

Sirt1 在辐射诱导的 IL-1 β 表达中的作用

付岳¹ 王彦¹ 杜利清¹ 徐畅¹ 曹嘉¹
陈凤华¹ 郭艳婷¹ 刘建香² 刘强¹ 樊飞跃¹ 苏旭²

¹ (中国医学科学院放射医学研究所 天津市分子核医学重点实验室 天津 300192)

² (中国 CDC 辐射防护与核安全医学所 北京 100088)

摘要 研究 Sirt1 蛋白对间充质干细胞 (MSCs) 受照射后产生的炎症因子 IL-1 β 的影响, 探讨 Sirt1 蛋白在辐射防护中的作用。shRNA 体外沉默间充质干细胞 Sirt1 基因转录, 检测细胞内 Sirt1 mRNA 表达证实基因沉默效果; 同时给予间充质干细胞 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白藜芦醇, 经 4 Gy 照射后, 用 ELISA、Western blot 和 RT-PCR 等方法检测 Sirt1 沉默对 IL-1 β 分泌和表达的影响。结果表明, 照射前沉默 Sirt1 基因并给间充质干细胞 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白藜芦醇, 与照射前单纯给予 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白藜芦醇相比, 辐射引起的 IL-1 β 分泌显著升高 ($t=18.57, p<0.05$), 同时细胞内 IL-1 β 蛋白表达和 mRNA 水平也显著升高 ($t=8.078, p<0.05$)。沉默 Sirt1 后可明显抑制白藜芦醇的辐射保护作用, 提示 Sirt1 蛋白在辐射后产生炎症的过程中起到关键的调节作用。

关键词 Sirt1 蛋白, 间充质干细胞, 辐射防护, 白介素-1 β

中图分类号 TL71, R811.5

Sirt1 是一种依赖 NAD⁺ 的组蛋白去乙酰化酶, 通过去乙酰化作用调节转录沉默、DNA 损伤反应等重要细胞活动^[1]。一些重要的转录因子如 NF- κ B 和 p53 都是其靶蛋白, Sirt1 可以通过对它们进行去乙酰化加工进而参与体内众多生理功能的调节, 包括新陈代谢、炎症、细胞衰老、增殖和凋亡等^[2]。近期研究发现, Sirt1 蛋白在炎症过程中起到重要的作用^[3], 而 IL-1 β 是一种非常重要的炎症反应因子, 辐射应激可诱导细胞 IL-1 β 的表达升高, 进而导致细胞凋亡和组织损伤。为此, 本实验通过体外沉默间充质干细胞 Sirt1 基因的表达, 探讨 Sirt1 蛋白对辐射损伤后间充质干细胞 (MSCs) 产生的炎症因子的影响, 同时为针对 Sirt1 为靶点的辐射防护药物开发提供理论依据。

1 实验材料与方法

1.1 细胞株与载体构建

人 MSCs 由细胞产品国家工程研究中心赠送。

Sirt1 shRNA 慢病毒载体构建方法见文献[4]。

1.2 主要试剂和放射源

DMEM/F12 培养基和胎牛血清均购自美国 Gibco 公司; 白藜芦醇购自德国 Sigma 公司, 将其溶于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 储液浓度为 50 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$, 二甲基亚砜购自天津市江天化工科技有限公司。Quantikine ELISA human IL-1 β 试剂盒购自美国 R&D 公司。实验所用一抗为兔抗人 IL-1 β (Anti-IL1 beta antibody, ab2105), 鼠抗人 β -肌动蛋白 (Anti-beta Actin antibody, mAbcam 8226) 全部购自英国 Abcam 公司, PrimeScript RT 及 BCA 蛋白定量试剂盒购自日本 Takara 生物公司。¹³⁷Cs γ 射线照射源为加拿大产 (型号 USD), 剂量率为 0.873 Gy $\cdot\text{min}^{-1}$ 。

1.3 细胞培养, 实验分组及转染

MSCs 用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。实验

基金项目: 卫生部卫生行业科研专项 (201002009)、国家自然科学基金资助项目 (31200634, 31170804, 31240052)、天津市自然科学基金 (11ZCGYSY02400, 12JCYBJC15300)、协和青年基金资助和中央高校基本科研业务费专项资金 (2012J05, 2012G01) 和北京协和研究生院创新基金资助

