

·基础研究·

基因干扰 Sirtuin3 后对缺氧预处理的影响

李超英^{1,2}, 胡俊³, 赵嘉⁴, 王莹¹, 陶玉倩¹, 李玲^{1*}

(1.中山大学附属第一医院神经内科, 广东广州 510080; 2.江门市中心医院, 广东江门 529030; 3.深圳北大医院神经内科, 广东深圳 518036; 4.中山大学附属第二医院神经内科, 广东广州)

摘要:【目的】探讨基因干扰 Sirtuin3 (SIRT3) 后对缺氧预处理的影响。【方法】使用空白载体 pGCSIL-GFP 进行预实验, 筛选适合的感染复数 (MOI)。正式实验使用 pGCSIL-PUR-SIRT3 转染 PC12 细胞。成功构建空白载体 (empty vector) 及 SIRT3-/- 稳定细胞株后, 将两种细胞分别分为对照组 (control); 缺氧预处理+缺氧组 (Hyp+OGD); 单纯缺氧组 (OGD); MTT 测定细胞活性。ATP 荧光检测试剂盒测定胞内的 ATP 水平。Western Blot 法测定各组细胞内 SIRT3、过氧化物酶体增生激活受体- γ 的共刺激因子-1 α (PGC-1 α), 锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 的蛋白表达水平。【结果】OGD 后 SIRT3-/- 组 (0.430 ± 0.009) 与 Vector 组 (0.562 ± 0.140) 相比, 细胞活性下降更明显 ($P < 0.05$), 经预处理后 SIRT3-/- 组细胞活性增加, 且与 Vector 组间差异无统计学意义 ($P = 0.311 > 0.05$)。OGD 后 SIRT3-/- 组 (0.334 ± 0.006) 与 Vector 组 (0.453 ± 0.015) 相比, ATP 下降更明显 ($P < 0.05$)。经预处理后 SIRT3-/- 组 ATP 水平增加, 且与 Vector 组间差异无统计学意义 ($P = 0.866 > 0.05$)。SIRT3-/- 3 组细胞间 PGC-1 α 及 MnSOD 蛋白的表达与 Vector 组对应的 3 组比较明显下降 ($P < 0.05$), Hyp+OGD 及 OGD 相对于各自 control 组均上调 ($P < 0.05$), 且预处理组的上调更明显 (与 OGD 组比较, $P < 0.05$)。【结论】干扰 SIRT3 基因后 PGC-1 α 及 MnSOD 的表达下降, SIRT3 为预处理或缺氧处理上调 PGC-1 α 及 MnSOD 的其中一条途径, 干扰 SIRT3 后其他的途径仍然在预处理中发挥重要的细胞保护作用。

关键词: 缺氧预处理; Sirtuin3; 过氧化物酶体增生激活受体- γ 的共刺激因子-1 α ; 锰超氧化物歧化酶; siRNA 干扰

中图分类号: R3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)01-0001-07

Effect of Sirtuin3 on Hypoxic Preconditioning with Its Gene Knocked Down

LI Chao-ying^{1,2}, HU Jun³, ZHAO Jia⁴, WANG Ying¹, TAO Yu-qian¹, LI Ling^{1*}

(1. Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China; 2. The Central Hospital of Jiangmen, Jiangmen 529030, China; 3. Peiking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, China; 4. Department of Neurology, Second Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】To investigate the effect of Sirtuin3 (SIRT3) on hypoxic preconditioning (Hyp) with its gene knocked down. 【Methods】Empty vectors (pGCSIL-GFP) were used to select the suitable MOI. pGCSIL-PUR-SIRT3 -vectors were used in formal experiments. Cells transfected with empty vectors or SIRT3-RNAi-LV were divided into control, hypoxic preconditioning + Oxygen-glucose deprivation (Hyp+OGD) and OGD respectively. MTT assay was used for testing the cells viability. The ATP level was evaluated using ATP Fluorometric Assay Kit. The expression of SIRT3, Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) and Manganese superoxide dismutase (MnSOD) were assessed at the protein level by Western blot. 【Results】After OGD, MTT values decreased more in SIRT3-/- compared with Vector (0.430 ± 0.009 vs 0.562 ± 0.140 , $P < 0.01$), but were increased in Hyp + OGD respectively ($P < 0.05$), resulting in no significant difference between SIRT3-/- and Vector in Hyp+OGD ($P = 0.311 > 0.05$). After OGD, The ATP levels decreased more in SIRT3-/- compared with Vector (0.334 ± 0.006 vs 0.453 ± 0.015 , $P < 0.01$),

