

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002295

SIRT1 在小鼠肠缺血再灌注损伤中的作用分析

李智永, 杜太平, 尚 卿

(新乡市中心医院普外科, 新乡 453000)

【摘要】目的:探讨 SIRT1 在小鼠肠缺血再灌注损伤中的作用。**方法:**45 只大鼠分为假手术组、模型组和 SIRT1 组。假手术组和模型组经腹腔注射空载体腺相关病毒, SIRT1 组大鼠经腹腔注射过表达 SIRT1 的腺相关病毒。注射 21 d 后, 模型组和 SIRT1 组大鼠采用肠系膜上动脉夹闭-松夹闭方式建立小肠缺血再灌注模型, 假手术组大鼠仅做肠系膜上动脉分离。再灌注后 24 h 后处死大鼠, 收集血清和小肠标本。采用 ELISA 试剂盒检测 3 组大鼠外周血炎症因子白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 水平, 采用试剂盒检测小肠组织中谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)的水平; 采用 Western blot 分析 3 组大鼠小肠组织凋亡蛋白的表达水平; 采用 TUNEL 染色分析小肠绒毛细胞凋亡指数。**结果:**与假手术组比较, 模型组和 SIRT1 组大鼠外周血炎症因子水平(IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α)和 MDA 水平明显上调, 抗氧化酶水平(GSH-PX 和 SOD)明显下调($P<0.05$)。与模型组比较, SIRT1 组大鼠外周血炎症因子水平(IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α)和 MDA 水平明显下调, 抗氧化酶水平(GSH-PX 和 SOD)明显升高($P<0.05$)。与假手术组比较, 模型组和 SIRT1 组大鼠小肠组织中 Caspase-3 和 Bax 表达明显上调, 而 Bcl-2 表达明显下调($P<0.05$)。与模型组比较, SIRT1 组大鼠小肠组织中 Caspase-3 和 Bax 表达明显下调, 而 Bcl-2 表达明显上调($P<0.05$)。与模型组比较, SIRT1 组大鼠小肠上皮细胞凋亡指数明显下降($P<0.05$)。**结论:**过表达 SIRT1 可明显降低小肠缺血再灌注大鼠炎症、氧化应激和细胞凋亡水平, 进而保护小肠组织, 为临床提供一定的指导意义。

【关键词】SIRT1; 小肠缺血再灌注; 炎症; 氧化应激; 凋亡

【中图分类号】R285

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-12-14

Role of SIRT1 in intestinal ischemia-reperfusion injury in rats

Li Zhiyong, Du Taiping, Shang Qing

(Department of General Surgery, Xinxiang Central Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the role of SIRT1 in intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods:** 45 rats were divided into sham-operated group, model group and SIRT1 group. The sham-operated group and model group were intraperitoneally injected with adeno-associated virus of empty vector and the SIRT1 group was intraperitoneally injected with adeno-associated virus of over-expression SIRT1. After 21 days of injection, rats in model group and SIRT1 group were treated with superior mesenteric artery occlusion-relaxation occlusion to establish small intestinal ischemia-reperfusion model, while rats in sham-operated group were only treated with superior mesenteric artery separation. 24 hours after reperfusion, rats were killed. Serum and small intestine samples were collected. The levels of inflammatory factors of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in peripheral blood of three groups of rats were detected by ELISA kit. The levels of glutathione peroxidase (GSH-PX), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in small intestine tissue were detected by ELISA kit. The expression level of apoptotic protein in small intestine tissue of three groups of rats was analyzed by Western blot. The apoptotic index of small intestinal villus cells was analyzed by TUNEL staining. **Results:** Compared with sham-operated group, the levels of inflammatory factors (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) and MDA in peripheral blood significantly increased, but GSH-PX and SOD level decreased significantly in small intestine of rats in model group and SIRT1 group ($P<0.05$). Compared with the model group, the levels of inflammatory factors (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) and MDA in peripheral blood in SIRT1 group decreased significantly, but GSH-PX and SOD level increased significantly ($P<0.05$). Compared with sham-operated group, the expression of Caspase-3 and Bax in intestinal tissue of model group and

SIRT1 group increased significantly, while the expression of Bcl-2 decreased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, the expression of Caspase-3 and Bax in small intestine tissue of SIRT1 group decreased significantly, while the expres-

作者介绍: 李智永, Email: huanwzlo@163.com,

研究方向: 胃肠道及肝胆疾病。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190917.1141.054.html>

(2019-09-18)

sion of Bcl-2 increased significantly ($P<0.05$). Compared with the model group, the apoptotic index of intestinal epithelial cells in SIRT1 group decreased significantly ($P<0.05$). **Conclusion:** Overexpression of SIRT1 can protect small intestinal tissues by reducing the levels of inflammation, oxidative stress and cell apoptosis in rats with small intestinal ischemia-reperfusion, which provides some guidance for clinical practice.