第一作者: 付岳, 男, 1986 年 7 月出生, 2008 年毕业于沈阳药科大学, 现为中国医学科学院放射医学研究所读博士生, 放射医学专业

通讯作者: 刘强, Email: liuqiang@irm-cams.ac.cn

收稿日期: 初稿 2013-05-16, 修回 2013-06-24

分组: ①空白对照组: 未做任何处理; ②单纯照射组: 对细胞进行 4 Gy 照射; ③单纯 RNA 干扰组: 使用慢病毒载体将 Sirt1shRNA 转染进入细胞; ④白藜芦醇组: 给予细胞 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的白藜芦醇作为阳性对照; ⑤RNA 干扰加白藜芦醇组: 使用慢病毒载体将 Sirt1shRNA 转染进入细胞, 再给予细胞 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的白藜芦醇。当细胞生长至对数生长期时进行实验, Sirt1shRNA 转染 48 h 后, 对各组细胞进行 4 Gy 照射, 并在照射前 1 h 预先给予白藜芦醇, 照射后 24 h 提取细胞培养液上清、细胞总蛋白和总 RNA。

1.4 酶联免疫吸附实验(ELISA)

严格按照 Human IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA 试剂盒中说明书的方法进行操作。取 $200 \mu\text{L}$ 细胞培养液上清, 加入至包被好 IL-1 β 的 96 孔板中, 孵育 2 h 后, 弃培养液, 再加入 $200 \mu\text{L}$ IL-1 β 耦联物, 孵育 1 h 后, 再弃去上清。加入 $200 \mu\text{L}$ 底物溶液, 避光孵育 20 min 后, 加入 $50 \mu\text{L}$ 终止液, 450 nm 处检测吸光值, 通过绘制标准曲线, 计算出 IL-1 β 浓度。

1.5 Western blot

照射后 24 h 收集细胞提取细胞总蛋白, 每 10^6 细胞加入 $100 \mu\text{L}$ MER-Pierce 裂解液裂解细胞。蛋白定量按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行。取 $25 \mu\text{g}$ 蛋白进行不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 电转移至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF), 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h, 加入一抗, 4°C 孵育过夜, 洗膜, 加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h, ECL 化学发光法检测。以 β -actin 作为内参。

1.6 RT-PCR

细胞生长至亚融合状态时进行实验, 照射前预先用白藜芦醇处理 1 h, 之后对细胞进行照射, 24 h 后提取细胞总 RNA。用 Trizol 法提取总 RNA, 逆转录试剂盒 (日本 Takara 公司) 逆转为 cDNA, 试剂盒为 FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (瑞士 Roche 公司), $25 \mu\text{L}$ 体系配制好后用 ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems-Life Technologies) 分析。引物为上海生工生物有限公司合成, IL-1 β 引物,

5'-GTGGCAATGAGGATGACTTGT-3' (正义链) 和 5'-TGTAGTGGTCCGAGATTC-3' (反义链); GAPDH, 5'-ATGACATCAAGAAGG TGG TG-3' (正义链) 和 5'-CATACCAGG AAATGAGCTTG-3' (反义链)。以空白组为对照, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算相对表达量。

1.7 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。组间差异用单因素方差分析, 两两比较用 t 检验。 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染 Sirt1shRNA 后 Sirt1mRNA 表达变化

慢病毒载体将 Sirt1shRNA 转染进入细胞, 48 h 后, 提取各实验组 RNA 进行 RT-PCR 检测, 结果表明, RNA 干扰组 Sirt1mRNA 表达较空白对照组和白藜芦醇组显著降低 ($t=3.79, 14.73, p < 0.05$), 见图 1。

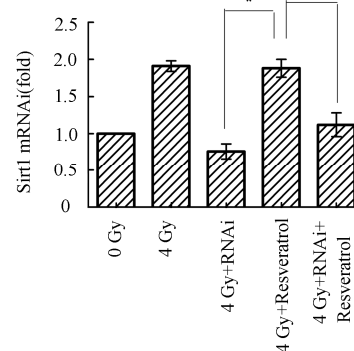


图 1 沉默 Sirt1 后各组 Sirt1mRNA 表达量
Fig.1 Expression of Sirt1 mRNA in different groups after Sirt1 silence (* $p < 0.05$)

2.2 沉默 Sirt1 后对照射后 MSCs 胞外分泌 IL-1 β 水平的影响

为了探讨 Sirt1 对辐射诱导的 MSCs 胞外分泌 IL-1 β 的影响, 本实验应用 Sirt1 激活剂白藜芦醇作为阳性对照, 通过预先给予间充质干细胞 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白藜芦醇, 再经过 4 Gy 照射, 24 h 后 ELISA 检测 IL-1 β 的分泌情况; 同时沉默 Sirt1 后, 再观察白藜芦醇抑制辐射诱导而产生炎症的效果。如表 1 所示, 给予白藜芦醇后 MSCs IL-1 β 的分泌水平较单纯照射组显著下降 ($t=21.68, p < 0.05$), 但在对 MSCs 进行 Sirt1 基因沉默后, MSCs 分泌的 IL-1 β