收稿日期: 2011-04-08

基金项目: 国家自然科学基金(81071069); 广东省科技计划项目(2010B080701008); 广东省科技计划项目(2008B080703029)

作者简介: 李超英, 硕士研究生, 研究方向: 脑血管病, E-mail: cly11157@126.com; * 通信作者: 李玲, 博士生导师, 教授, E-mail: gzll62@yahoo.com.cn

but were increased in Hyp+OGD respectively ($P < 0.05$), resulting in no significant difference between SIRT3^{-/-} and Vector in Hyp+OGD ($P = 0.866 > 0.05$). The expression of PGC-1 α and MnSOD were declined significantly in the three groups of SIRT3^{-/-} compared with that in Vector respectively ($P < 0.05$), but were both increased in Hyp+OGD and OGD compared with control ($P < 0.05$), and were increased more in Hyp+OGD compared with OGD ($P < 0.05$). 【Conclusion】 The expression of PGC-1 α and MnSOD were decreased with SIRT3 gene knocked down and SIRT3 was one of the ways that hypoxic preconditioning or hypoxia up regulated the expression of MnSOD through PGC-1 α pathway.

Key words: hypoxic preconditioning; Sirtuin3; peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α ; manganese superoxide dismutase; RNA interference

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2012, 33(1): 1-7]

缺氧预处理(hypoxic preconditioning)是指适度的缺氧刺激可启动细胞内源性的保护作用,以获得其后对严重缺氧打击而产生耐受性的现象,但具体保护机制目前尚不清楚^[1-2]。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是指生物体细胞内的外源性或内源性的双链 RNA 引起与其同源 mRNA 的特异性降解,进而调节和关闭相应基因的表达,调控细胞的各种高级生命活动。构建特定的 siRNA 表达载体,通过在体内表达 siRNA,从而引发基因沉默是 RNAi 主要的作用途径^[3]。近年来慢病毒载体以其感染的高效性、稳定性而应用越来越多^[4-5]。Sirtuin3(SIRT3)作为能量代谢调节器在胞内发挥重要的生理作用。SIRT3 主要通过其脱酰化或其它未知的功能参与抗衰老、抗肿瘤、抵御氧化应激,减少细胞的凋亡^[6-7]。而目前 SIRT3 在神经系统尤其是缺血性脑卒中中的应用未见相关报道。本研究拟干扰 SIRT3 基因,探讨其对缺氧预处理保护作用的影响,进而说明 SIRT3 参与缺氧预处理的神经保护作用,为寻找缺血性脑卒中新的临

床治疗靶点提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 慢病毒表达载体及干扰序列

本实验携带 SIRT3 基因的慢病毒载体从上海吉凯基因公司购买。慢病毒表达载体是 pGCSIL-PUR。共提供 4 个干扰序列(表 1);病毒滴度均为 4×10^8 (TU/mL);大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 PC12 细胞来自 BioMark 细胞库;RPMI-1640、胎牛血清、马血清购自美国 Gibco 公司;MTT 购自美国 Sigma 公司;SIRT3、PGC-1 α 及 MnSOD 特异性一抗、二抗分别购自 Cellsignaling 及 R&D; 嘌呤霉素购自美国 Sigma, ATP 荧光测定试剂盒购自美国 Biovision。

