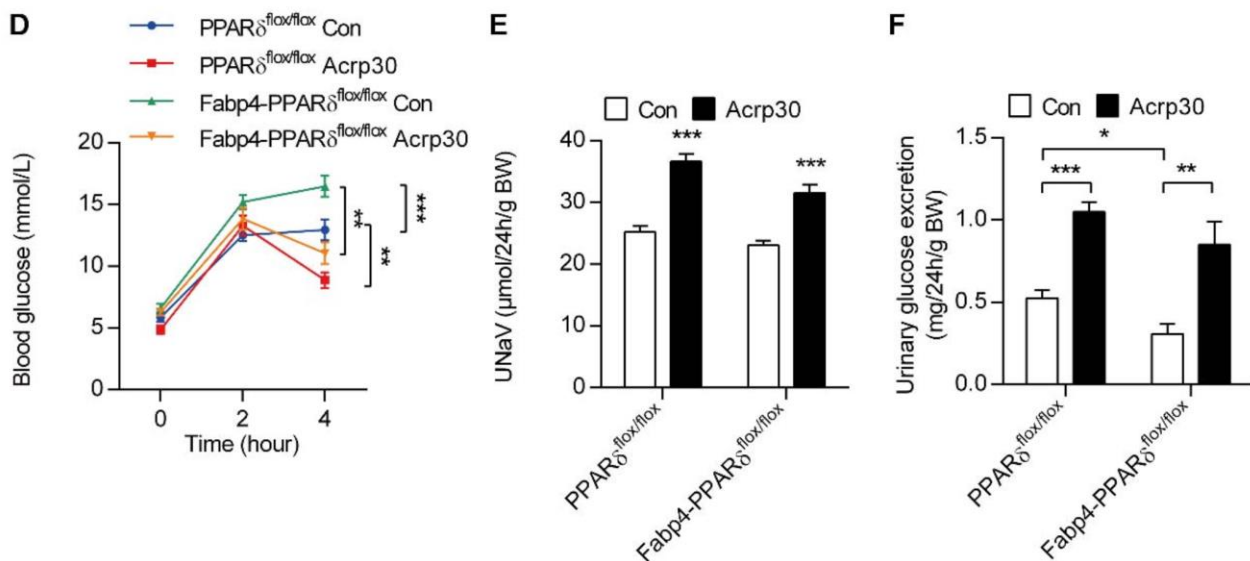
Acrp30处理4周后，脂联素的表达增加，但PPAR δ ^{flx/flx}和Fabp4-PPAR δ ^{flx/flx}小鼠肾脏中SGLT2的表达水平均显著降低。

说明脂联素对SGLT2的抑制作用与PPAR δ 无关。



(A B C) Acrp30处理, 降低了 PPAR δ ^{flox/flox}和Fabp4-PPAR δ ^{flox/flox}小鼠的体重和空腹血糖水平, 但不影响血压。

(D E F) 口服葡萄糖耐量, acrp30处理不仅降低PPAR δ ^{flox/flox}和Fabp4-PPAR δ ^{flox/flox}小鼠的血糖水平, 而且增加了Na和糖的排泄量。



上述3个实验的结果表明, 脂联素对 SGLT2的抑制作用和对Na尿排泄、糖尿排泄的作用与PPAR δ 无关。

脂联素在 PPAR δ 抑制 SGLT2 表达中到底起到一个什么样的作用呢?



为了进一步确定脂联素在 PPAR δ 抑制SGLT2表达中的重要作用

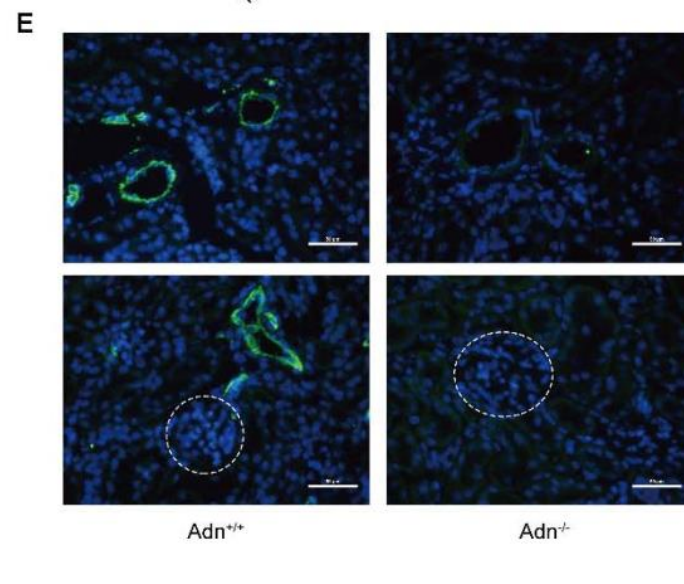
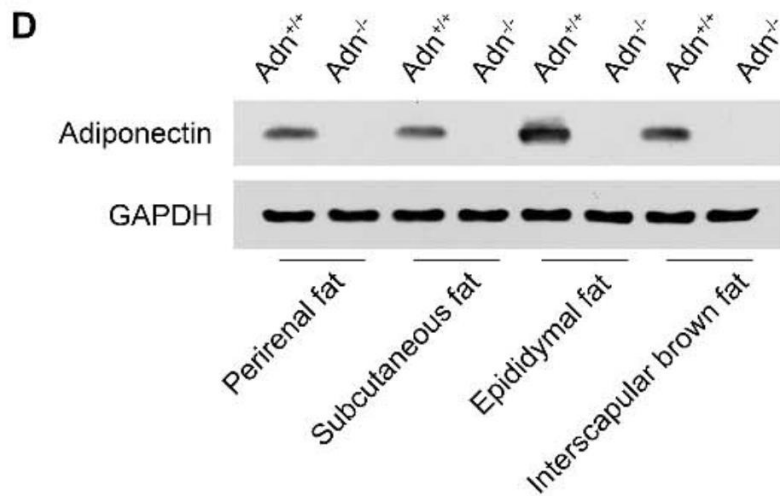
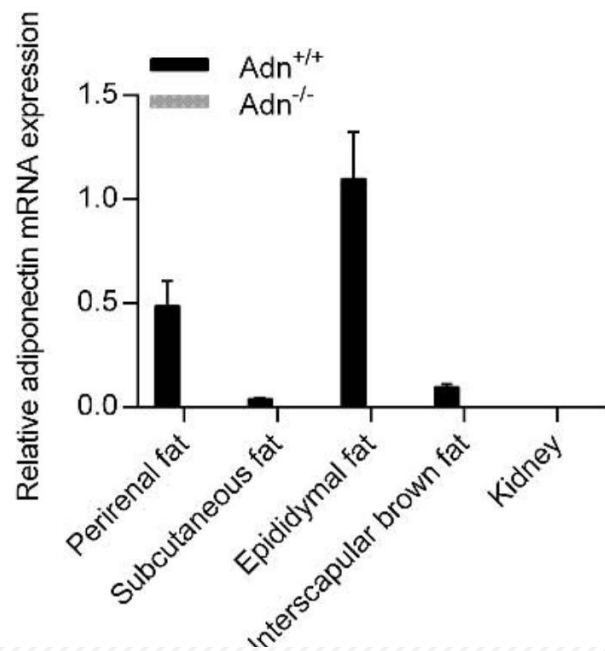