水平显著升高, 并且抵抗了白藜芦醇对辐射诱导的 IL-1 β 的抑制作用 ($t=18.57, p<0.05$)。

表 1 沉默 Sirt1 后各组 MSCs 细胞外 IL-1 β 的分泌和细胞内 IL-1 β mRNA 表达

Table 1 Secretion and intracellular level of IL-1 β in different groups after irradiation ($\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	细胞外 pg·mL ⁻¹ Extracellular secretion	细胞内 Intracellular expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
对照 Control	39.48 $\pm$ 1.70	1
单纯照射 Irradiation	74.26 $\pm$ 2.69	2.43 $\pm$ 0.07
单纯 RNA 干扰 RNAi	69.33 $\pm$ 2.15	2.36 $\pm$ 0.11
白藜芦醇 Resveratrol	39.89 $\pm$ 1.64	1.18 $\pm$ 0.19
干扰+阳性对照 RNAi+Resveratrol	61.67 $\pm$ 1.56	1.88 $\pm$ 0.05

2.3 沉默 Sirt1 对照后 MSCs 细胞内 IL-1 β 蛋白和 mRNA 水平的影响

为了探讨沉默 Sirt1 基因对辐照后 MSCs 细胞内 IL-1 β 蛋白和 mRNA 水平的变化, Sirt1shRNA 转染 48 h 后, 照射前 1 h 给予 MSCs 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 白藜芦醇, 再经过 4 Gy 照射, 24 h 后采用 Western blot 和 RT-PCR 方法检测 IL-1 β 在细胞内的表达水平。如图 2 和表 1 所示, 阳性对照组较单纯照射组 IL-1 β 蛋白表达量和 mRNA 水平明显降低 ($t=14.44; p<0.05$), 而 Sirt1 沉默后, 再给予白藜芦醇, 细胞内 IL-1 β 的蛋白表达量和 mRNA 水平较单纯照射组无显著变化, 提示 Sirt1 基因沉默后抵抗了白藜芦醇对辐射诱导的 IL-1 β 的抑制作用 ($t=8.078, p<0.05$)。

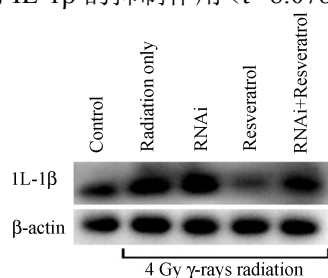


图 2 照射后各组 MSCs 细胞内 IL-1 β 蛋白表达电泳图
Fig.2 Expression of IL-1 β in different groups after irradiation

3 讨论

大量研究表明, Sirt1 蛋白在调节细胞氧化代谢, 炎症免疫反应等过程中起到重要作用。Sirt1 作为一个新发现的免疫调节分子通过 NF- κ B 依赖途

径在一些慢性炎症性疾病, 如糖尿病和结肠炎中具有较好的治疗效果^[5]。此外, Sirt1 还可以通过下调 NF- κ B 活性进而抑制 TNF- α , IL-6 等多种炎症因子基因的转录^[6]。辐照后会导致细胞内炎症因子 IL-1 β 的表达升高, 而且越来越多的实验表明, Sirt1 的天然激活剂——白藜芦醇对辐射后产生的炎症具有良好的抑制作用^[7], 提示 Sirt1 蛋白很可能是辐射防护药物的一个重要的靶点。所以本实验旨在初步探索 Sirt1 在辐射诱导产生炎症中的调节作用, 为针对 Sirt1 为靶点的辐射防护药物开发提供理论依据。

本研究显示, 间充质干细胞在受到 4 Gy 照射后, 引发细胞内的 IL-1 β 的分泌增多, 然而给予一定剂量的白藜芦醇后, 辐照后产生的 IL-1 β 的分泌明显减少; 但是, 当 Sirt1 被沉默以后, 白藜芦醇的抗炎作用明显减弱, 并且单纯的 Sirt1RNA 干扰对辐射诱导的 IL-1 β 的分泌没有显著的影响, 提示 Sirt1 在辐射诱发而产生 IL-1 β 的过程中具有重要作用。在对骨关节炎的研究中, 激活 Sirt1 蛋白可以通过去乙酰化作用使转录因子 NF- κ B 失活, 抑制 COX-2, MMP, PGE2 等炎症因子的产生, 从而在软骨细胞中发挥抗炎作用^[8]。同时, 本实验研究各组间细胞内 IL-1 β 的蛋白表达和 mRNA 水平的检测发现, 与 ELISA 结果一致, 白藜芦醇显示出良好的抗炎效果, 照射后白藜芦醇组 IL-1 β 的蛋白表达和 mRNA 水平受到了明显的抑制; 但是在沉默 Sirt1 基因后, 再给予 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的白藜芦醇, 经过照射后, IL-1 β 的蛋白表达和 mRNA 水平的变化与单纯照射组相比并无明显变化。此结果表明, 通过沉默 Sirt1 基因, 拮抗白藜芦醇抑制 IL-1 β 的 mRNA 产生的作用, 进而增加 IL-1 β 的蛋白表达和 IL-1 β 的分泌。同时也有体内研究发现, 特异性的敲除小鼠肝脏 Sirt1 基因, 可以增加高脂饮食引起的肝炎和脂肪肝的发生, 并伴随着 TNF- α , IL-6 等炎症因子的升高^[9,10]。