1.2 细胞培养

PC12 细胞常规培养于含 RPMI 1640+体积分数 10%的马血清+体积分数 5%的胎牛血清的培养基中。

1.3 稳定细胞株构建

表 1 4 个干扰序列

Table 1 Four SIRT3-RNAi sequences

Gene	siRNA sequences
Sirt3-RNAi-LV 1#	5'- CcggcaGGACGGATAAGACAGACTATTCAGAGATAGTCTGTCTTATCCGTCCtgTTTTg-3'(sense) 5'- AattcaaaaacaGGACGGATAAGACAGACTATCTCTTGAATAGTCTGTCTTATCCGTCCtg-3'(an-sense)
Sirt3-RNAi-LV 2#	5'-ccgggaCAGACTATGGCTTACTTCTTTCAAGAGAAGAAGTAAGCCATAGTCTGtcTTTTg-3'(sense) 5'-aattcaaaaagaCAGACTATGGCTTACTTCTTCTTGAAGAAGAAGTAAGCCATAGTCTGtc-3'(an-sense)
Sirt3-RNAi-LV 3#	5'-ccgggaGTCTCGAAGGAAAGATGTTTCAAGAGAACATCTTTCCTTCGAGGAcTcTTTTg-3'(sense) 5'-aattcaaaaagaGTCTCGAAGGAAAGATGTTCTCTTGAACATCTTTCCTTCGAGGAcTc-3'(an-sense)
Sirt3-RNAi-LV 4#	5'-ccggtaGCATGTTGGTCGGTAAAGTTTCAAGAGAACCTTACCGACCAACATGcTtaTTTTg-3'(sense) 5'-aattcaaaaataGCATGTTGGTCGGTAAAGTTCTCTTGAACCTTACCGACCAACATGcTta-3'(an-sense)

1.3.1 筛选适合的转染 MOI 值及转染的时间

实验前 1 d 接种约 4×10^3 个 PC12 细胞于 96 孔板,使进行病毒感染时细胞融合度达 40%。实验开始时,把病毒浓度统一为 1×10^8 TU/mL,部分稀释为 1×10^7 TU/mL 及 1×10^6 TU/mL。接着将 10 μ L、5 μ L 浓度为 1×10^8 TU/mL 及 10 μ L 浓度为 1×10^7 TU/mL、 1×10^6 TU/mL 的病毒分别加入 96 孔板中,此时经过生长的细胞数目约为 1×10^4 ,即 MOI 为 100,50,10 及 1。轻拍培养板,使培养基及病毒充分混匀,然后把细胞放回培养箱。8~12 h 后观察细胞状态,弃去细胞上清,更换为新鲜培养基。转染后 24、48 h 于荧光显微镜下观察荧光强度及数量,整个转染过程冰上操作(以下转染均采用相同的方法及条件)。

1.3.2 筛选适合的嘌呤霉素浓度 PC12 细胞接种于 96 孔板,将嘌呤霉素分为 0、2、4、5、6、10 μ g/mL 6 个浓度梯度,每组 6 复孔,加药 24 h 后 MTT 测定细胞活性确定最优的抗生素浓度。

1.3.3 稳定细胞株的筛选及培养 细胞接种于 6 孔板,细胞融合达 40% 时使用 SIRT3-RNAi-LV 及空白载体转染细胞,48 h 后移入培养瓶,同时加入 5 μ g/mL 的嘌呤霉素持续筛选 5~7 d,得到稳定细胞株,后改为 2.5 μ g/mL 进行持续培养及实验。

1.3.4 有效的 SIRT3 干扰序列的筛选 将上述培养的 4 种序列的稳定细胞株接种于 60 mm 培养皿中,细胞融合达 90% 以上时收集细胞,提取蛋白,Western Blot 检测细胞内 SIRT3 表达量的变化,选择干扰效率达 90% 以上的序列进行实验。