[Key words] SIRT1; small intestinal ischemia-reperfusion; inflammation; oxidative stress; apoptosis

小肠缺血再灌注是指小肠在缺血的基础上血供恢复所造成的肠损伤再加剧的现象,是临床常见的缺血灌注损伤之一^[1]。小肠缺血再灌注损伤发生于严重感染、创伤、休克及心肺功能不全等多种疾病过程中。研究显示小肠缺血再灌注不仅造成小肠组织受损,而且会引起细胞和内毒素移位,造成网状内皮系统发生系统反应,最终导致大量炎症介质释放,甚至造成多系统器官功能不全综合征,严重威胁患者的生命安全^[2-3]。研究发现 SIRT1 是组蛋白去乙酰化酶,其从细胞周期调控到能量稳态的过程中均发挥着至关重要的作用^[4-5]。研究也显示 SIRT1 在脑、肝脏、心肌和小肠缺血再灌注损伤中起到保护作用^[6-8]。但是 SIRT1 是如何影响细胞行为达到保护作用的尚无明确的实验论证。本研究采用腺相关病毒介导 SIRT1 在小肠缺血再灌注损伤模型大鼠中过表达,分析其对小肠缺血再灌注的保护机制。

1 对象和方法

1.1 主要试剂及仪器

白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α ELISA 检测试剂盒购自美国 R & D 公司;NO、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒购自南京建成生物研究所;Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 鼠单克隆抗体购自美国 Santa cruz 公司;TUNEL 染色试剂盒购自南京诺唯赞生物有限公司。其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 动物分组及治疗

45 周 200 g 的 SD 大鼠, SPF 级, 购自北京维通利华实验动物有限公司, 动物使用许可证号 SCXK(京)2016-0006。所有大鼠到货后, 可自由饮水, 室内通气良好, 温度维持在 26~28 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度维持在 70% 左右。

所有小鼠随机分为假手术组、模型组和 SIRT1 组。SIRT1 组小鼠经腹腔注射过表达 SIRT1 的腺相关病毒 1×10^{11} CFU/只, 模型组和假手术组经腹腔注射空载体腺相关病毒 1×10^{11} CFU/只。接种后小鼠继续在 SPF 级动物房饲养, 24 d 后, 3 组小鼠

经腹腔注射 1% 戊巴比妥 500 μL 麻醉小鼠, 模型组和 SIRT1 组小鼠麻醉成功后, 取仰卧位并固定, 在腹正中切口, 进入腹腔后分离肠系膜动脉, 并用无损伤动脉夹夹闭肠系膜动脉 1 h, 此后松开动脉夹, 恢复肠系膜动脉血流, 制备小肠缺血再灌注模型。假手术组只分离肠系膜动脉, 不做夹闭操作。手术结束后关闭腹腔, 继续 SPF 级动物房饲养。

1.3 实验取材及制备

3 组小鼠治疗 24 h 后, 采用 1% 戊巴比妥盐麻醉小鼠, 采集小鼠外周血, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 12 h 后, 5 000 r/min 离心 10 min, 收集血清用于检测炎症因子和氧化应激因子。取部分小肠组织, 称取质量, 匀浆后用于 Western blot。取部分小肠组织, 分离小鼠肠上皮细胞, 将细胞铺于玻片上, 用于分析细胞凋亡。