对Adn小鼠的脂联素基因进行敲除



- ◆ PPAR δ 处理后肾周围脂肪和肾皮质中PPAR δ 和脂联素的表达。
- ◆ 检测收缩压及其变化、体重和摄食量
- ◆ 空腹血糖水平、糖耐量能力、胰岛素水平
- ◆ 尿量、Na排泄量、血浆和肾周围脂肪的Na含量、血浆醛固酮含量

对Adn小鼠的脂联素基因敲除

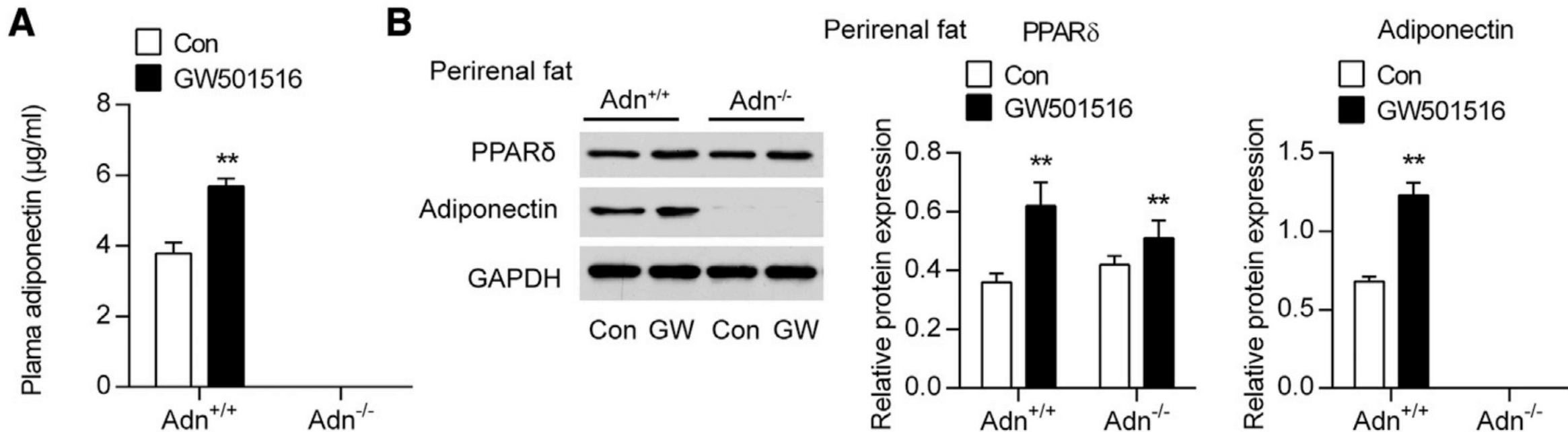


肾皮质切片免疫荧光

敲除之后的Adn^{-/-}小鼠各个组织，及肾皮质中均无脂联素的表达。

用 PPAR δ 激动剂GW501516对 Adn小鼠注射7天

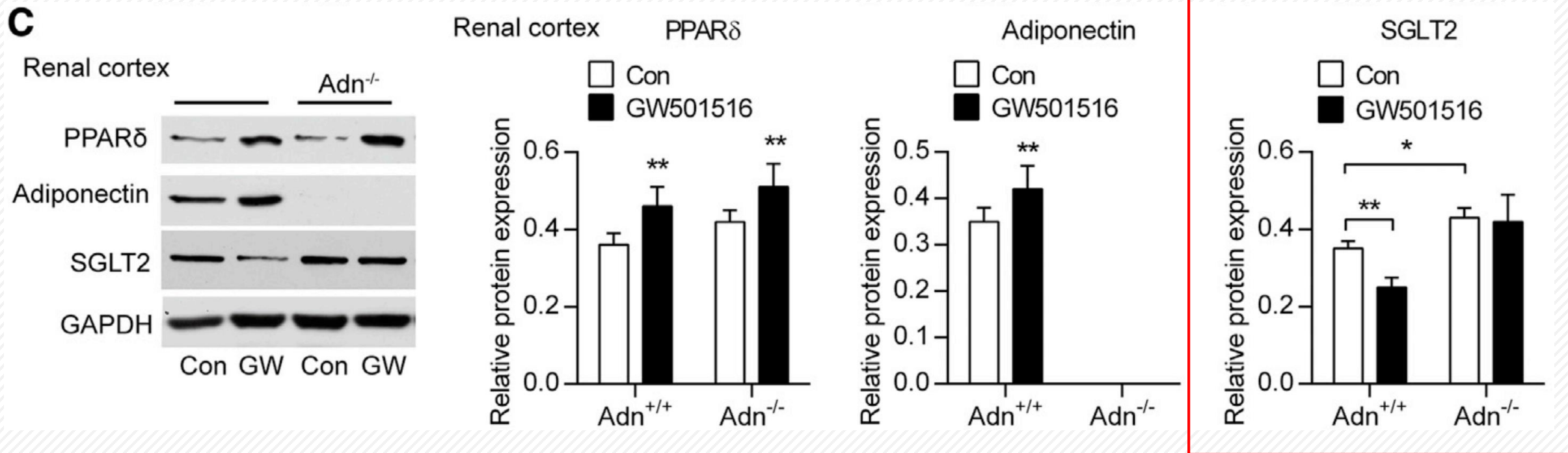
肾周围脂肪



脂联素的缺乏不影响PPAR δ 的表达。

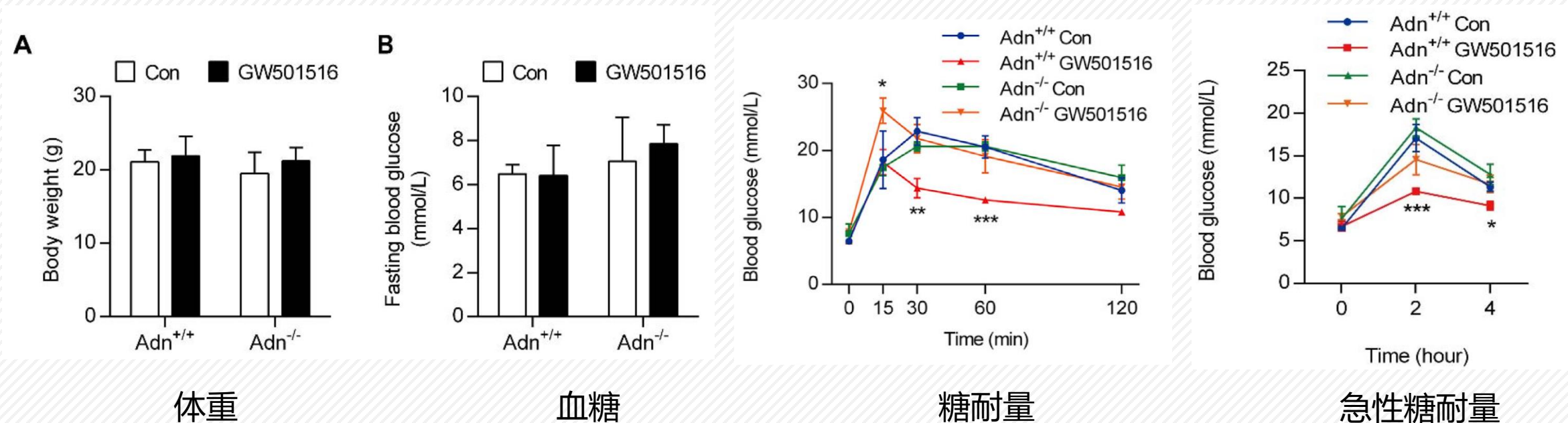
GW501516可显著提高Adn^{+/+}小鼠血浆脂联素水平和肾周脂肪脂联素的表达，但这些作用在Adn^{-/-}小鼠中没有出现。