1.4 细胞预处理实验模型和分组

将 PC12 细胞分为空白载体(vector)和 SIRT3-RNAi-LV 转染组,各自又分为对照组;缺氧预处理+缺氧组[(体积分数 95% N_2 +5% CO_2) 混合气体通气 30 min,然后在缺氧盒中封闭 30 min,再放回 37 $^{\circ}C$ 5% CO_2 的培养箱,48 h 后换缺氧液,再在 N_2 与 CO_2 混合气体通气 30 min,然后在缺氧盒中封闭缺氧 6 h]及单纯缺氧组(换缺氧液后在缺氧盒中封闭缺氧 6 h)。

1.5 MTT 比色法测定细胞活力

细胞接种于 96 孔培养板,每组 6 复孔。经处理后吸走刺激液,加入 180 μ L RPMI 1640 + 20 μ L MTT 于培养箱避光孵育 4 h,吸走刺激液加入 DMSO 100 μ L,于荧光/化学发光分析仪以 490 nm 波长检测各组分光度,计算各组细胞的存活率。

1.6 荧光法测定细胞内 ATP 的水平

使用 ATP 荧光检测试剂盒测定胞内 ATP 的水平。细胞接种于 60 mm 培养皿,缺氧后收集细胞,加入 100 μ L 的 ATP 检测液,冰上孵育 20 min,15 000 r/min 离心 2 min(离心半径为 13 cm),收集上清,加 50 μ L 的样本到 96 孔,最后加入 50 μ L 的反应液,常温下避光孵育 30 min,于荧光检测仪读取波长 535/587nm 的吸光度,最后根据标准曲线将数据转换成物质的量浓度。

1.7 Western Blot 检测细胞内 SIRT3、PGC-1 α 及 MnSOD 的蛋白表达

β -actin 为内参。电泳分离蛋白后,电转法将目的蛋白条带从凝胶转移到 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭液中封闭 1 h,分别加一抗(1:1 000 SIRT3 抗体,Cell Signaling Technology; 1:1 000 PGC-1 α 抗体,Cell Signaling Technology; 1:10 000 MnSOD 抗体,R&D systems; 1:10 000 β -actin 抗体,Sigma, USA)室温孵育 1 h,冰箱过夜,TBST 洗膜 3 次,加二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次后化学发光显色,照相,采用 QuantlityOne 分析软件对目的蛋白条带与 β -actin 灰度值的比值进行统计分析。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,实验数据以均数 \pm 标准误表示。独立定量数据组间比较如符合正态分布及方差齐性采用单因素方差分析(One way ANOVA),两两比较采用 LSD 法;如数据不符合正态分布或方差齐性的条件则采用秩和检验(Kruskal-Wallis test), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。实验结果均经重复实验 3 次以上。

2 结 果

2.1 筛选适合的 MOI 值及转染的时间

如图 1 所示,已成功转染的细胞,GFP 表达阳性,在荧光显微镜下显示绿色荧光。转染 24 h 后,MOI 为 100 及 50 时可观察到明显的绿色荧光,而 MOI 为 10 及 1 时只有少量或微量的荧光。转染 48 h 后,MOI 为 100 时转染效率达 90% 以上,MOI 为 50 时转染效率达 70% 以上,而 MOI 为 10 及 1 时转染效率在 40% 以下,故选取 MOI 50 可满足实验的要求,既能达到高转染效率,同时保持低的病毒消耗量。