1.4 Western blot

用 PBS 洗涤小肠后, 加入组织裂解液(含蛋白酶抑制剂), 采用匀浆仪将组织完全裂解, 在冰上静置 30 min 使组织完全裂解, 然后 15 000 r/min 离心 20 min, 取上清, 加入上样缓冲液, 在金属浴煮沸 10 min, 然后进行 SDS-PAGE, 结束后将蛋白通过水平电泳转移至 PVDF 膜上, 此后, 用 5% 脱脂奶粉封闭 30 min, 将抗 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的小鼠单克隆抗体按照不同稀释比例稀释后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 然后用 HRP 标记的羊抗小鼠二抗在室温孵育 1 h, 用 PBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 5 min, 然后在化学发光仪下进行显色分析, 以 β -tubulin 作为内标。

1.5 ELISA 法

血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平检测采用 ELISA 法, 具体操作严格按照试剂盒操作说明书进行。谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)、水平分析采用比色法; SOD 水平分析采用羟胺法; MDA 水平分析采用 TBA 法。具体操作按照试剂盒操作说明进行。

1.6 TUNEL 染色

3 组小鼠小肠上皮细胞贴壁后, 将细胞采用新鲜配置的 4% 多聚甲醛室温固定 20 min, 用 PBS 洗涤 3 次, 用 Proteinase K 工作液室温处理细胞 15 min, PBS 漂洗 2 次; 滴加 100 μL 平衡缓冲液使细胞玻片完全覆盖, 室温平衡 30 min。平衡结束后甩干玻片的平衡缓冲液, 然后在细胞样品上滴加 50 μL TdT 孵育缓冲液, 将玻片转移至湿盒中室温孵育 1 h, 然后甩干液体, 用 PBS 洗涤 3 次, 然后采用 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 DAPI 溶液避光染色 5 min, PBS 洗涤标本 3 次, 每次 5 min。然后在样本上滴加防淬灭剂, 并封片后在显微镜下观察细胞凋亡。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。不同组间采用单因素方差分析, 组间比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 3 组小鼠小肠组织 SIRT1 表达水平分析

本研究分析了腺相关病毒介导 SIRT1 蛋白在小肠组织中的表达情况, 采用 Western blot 分析显示腺相关病毒介导空载体并未提高小肠组织中 SIRT1 蛋白质的表达, 而腺相关病毒介导 SIRT1 则明显提高了小肠组织中 SIRT1 蛋白的表达(图 1)。

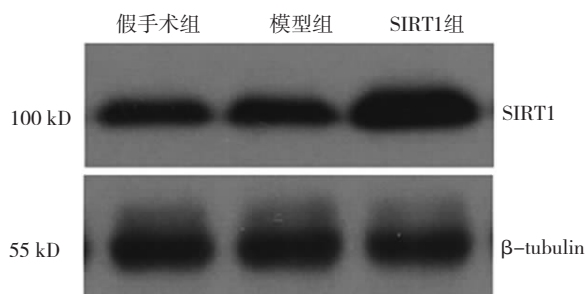


图 1 3 组小鼠小肠组织 SIRT1 蛋白表达分析

2.2 3 组小鼠外周血炎症因子水平比较

与假手术组比较, 模型组和 SIRT1 组小鼠外周血炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组比较, SIRT1 组小鼠外周血炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平明显下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (表 1)。

表 1 3 组小鼠外周血炎症因子水平比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
假手术组($n=15$)	55.12 $\pm$ 11.32	41.32 $\pm$ 9.21	29.44 $\pm$ 7.80
模型组($n=15$)	238.10 $\pm$ 15.39 ^a	209.44 $\pm$ 10.98 ^a	59.21 $\pm$ 9.90 ^a
SIRT1 组($n=15$)	97.44 $\pm$ 12.89 ^{ab}	78.51 $\pm$ 8.18 ^{ab}	36.29 $\pm$ 8.99 ^{ab}
<i>F</i> 值	58.102	68.197	12.099
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注: a, 与对照组比较, $P<0.05$; b, 与模型组比较, $P<0.05$

2.3 3 组小鼠外周血氧化应激因子水平比较

与假手术组比较, 模型组和 SIRT1 组小鼠外周血抗氧化酶 SOD 和 GSH-PX 水平明显降低, 而 MDA 水平明显下调, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组比较, SIRT1 组小鼠外周血抗氧化酶 SOD 和 GSH-PX 水平明显升高, 而 MDA 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (表 2)。