肾皮质



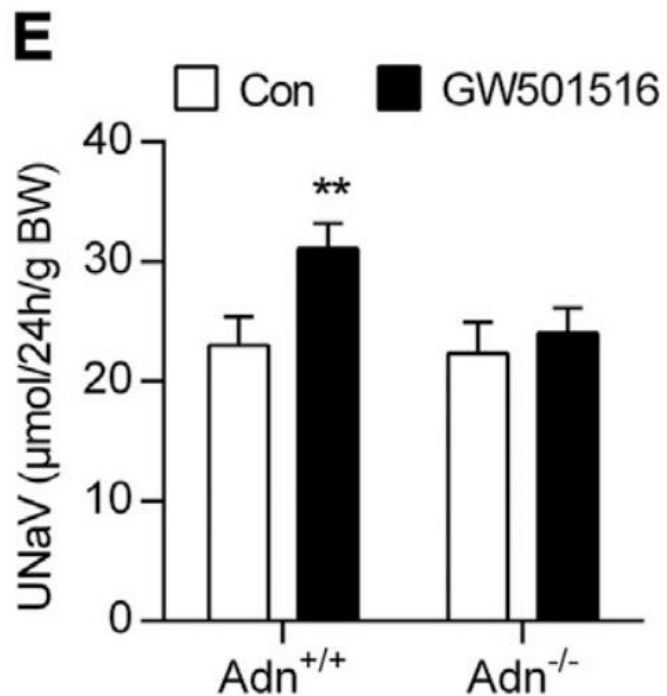
脂联素的缺乏不影响PPAR δ 的表达。

更重要的是，GW501516只抑制了Adn^{+/+}小鼠肾皮质中SGLT2的表达，而对Adn^{-/-}小鼠肾皮质中SGLT2表达的增加没有影响。说明，PPAR δ 对SGLT2的抑制作用可能依赖于脂联素的水平。

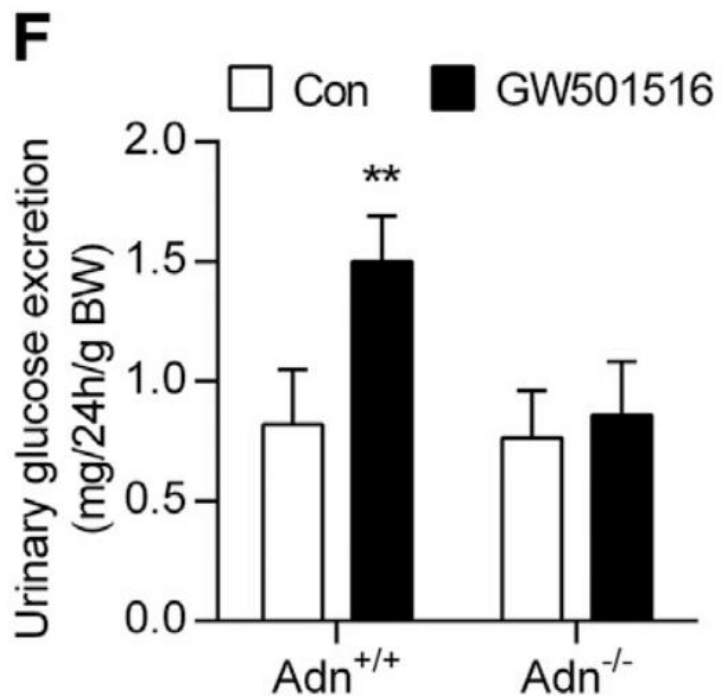


GW501516处理没有改变两种小鼠的体重和空腹血糖水平，改善了Adn^{+/+}小鼠的糖耐量，但没有改善Adn^{-/-}小鼠的糖耐量。

此外，在Adn^{+/+}小鼠急性口服葡萄糖后，GW501516可显著降低血糖水平，但这种作用在Adn^{-/-}小鼠中明显减弱。



Na尿排泄量



糖尿排泄量

GW501516只促进了Adn^{+/+}小鼠的Na和糖的排泄量，而对Adn^{-/-}小鼠没有影响。

以上结果说明:

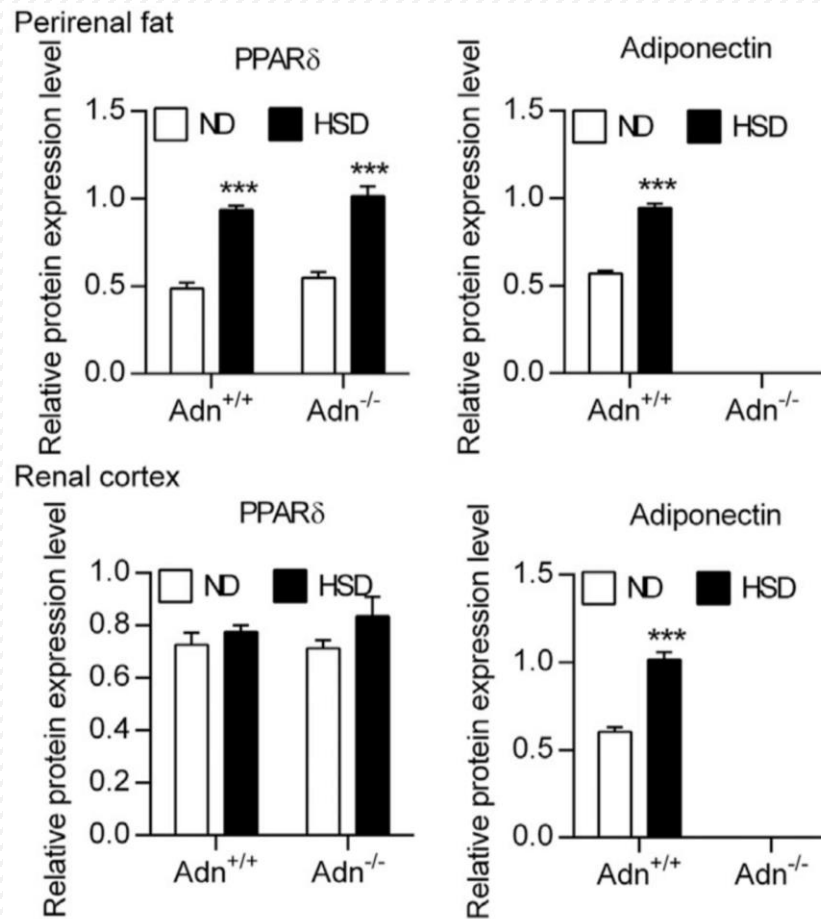
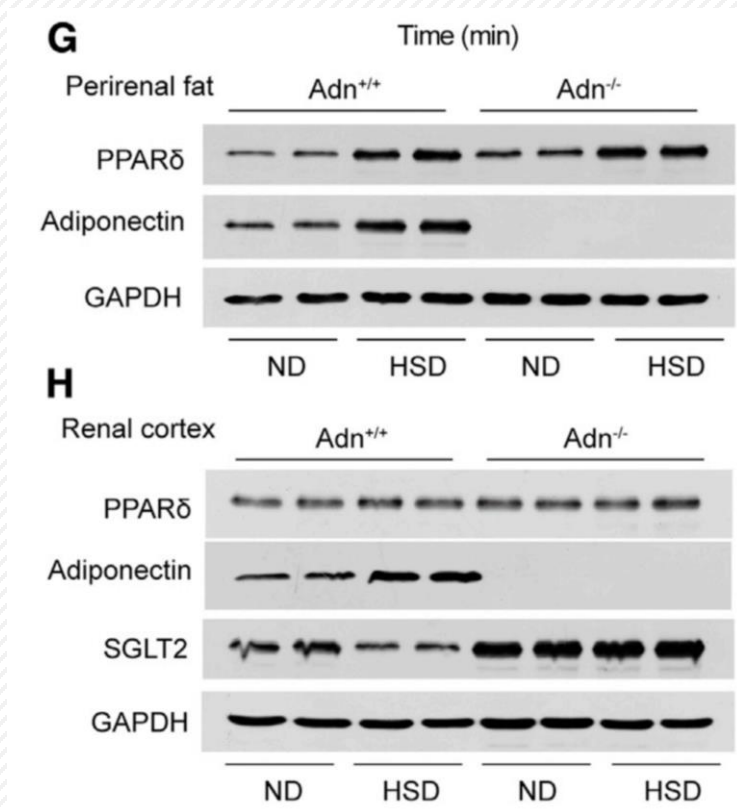
- ◆ 脂联素缺乏对PPAR δ 在肾周脂肪和肾皮质中的表达没有影响。
- ◆ PPAR δ 依赖脂联素对SGLT2的表达产生抑制。