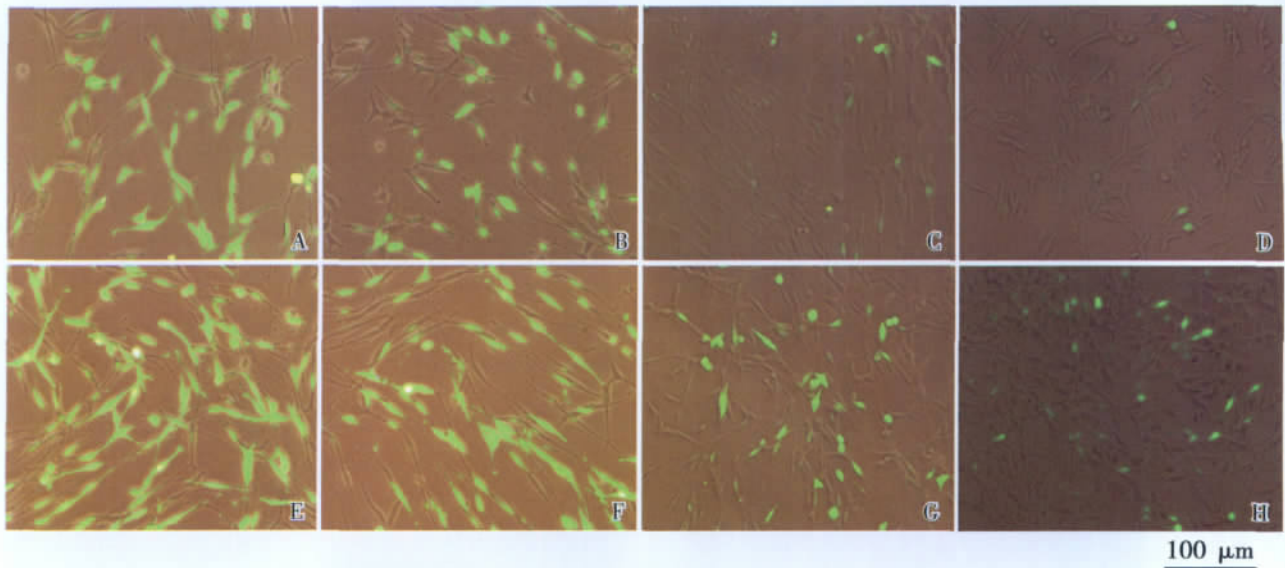


图 1 转染 24 或 48 h 后荧光显微镜下 GFP 的表达

Fig.1 The transfection rates of retroviral constructs were assessed by the expression of Green fluorescent protein (GFP) detected by fluorescence microscope 24 /48 h after transfected

A: MOI = 100, B: MOI = 50, C: MOI = 10, D: MOI = 1, 24h ; E: MOI = 100, F: MOI = 50, G: MOI = 10, H: MOI = 1, 48 h. $\times 320$

2.2 MTT 筛选适合的嘌呤霉素浓度

如图 2 所示,6 组间细胞活性有统计学差异 ($F = 43.846, P < 0.01$)。加药后各组与对照组比较,细胞活性均不同程度的下降 ($P < 0.05$)。与对照组 (0.688 ± 0.086) 相比,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度细胞活性下降为 59.9%,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为 55.9%,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.275 ± 0.065) 为 39.9%,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为 44.5%,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为 33.9%,其中 2 及 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 间无统计学差异 ($P = 0.562 > 0.05$)。5 与 2,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 间有显著统计学意义 ($P = 0.001, P = 0.005$),而与 6 及 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 间没有统计学差异 ($P = 0.374, P = 0.242$)。因此选择 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为最终的浓度,加药 24 h 后细胞活性下降约 60%。

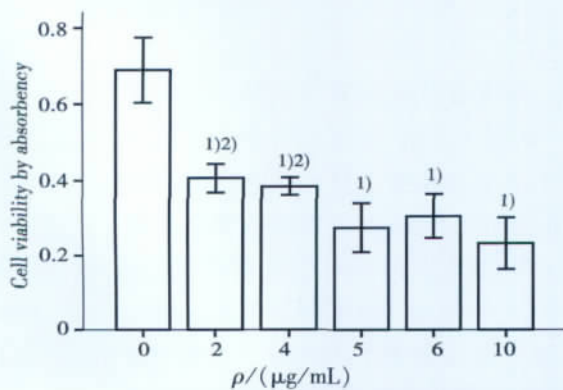


图 2 MTT 筛选适合的嘌呤霉素的浓度

Fig.2 MTT selected the suitable puromycin concentration

1) $P < 0.05$ vs control (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 2) $P < 0.05$ vs 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.3 Western blot 筛选有效的 SIRT3 干扰序列