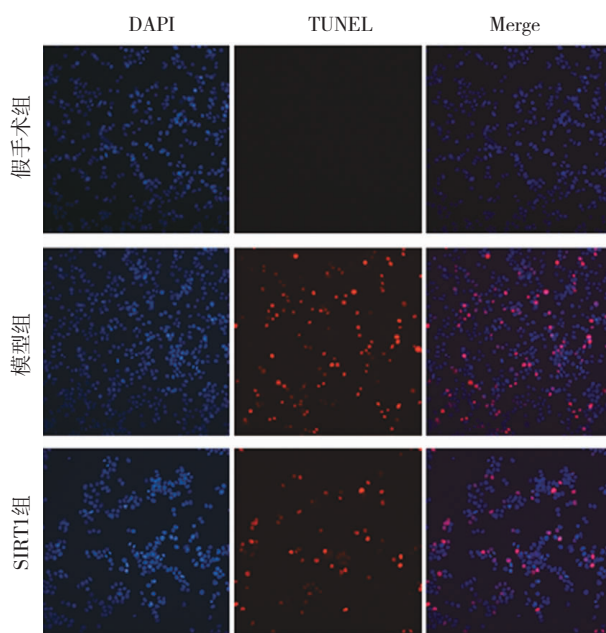
表 2 3 组小鼠外周血炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD/U $\cdot$ mL ⁻¹	GSH-PX/U $\cdot$ mL ⁻¹	MDA/nmol $\cdot$ mL ⁻¹
假手术组($n=15$)	3.98 $\pm$ 0.89	10.97 $\pm$ 2.11	1.59 $\pm$ 0.08
模型组($n=15$)	2.43 $\pm$ 0.49 ^a	4.91 $\pm$ 1.37 ^a	4.27 $\pm$ 0.12 ^a
SIRT1 组($n=15$)	3.34 $\pm$ 0.59 ^{ab}	8.37 $\pm$ 1.19 ^{ab}	2.68 $\pm$ 0.11 ^{ab}
<i>F</i> 值	8.190	12.972	9.574
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

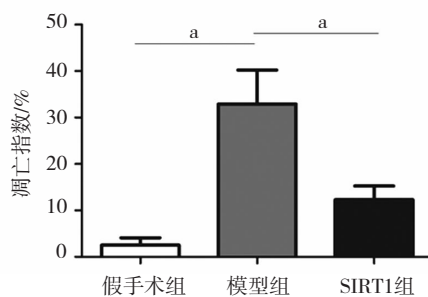
注: a, 与对照组比较, $P<0.05$; b, 与模型组比较, $P<0.05$

2.4 3 组小鼠上皮细胞凋亡水平比较

假手术组小鼠上皮细胞凋亡水平极低, 而模型组小鼠上皮细胞出现大量细胞凋亡现象, SIRT1 组小鼠上皮细胞凋亡水平较模型组相对缓解。定量分析显示, 与假手术组比较, 模型组和 SIRT1 组小鼠上皮细胞凋亡指数明显增加, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组比较, SIRT1 组小鼠上皮细胞凋亡指数明显下调, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (图 2、表 3)。



A. TUNEL 染色分析 3 组小鼠小肠上皮细胞凋亡水平



注: a, $P<0.05$

B. 定量分析 3 组小鼠小肠上皮细胞凋亡水平

图 2 3 组小鼠肠上皮细胞凋亡水平比较

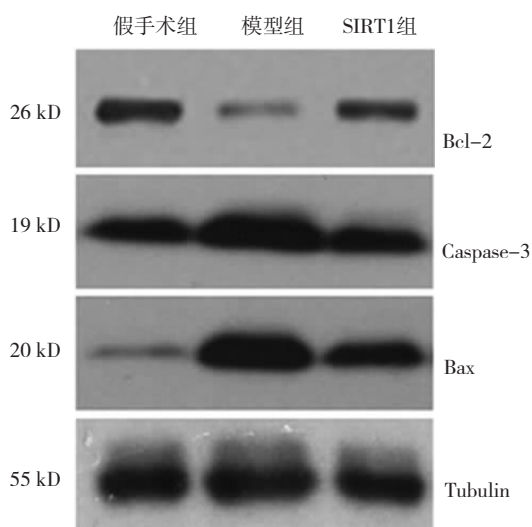
表 3 3 组小鼠肠上皮细胞凋亡水平比较 (U/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	SOD
假手术组(n=15)	2.53 ± 0.90
模型组(n=15)	32.90 ± 4.23 ^a
SIRT1 组(n=15)	12.30 ± 1.71 ^{ab}
F 值	19.391
P 值	0.000