**为了进一步证明高钠摄入是否影响**

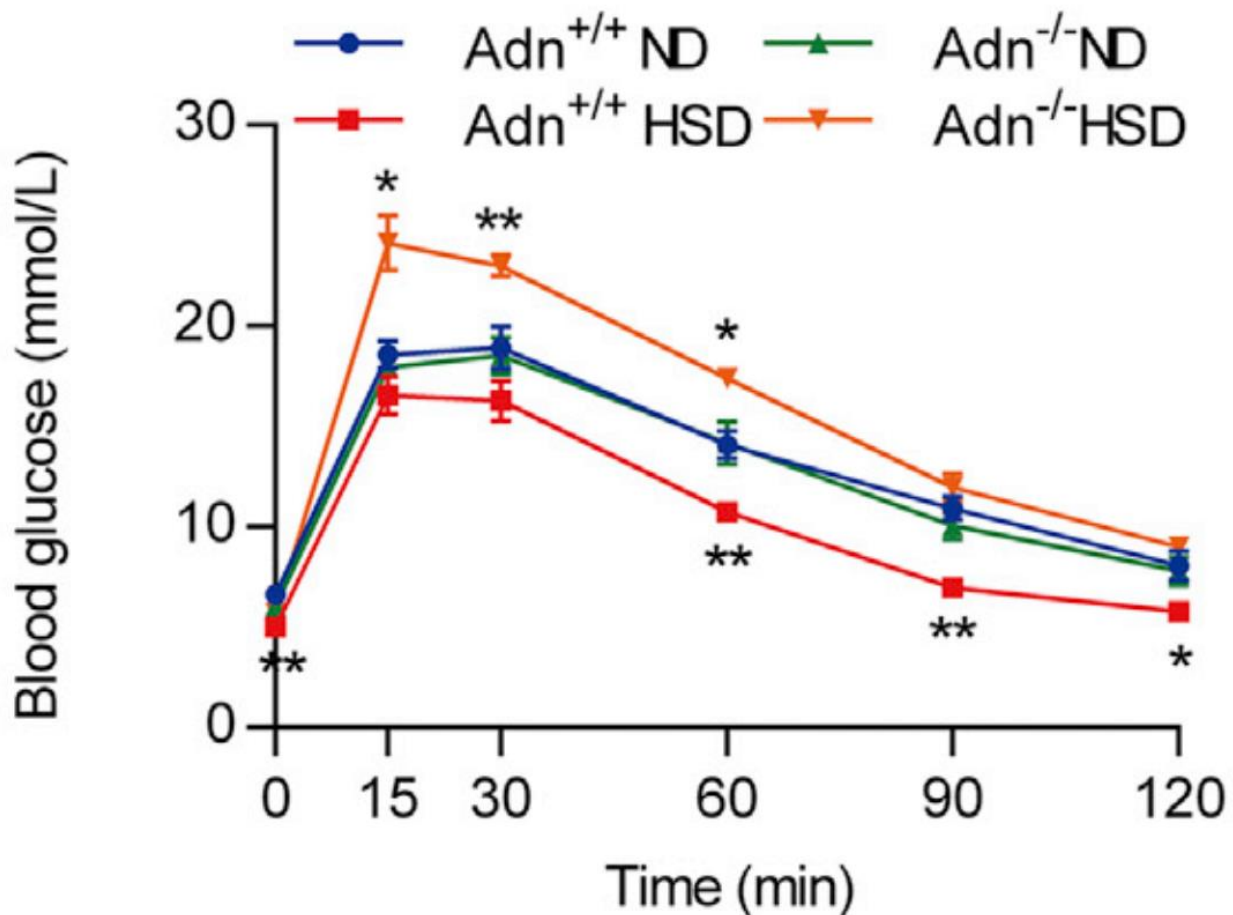
- ◆ PPAR δ 依赖脂联素对SGLT2的表达的抑制作用。



用ND和HSD饮食喂养Adn^{+/+}小鼠和And^{-/-}小鼠12周

用ND和HSD饮食喂养Adn^{+/+}小鼠和Adn^{-/-}小鼠12周

肾周围脂肪SGLT2表达显著增强，高钠摄入对Adn^{-/-}小鼠肾脏SGLT2表达的抑制作用被消除。



高钠摄入对葡萄糖耐量的改善被脂联素缺乏症逆转。

这些结果表明，在高钠刺激下，PPAR δ 活化对SGLT2的抑制作用依赖于脂联素。

进一步证明了脂联素脂联素缺乏既不影响PPAR δ 在肾周脂肪和肾皮质中的表达，也不影响高钠摄入对小鼠肾周脂肪PPAR δ 表达的影响。

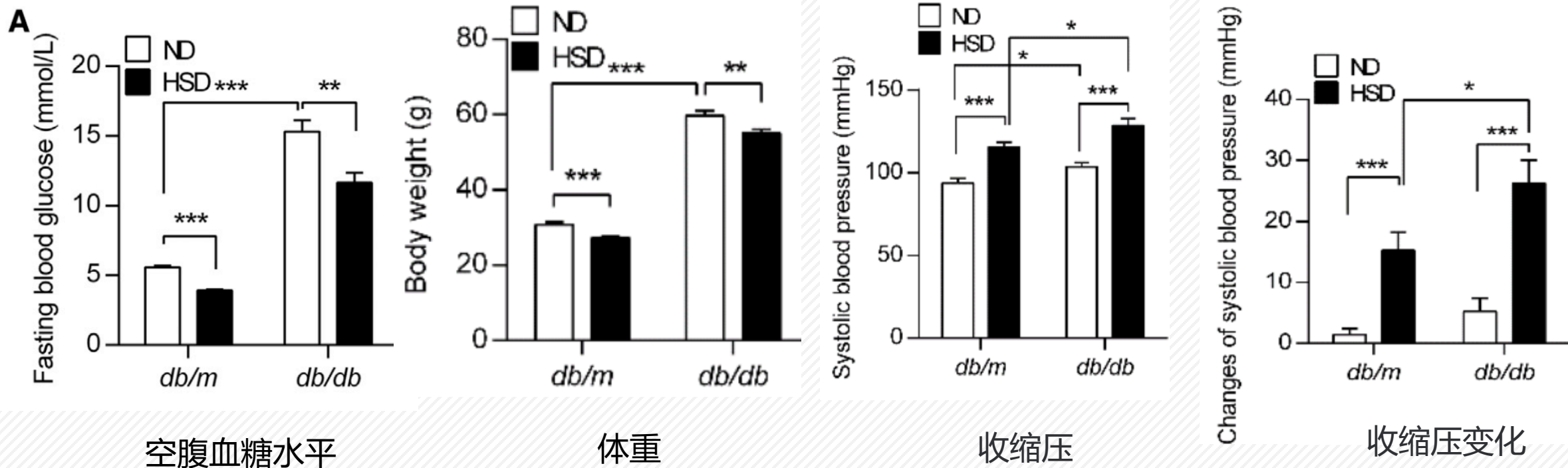
为了了解高钠摄入如何影响高血糖时的血糖



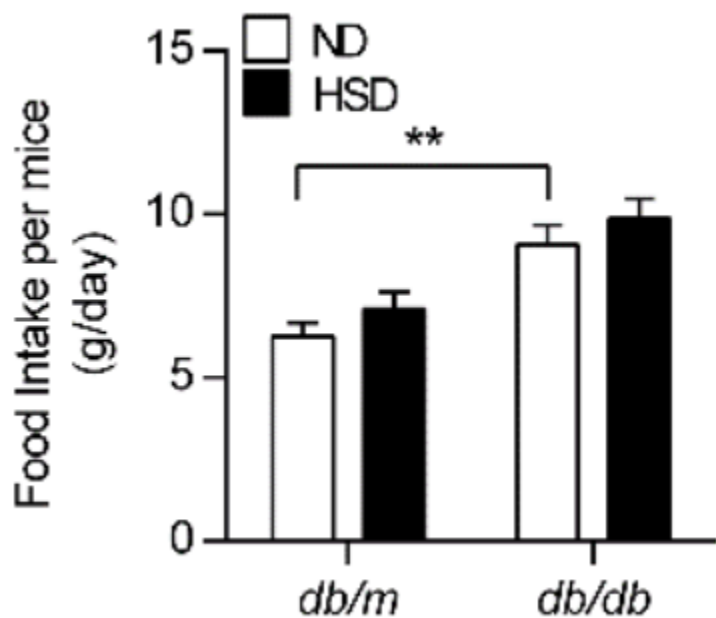
对糖尿病性db/db小鼠及对照db/m小鼠进行了HSD24周的喂养。



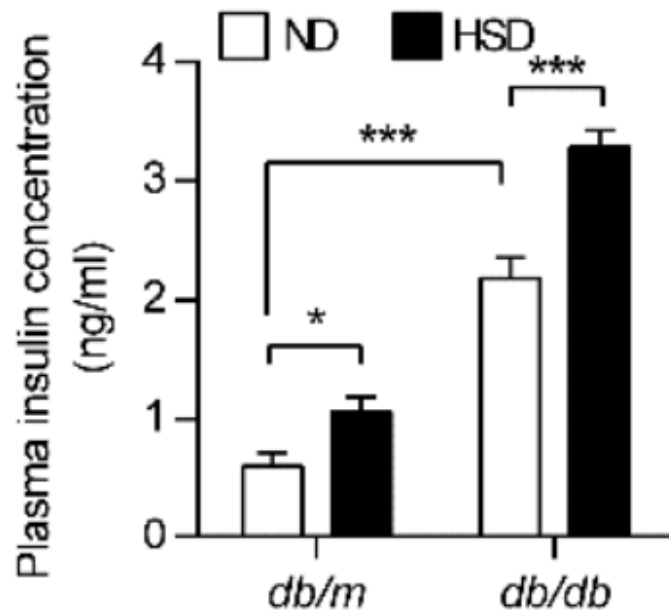
- ◆ 检测空腹血糖水平、收缩压及其变化、体重和摄食量、胰岛素水平
- ◆ 血浆醛固酮、 Na^+ 、 Cl^+ 含量。
- ◆ 糖耐量能力、尿量、Na排泄量、血浆和肾周围脂肪的Na含量、血浆醛固酮含量