如图 3 所示,野生型 (WT)、空白载体组 (Vector) 及 4 个 SIRT3 干扰序列的间的 SIRT3 的蛋白表达量间差异有统计学意义 ($F = 509.672, P < 0.01$),4 个 siRNA 序列均在不同程度上下调 SIRT3 的表达(与野生型 WT 组及空白载体 Vector 组相比, P 均 < 0.05),而 Vector 组与 WT 组相比,SIRT3 的表达并无显著性差异 ($P = 0.054$)。其中 V2 及 V4 的干扰效果最好,与 WT 组相比,干扰效率达到 92.3%和 92.4%,而 V2 及 V4 相比,不具统计学差异 ($P = 0.992$),因此可选择 V2 或 V4 为合适的干扰序列,构建稳定细胞株。

2.4 MTT 测定干扰 SIRT3 基因后对于细胞活力的影响

如图 4 所示,9 组细胞间活性有统计学差异 ($F = 131.857, P < 0.01$)。转染 siRNA-SIRT3 及空白载体 Vector 细胞的活性均较野生型 WT 相应组降低 ($P < 0.05$)。Control 组中,SIRT3 $^{-/-}$ 组 (1.104 ± 0.100) 及 Vector 组 (1.119 ± 0.045) 的活性均为 WT (1.535 ± 0.059) 的 73%左右,而 SIRT3 $^{-/-}$ 及 Vector 组两者间活性并无显著性差异 ($P = 0.741$)。OGD 后 3 组细胞的活性均下降,SIRT3 $^{-/-}$ 组 (0.430 ± 0.009) 与 WT (0.634 ± 0.072) 及 vector (0.562 ± 0.140) 组相比,活性下降更明显 (P 均 < 0.05)。经预处理后 3 组细胞的活性均较单纯缺氧

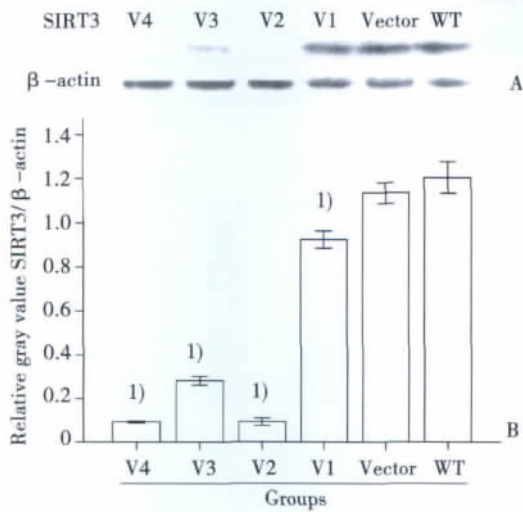


图 3 Western blot 筛选有效的 SIRT3 干扰序列
Fig.3 The expression of SIRT3 was assessed at the protein level by western blot to select the effective interference sequences

Digital photograph showing the expression of SIRT3 detected by Western blot. A; Bar graph showing Western bolts of quantified by densitometric analysis; B; WT = Wild type, Vector = Empty vector, V1, V2, V3 and V4 are four different sequences of siRNA against SIRT3. 1) $P < 0.05$ vs WT.