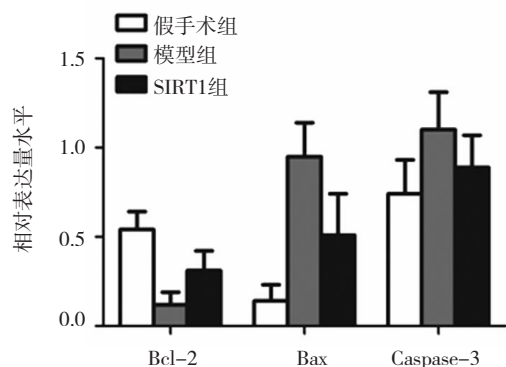
注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$

2.5 3 组小鼠小肠组织凋亡相关蛋白的表达

Western blot 分析显示,与假手术组比较,模型组和 SIRT1 组小鼠小肠组织中 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平明显升高,而 Bcl-2 表达水平明显下调,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,SIRT1 组小鼠小肠组织中 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平明显下降,而 Bcl-2 表达水平明显上调,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 3、表 4)。



A. Western blot 分析 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达水平



B. 定量分析 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达水平
(以 Tubulin 作为内标)

图 3 3 组小鼠小肠组织凋亡相关蛋白表达水平分析

表 4 3 组小鼠小肠组织凋亡相关蛋白表达水平分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2/Tubulin	Bax/Tubulin	Caspase-3/Tubulin
假手术组(n=15)	0.54 ± 0.89	0.14 ± 0.09	0.74 ± 0.19
模型组(n=15)	0.12 ± 0.07 ^a	0.95 ± 0.19 ^a	1.10 ± 0.21 ^a
SIRT1 组(n=15)	0.31 ± 0.11 ^{ab}	0.51 ± 0.23 ^{ab}	0.89 ± 0.18 ^{ab}
F 值	7.912	6.193	10.312
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b:与模型组比较, $P<0.05$

3 讨 论

缺血再灌注损伤是器官移植中最重要的问题,会导致移植器官功能的严重紊乱。虽然缺血会导致细胞和组织发生严重损伤,但是组织缺血再灌注后,因血氧恢复,代谢加快,增加了氧自由基、细胞因子及炎症因子的释放,导致大量与凋亡或者细胞死亡相关通路的激活,而乙酰转移酶在各种组织缺血再灌注损伤、细胞能量代谢及应激反应中发挥重要作用,因此去乙酰化酶则对缺血再灌注损伤可能具有一定的治疗作用。

小肠缺血再灌注时,细胞代谢水平在短时间内会达到高峰,导致细胞中活性氧大量积累,包括超氧化物、过氧化氢等物质。这些物质会造成细胞应激,引起细胞因子释放、脂质氧化、蛋白质变性和 DNA 损伤^[9-10]。目前研究显示在心脏组织中过表达 SIRT1 可以上调硫氧还蛋白等抗氧化物水平,对心脏起到保护作用^[11]。研究也证实 SIRT1 在脑和肾缺血再灌注过程中也有保护作用^[12]。SOD 和 GSH-PX 是体内主要的抗氧化酶类,对抑制氧自由基产生,平衡人体代谢有重要意义。本研究发现,在小肠组织中过表达 SIRT1 蛋白可以明显提高抗氧化酶 SOD 和 GSH-PX 的水平,而 MDA 水平则明显下调,说明在小肠组织中过表达 SIRT1 也可以明显提高小肠抗氧化能力。

缺血再灌注会造成组织炎症细胞的浸润和炎症因子的释放,进而造成组织损伤。研究已经证实炎症反应主要的调节因子细胞核因子- κ B(nuclear factor- κ B,NF- κ B)受乙酰化调控,SIRT1 可使 NF- κ B 去乙酰化修饰,进而抑制 NF- κ B 介导的炎症反应^[13-14]。本研究在小肠组织中过表达 SIRT1 蛋白明显降低