高钠摄入均可降低db/db小鼠和db/m小鼠的体重和空腹血糖水平。同时升高血压。

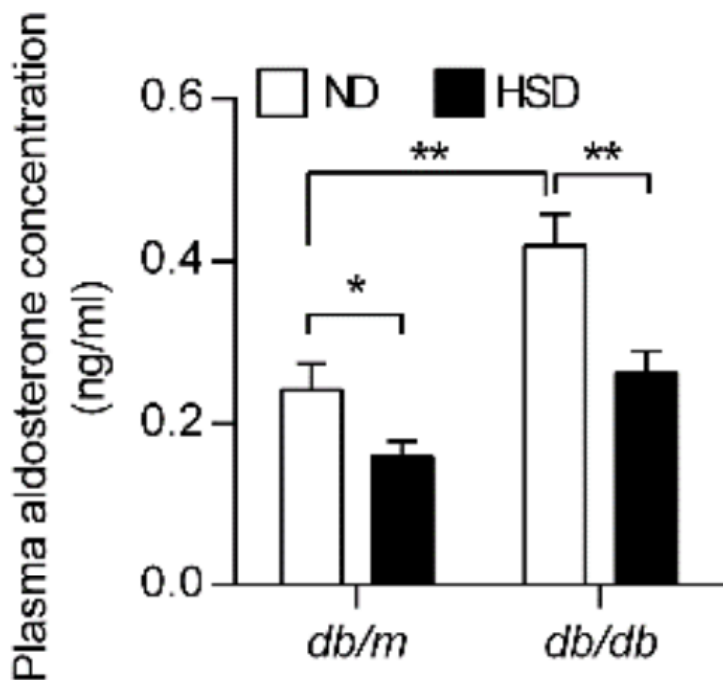


食物摄取

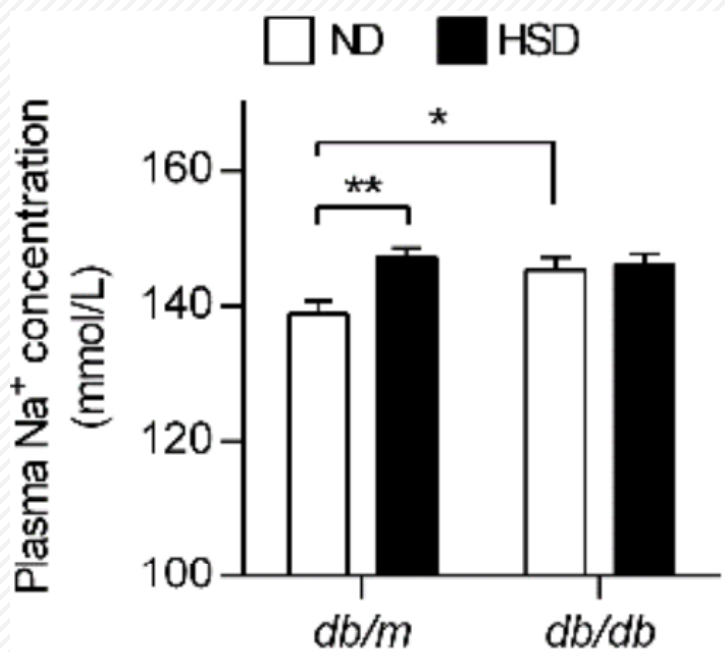
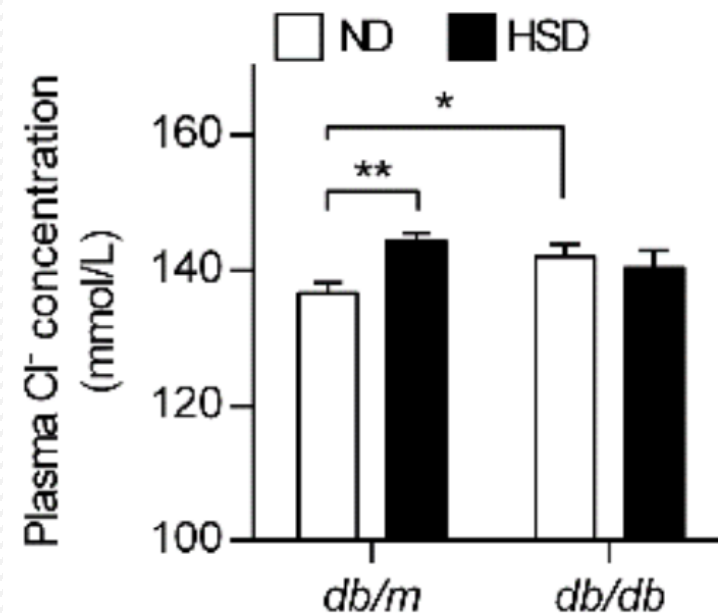


血胰岛素

两组的HSD饮食对食物摄入量无显著性差异，高钠摄入显著提高了db/m小鼠的血浆胰岛素水平，特别是db/db小鼠。