综上所述, 沉默 Sirt1 后可明显抑制白藜芦醇对 MSCs 的辐射保护作用, 增加 MSCs 受照后 IL-1 β 的表达和分泌, 说明 Sirt1 蛋白在辐射后产生炎症的过程中起到关键的调节作用, 有望成为辐射防护药物的一个重要的靶点。

参考文献

- 1 Yeung F, Hoberg J E, Ramsey C S, et al. Modulation of

- NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase [J]. *EMBO J*, 2004, **23**(12): 2369–2380
- 2 Xie J, Zhang X, Zhang L. Negative regulation of inflammation by SIRT1 [J]. *Pharmacol Res*, 2013, **67**(1): 60–67
- 3 YAO Hongwei, Rahman I. Perspectives on translational and therapeutic aspects of SIRT1 in inflammaging and senescence [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, **84**(10): 1332–1339
- 4 邓昭玲, 王彦, 杜利清, 等. 基因 shRNA 慢病毒载体构建及干扰效应检测 [J]. *中国组织工程研究*, **16**(28): 5255–5259
- DENG Zhaoling, WANG Yan, DU Liqing, *et al.* Sirt1 Construction of a short hairpin RNA interference lentiviral vector of SIRT1 gene and detection of interference effect [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2012, **16**(28): 5255–5259
- 5 Chung S, Yao H, Caito S, *et al.* Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2010, **501**: 79–90
- 6 Yoshizaki T, Milne J C, Imamura T, *et al.* Sirt1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2009, **29**: 1363–1374
- 7 Zhang H, Zhai Z, Wang Y, *et al.* Resveratrol ameliorates ionizing irradiation-induced long-term hematopoietic stem cell injury in mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, **54**: 40–50
- 8 Moon M H, Jeong J K, Lee Y J, *et al.* SIRT1, a class III histone deacetylase, regulates TNF- α -induced inflammation in human chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, **21**(3): 470–480
- 9 Purushotham A, Schug T T, Xu Q, *et al.* Hepatocytespecific deletion of sirt1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation [J]. *Cell Metabolism*, 2009, **9**: 327–338
- 10 Xu F, Gao Z, Zhang J, *et al.* Lack of sirt1 (mammalian sirtuin 1) activity leads to liver steatosis in the sirt1+/- mice: a role of lipid mobilization and inflammation [J]. *Endocrinology*, 2010, **151**: 2504–2514

The role of Sirt1 in expression of IL-1 β induced by irradiation

FU Yue¹ WANG Yan¹ DU Liqing¹ XU Chang¹ CAO Jia¹ CHEN Fenghua¹
GUO Yanting¹ LIU Jianxiang² LIU Qiang¹ FAN Feiyue¹ SU Xu²

¹(Tianjin Key Lab of Molecular Nuclear Medicine, Department of Radiation Hazard Evaluation, Institute of Radiation Medicine of Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

²(National Institute for Medical Radiological Protection, Chinese Center for disease control and prevention, Beijing 100088, China)

ABSTRACT This paper investigated the effect of Sirt1 on inflammatory factor IL-1 β produced in irradiated mesenchymal stem cells (MSCs) and explored the role of Sirt1 in radiation protection. shRNA silenced Sirt1 gene transcription in MSCs, and the intracellular Sirt1mRNA expression were detected to confirm the gene silencing, MSCs were treated with 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ resveratrol before irradiation, and the expression of IL-1 β was detected by ELISA, western blotting and real time PCR after irradiation. The results show that the levels of IL-1 β secretion increase compared with those of the resveratrol group ($t=18.57$, $p<0.05$). And meanwhile, the intracellular expression of IL-1 β protein and mRNA of RNAi, combined with resveratrol group, increase significantly compared with those of the resveratrol group ($t=8.078$, $p<0.05$). Sirt1 gene silence can obviously inhibit the radiation protective effect of resveratrol, which suggests that Sirt1 may play a key role in the process of inflammation induced by irradiation.

KEYWORDS Sirt1 protein, Mesenchymal stem cells, Radiation protection, IL-1 β

CLC TL71, R811.5