了炎症因子的水平,说明 SIRT1 蛋白过表达对小肠缺血再灌注具有保护作用。细胞凋亡是组织缺血再灌注后一个重要的生物学现象,研究证实 SIRT1 具有抗凋亡的作用,可以使凋亡介质 p53 蛋白去乙酰化,进而抑制其转录活性,降低细胞的凋亡水平^[15]。在脑缺血再灌注中,SIRT1 过表达可明显降低 p53 蛋白的表达,进而降低细胞的凋亡。Caspase-3 是位于哺乳动物细胞凋亡通路下游关键的死亡蛋白酶。Bcl-2/Bax 比率直接决定了细胞的“命运”。本研究发现在小肠组织过表达 SIRT1 蛋白,通过 TUNEL 染色发现小肠上皮细胞凋亡水平较模型组明显下调,从分子机制角度分析,SIRT1 过表达明显提高了抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平,而抑制了凋亡关键因子 Caspase-3 和 Bax 蛋白的表达。这一结果说明 SIRT1 过表达明显提高了小肠组织抗凋亡能力。

综上所述,过表达 SIRT 蛋白明显降低小肠缺血再灌注小鼠炎症水平,提高抗氧化物酶活性,抑制小肠上皮细胞凋亡,进而对小肠缺血再灌注起保护作用。

参 考 文 献

- [1] Jin Y,Blikslager AT. Intestinal ischemia-reperfusion:rooting for the SOCS[J]. Dig Dis Sci,2017,62(1):4-6.
- [2] de Groot H,Rauen U. Ischemia-reperfusion injury:processes in pathogenetic networks;a review[J]. Transplant Proc,2007,39(2):481-484.
- [3] Kalogeris T,Baines CP,Krenz M,et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury[J]. Int Rev Cell Mol Biol,2012,298:229-317.
- [4] Nogueiras R,Habegger KM,Chaudhary N,et al. Sirtuin 1 and sirtuin 3:physiological modulators of metabolism[J]. Physiol Rev,2012,92(3):1479-1514.
- [5] Pillarisetti S. A review of Sirt1 and Sirt1 modulators in cardiovascular and metabolic diseases[J]. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov,2008,3(3):156-164.
- [6] Deng M,Wang D,He S,et al. SIRT1 confers protection against ischemia/reperfusion injury in cardiomyocytes via regulation of uncoupling protein 2 expression[J]. Mol Med Rep,2017,16(5):7098-7104.
- [7] Nakamura K,Zhang M,Kageyama S,et al. Macrophage heme oxygenase-1-SIRT1-p53 axis regulates sterile inflammation in liver ischemia-reperfusion injury[J]. J Hepatol,2017,67(6):1232-1242.
- [8] Guan XH,Liu XH,Hong X,et al. CD38 deficiency protects the heart from ischemia/reperfusion injury through activating SIRT1/FOXOs-mediated antioxidative stress pathway[J]. Oxid Med Cell Longev,2016,2016:7410257.
- [9] Datta G,Fuller BJ,Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury:insights from transgenic knockout models[J]. World J Gastroenterol,2013,19(11):1683-1698.
- [10] Czubkowski P,Socha P,Pawlowska J. Oxidative stress in liver transplant recipients[J]. Ann Transplant,2011,16(1):99-108.
- [11] Sanderson TH,Reynolds CA,Kumar R,et al. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain:pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation[J]. Mol Neurobiol,2013,47(1):9-23.
- [12] Yamamoto T,Tamaki K,Shirakawa K,et al. Cardiac Sirt1 mediates the cardioprotective effect of caloric restriction by suppressing local complement system activation after ischemia/reperfusion[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2016,310(8):1003-1014.
- [13] Turan I,Sayan Ozacmak H,Ozacmak VH,et al. The effects of S-nitrosoglutathione on intestinal ischemia reperfusion injury and acute lung injury in rats:roles of oxidative stress and NF- κ B[J]. Tissue Cell,2018,52:35-41.
- [14] Stein S,Schafer N,Breitenstein A,et al. SIRT1 reduces endothelial activation without affecting vascular function in ApoE^{-/-} mice[J]. Aging,2010,2(6):353-360.
- [15] Cheng HL,Mostoslavsky R,Saito S,et al. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog(SIRT1)-deficient mice[J]. Proc Nat Acad Sci USA,2003,100(19):10794-10799.

(责任编辑:冉明会)