组增加(与 OGD 组比较, $P < 0.05$), 虽然 SIRT3 $^{-/-}$ 组 (0.624 ± 0.021) 的活性较 Vector 组 (0.669 ± 0.060) 下降, 但两者间没有统计学差异 ($P = 0.311$)。

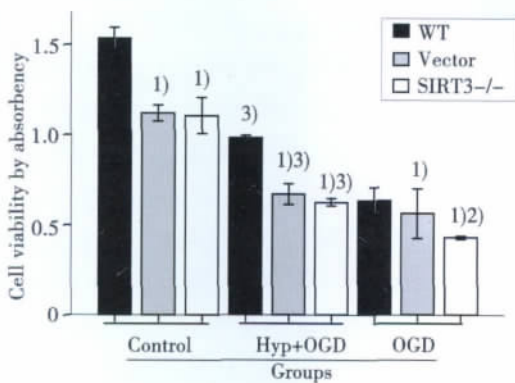


图 4 MTT 测定干扰 SIRT3 的基因后对细胞活性的影响
Fig.4 The effect of SIRT3 $^{-/-}$ on cell viability

WT = Wild type, Vector = Empty vector, SIRT3 $^{-/-}$ = with SIRT3 gene knocked down. Hyp + OGD = Hypoxic preconditioning + Oxygen-glucose deprivation. OGD = Oxygen-glucose deprivation. 1) $P < 0.05$ vs WT of the same group; 2) $P < 0.05$ vs vector in OGD; 3) $P < 0.05$ vs OGD of the same group.

2.5 荧光定量测定干扰 SIRT3 基因后对于各组细胞 ATP 水平的影响

如图 5 所示, 6 组细胞间的 ATP 水平差异有统计学意义 ($F = 104.079, P < 0.01$)。正常情况下 SIRT3 $^{-/-}$ 组 (0.633 ± 0.025) 与 Vector 组 (0.667 ± 0.025) 的 ATP 水平无显著性差异 ($P = 0.11$)。OGD 后两种细胞的 ATP 水平均明显下降, 分别为各自对照组的 67.2% 及 52.3% ($P < 0.05$), SIRT3 $^{-/-}$ 组 (0.334 ± 0.006) 与 Vector 组 (0.453 ± 0.015) 相比, ATP 下降更明显 ($P = 0.000$)。经预处理后 SIRT3 $^{-/-}$ 组 (0.390 ± 0.010) 的 ATP 水平较单纯 OGD 组 (0.334 ± 0.006) 增加 ($P < 0.05$), 回升到 61.9% (与 control 组比较, $P < 0.05$), 但 Vector 组的 ATP 水平反而下降, 与缺氧组间差异有统计学意义 (0.387 ± 0.042 VS $0.453 \pm 0.015, P = 0.005$), 而 SIRT3 $^{-/-}$ 组与 Vector 组间差异无统计学意义 ($P = 0.866$)。

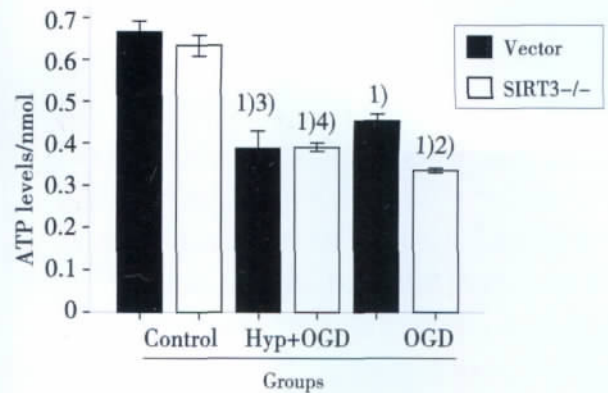


图 5 干扰 SIRT3 基因后对细胞 ATP 水平的影响
Fig.5 The effect on cellular ATP levels in cells with SIRT3 knocked down

Fluorescence was measured using a fluorescence microplate reader at an excitation/emission wavelength of 535/587nm. ATP nanomoles were calculated according to a standard curve. Vector = Empty vector, SIRT3 $^{-/-}$ = with SIRT3 gene knocked down. Hyp+OGD = Hypoxic preconditioning + Oxygen-glucose deprivation. OGD = Oxygen-glucose deprivation. 1) $P < 0.05$ vs control of the same group; 2) $P < 0.05$ vs vector in OGD; 3) $P < 0.05$ vs OGD of vector. 4) $P < 0.05$ vs OGD of SIRT3 $^{-/-}$.