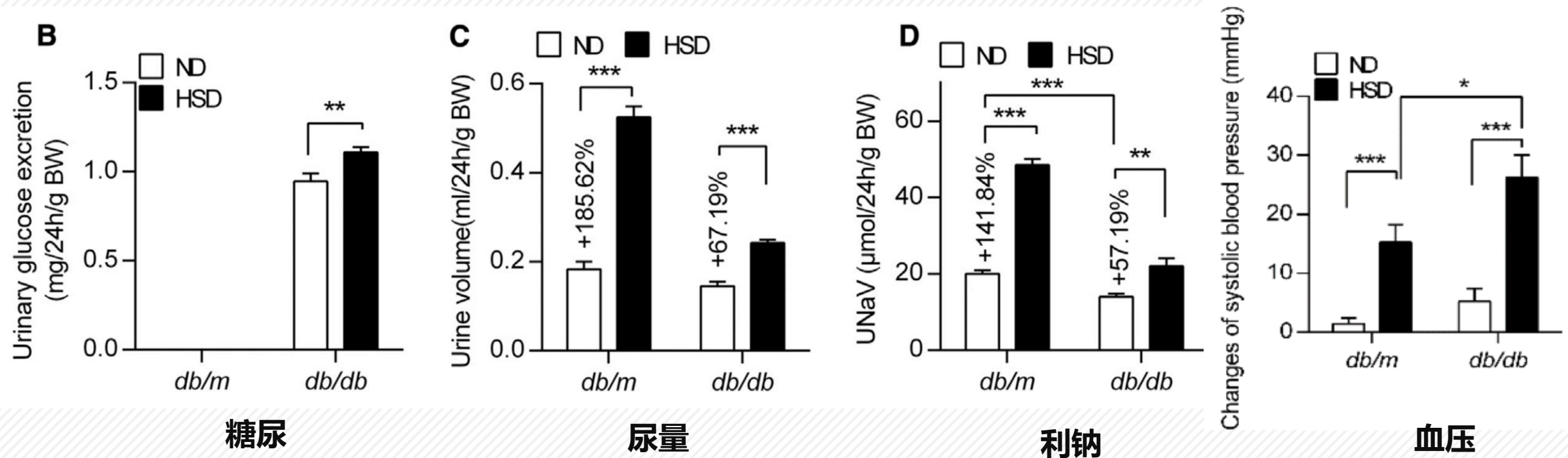


血浆醛固酮

血浆Na⁺含量血浆Cl⁻含量

db/db小鼠血浆醛固酮水平、钠、氯浓度高于db/m小鼠，提示糖尿病小鼠存在钠潴留状态。

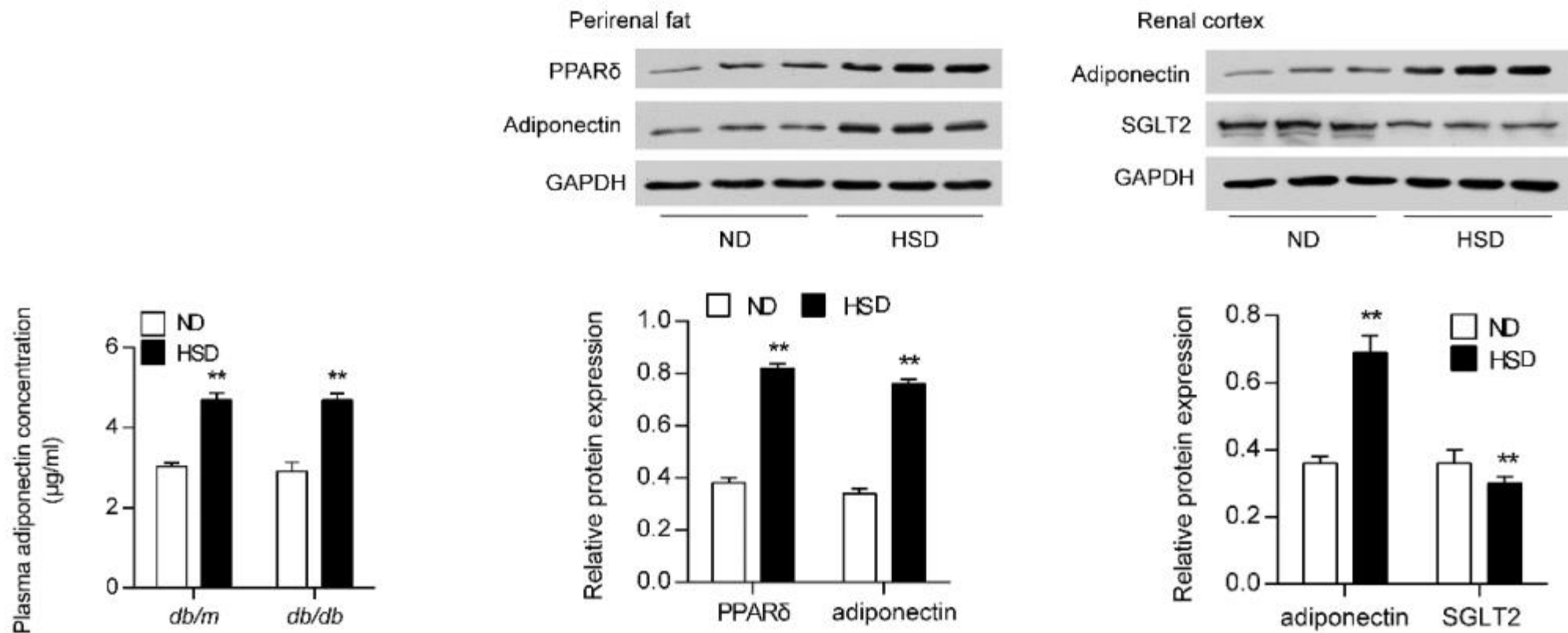
虽然高钠摄入也降低了血浆醛固酮水平，但db/db小鼠血浆钠浓度没有出现显著变化。



高盐摄入不仅增加了两种小鼠的血压和利钠，还增加了尿量和糖尿。并且db/db小鼠的HSD利钠水平显著低于对照组小鼠。

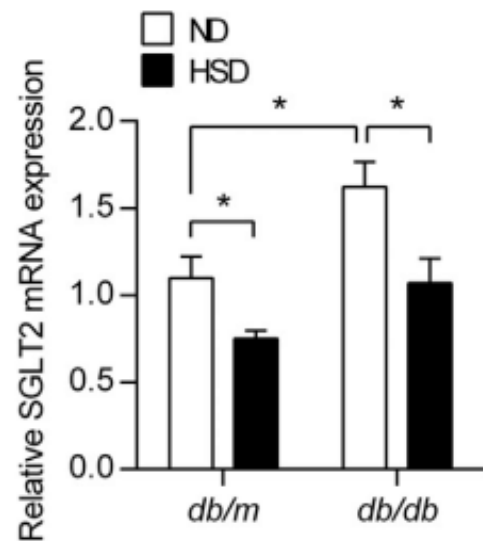
这说明糖尿病db/db小鼠对HSD的利钠作用受损。

糖尿病db/db小鼠对HSD的利钠作用是如何受损的？

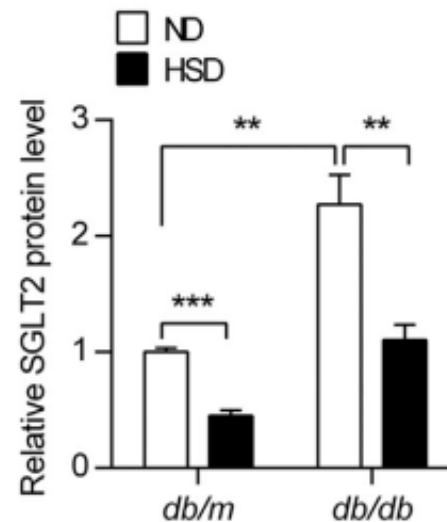
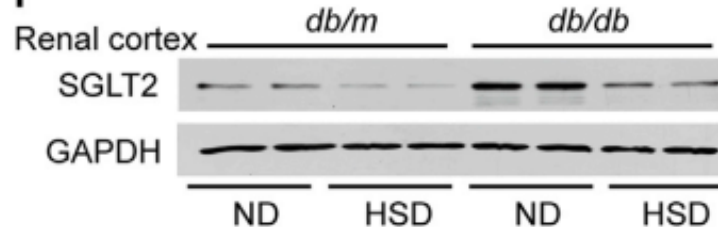


与db/m小鼠相似，高钠摄入也会提高血浆脂联素水平、肾周围脂肪及肾皮质的PPAR δ 和脂联素的表达，同时降低db/db小鼠肾SGLT2的表达。

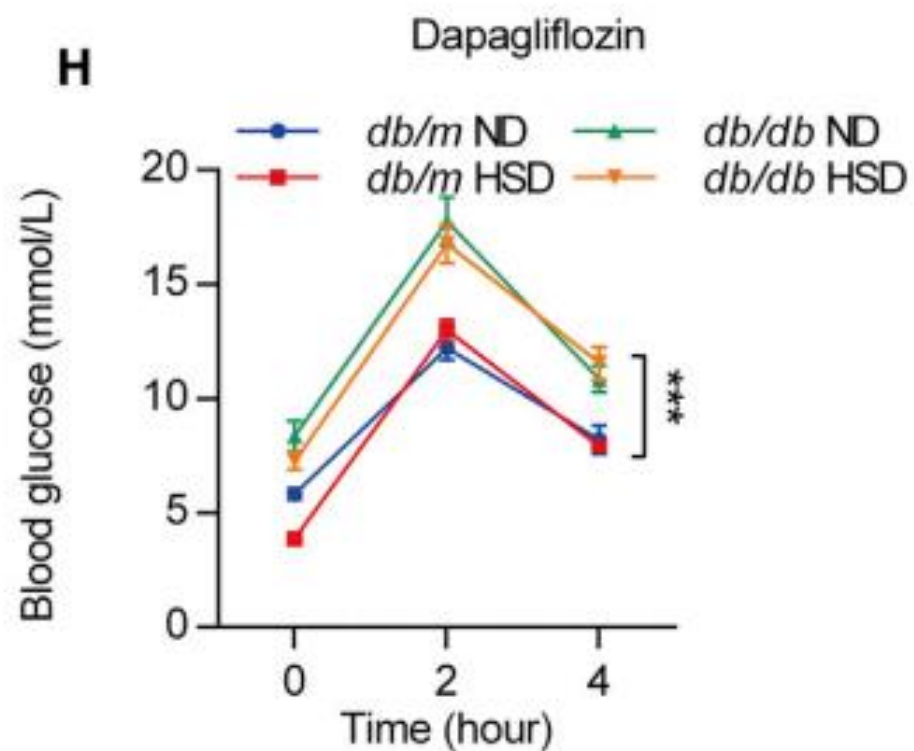
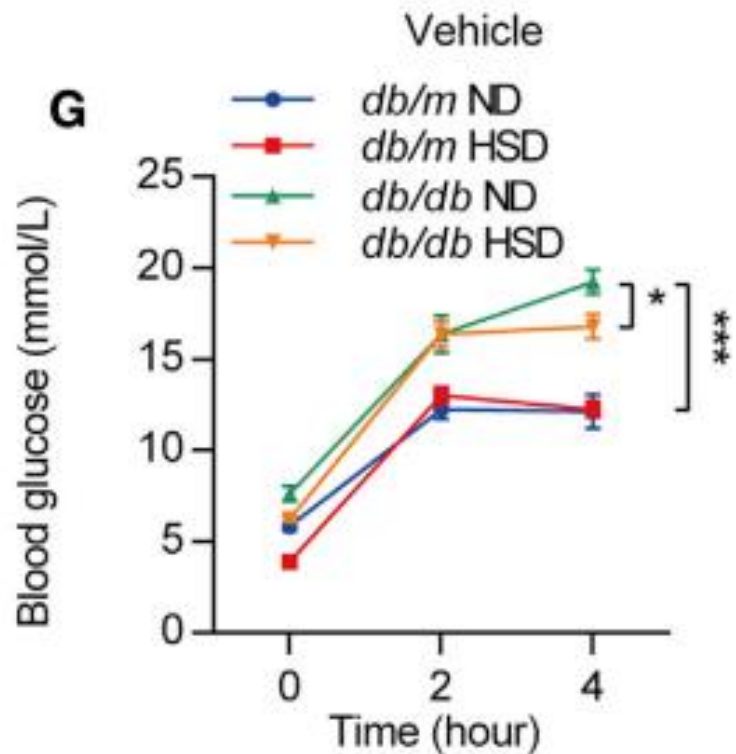
E



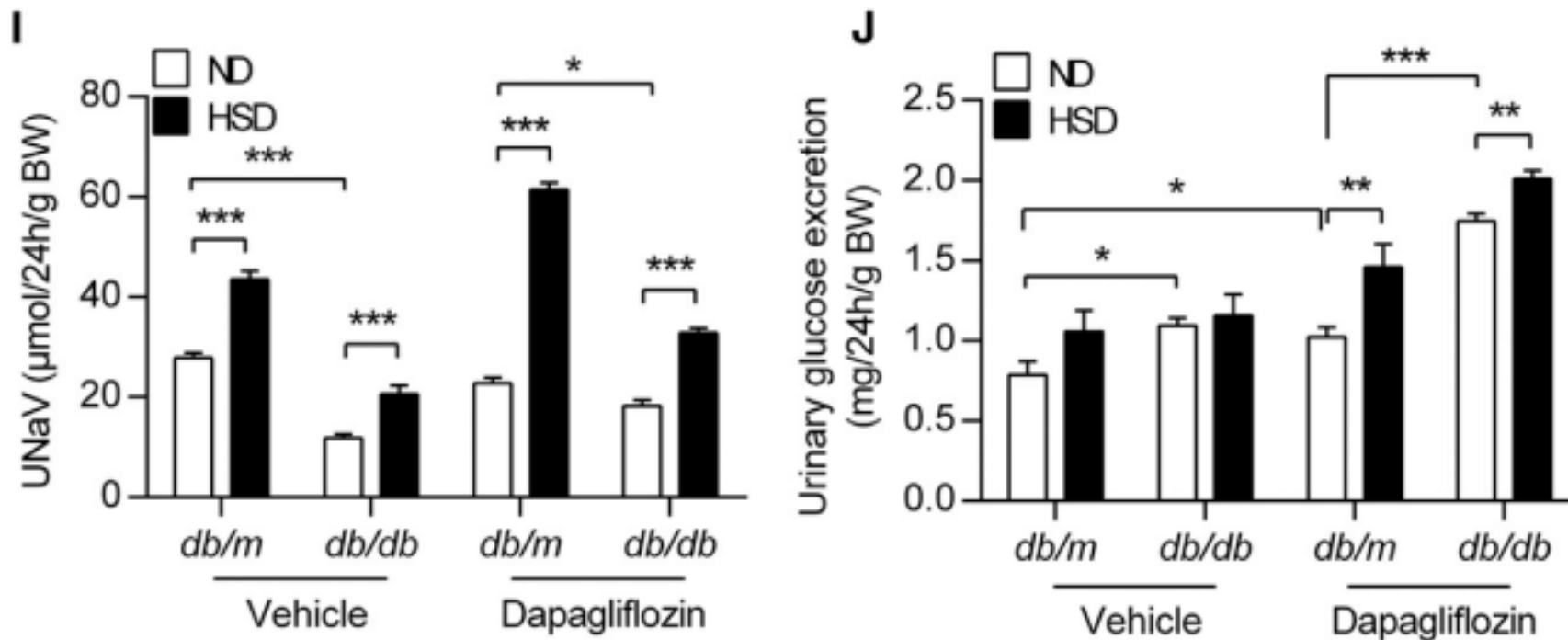
F



高钠摄入可降低肾皮质SGLT2的表达，但肾SGLT2在db/db小鼠中的表达明显高于db/m小鼠。



Dapagliflozin处理虽然阻止了高钠摄入对db/db小鼠血糖水平的抑制作用，但并没有消除db/m与db/db小鼠的血糖差异。

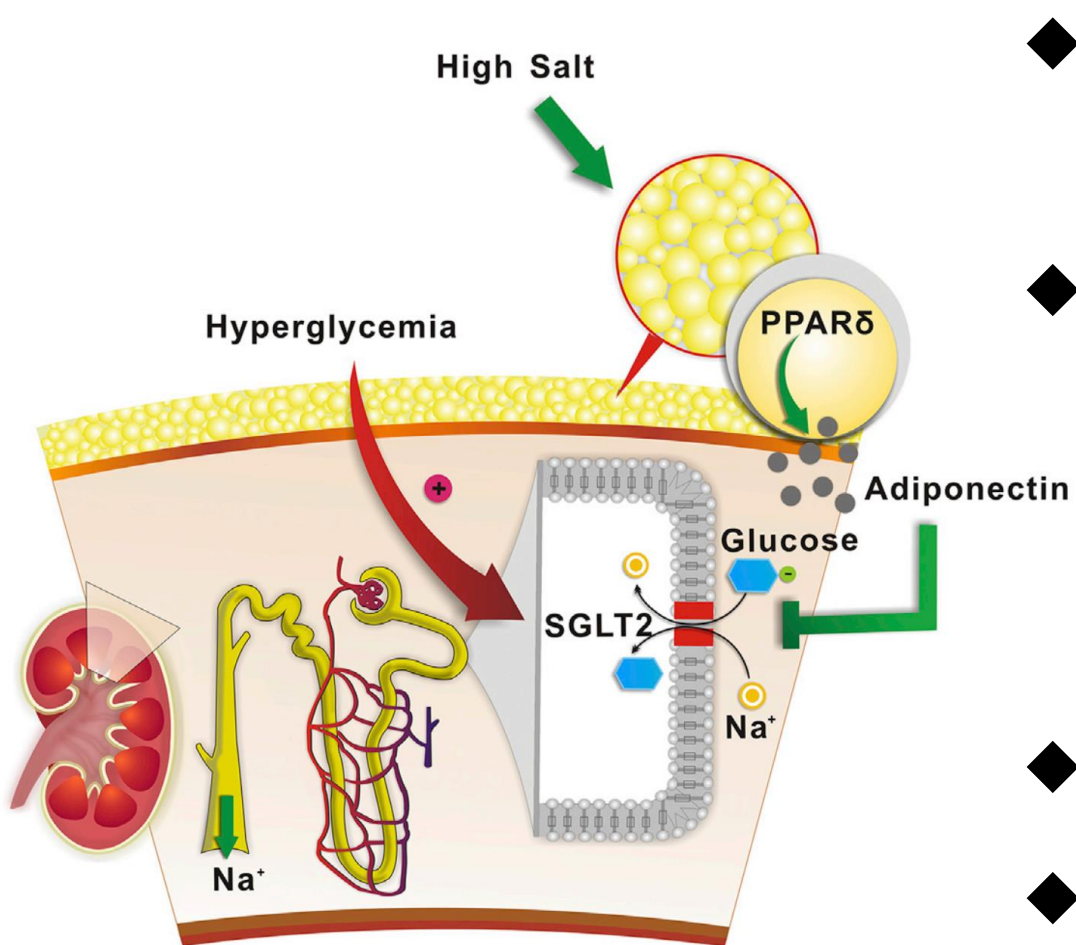


Dapagliflozin处理后，db/db小鼠高钠摄入增加了利钠尿和糖尿，但其作用远远小于db/m小鼠。

这些结果表明，在高钠摄入的情况下，由于SGLT2活性增加而导致的尿钠减少发生在**糖尿病**中。这与之前在非糖尿病小鼠中的结果相反。

3

结论



- ◆ 脂肪PPAR δ 激活引起小鼠钠尿的作用，这一作用此前未被发现。
- ◆ 这种肾脏益处与脂联素介导的抑制肾SGLT2有关。然而，糖尿病患者在高钠摄入时维持适当钠代谢的途径受损，这一缺陷可能导致高血糖引起的钠潴留。
- ◆ 维持血糖正常是影响尿钠的一个关键因素。
- ◆ 这些发现提供了关于PPAR δ /脂联素/SGLT2通路在调节钠和葡萄糖稳态中的生理作用的见解。

敬请各位老师同学批评指正！

报告人：赵文丽

时间：2019年07月07日