2.6 Western blot 检测 SIRT3 基因干扰后对 PGC-1 α 及 MnSOD 表达的影响

如图 6A 所示, 3 组细胞间 SIRT3 蛋白的表达有统计学差异 ($F = 61.168, P = 0.000$)。SIRT3 $^{-/-}$ 组 SIRT3 蛋白的表达较野生型 WT 组及空白载体 Vector 组明显下降 ($P = 0.000$), 而 WT 组及 Vector

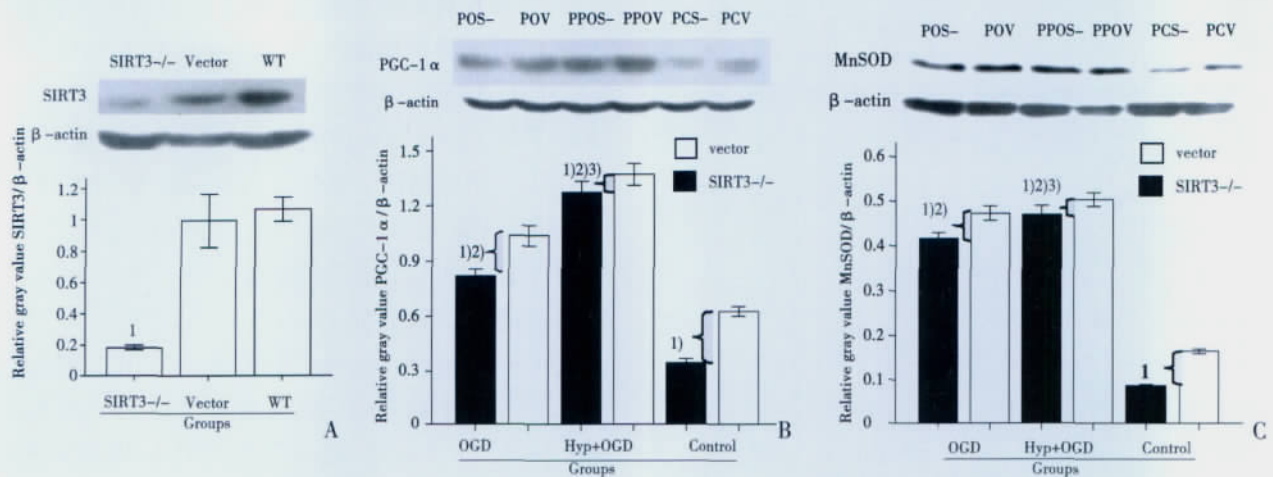


图 6 基因干扰 SIRT3 后 PGC-1 α 、MnSOD 的表达情况

Fig.6 The expression of PGC-1 α and MnSOD at the protein level in cells transfected with SIRT3-RNAi-LV

Digital photograph showing the expression of PGC-1 α and MnSOD detected by Western blot. Bar graph showing Western bolts of quantified by densitometric analysis. WT = Wild type, Vector = Empty vector, SIRT3^{-/-} = with SIRT3 gene knocked down. Hyp+OGD = Hypoxic preconditioning+ Oxygen-glucose deprivation. OGD = Oxygen-glucose deprivation. PCV = control of vector; PCS^{-/-} = control of SIRT3^{-/-}; PPOV = Hyp+OGD of vector; PPOS^{-/-} = Hyp+OGD of SIRT3^{-/-}; POV = OGD of vector; POS^{-/-} = OGD of SIRT3^{-/-}; 1) $P < 0.05$ vs vector of the same group; 2) $P < 0.05$ vs control of SIRT3^{-/-}; 3) $P < 0.05$ vs OGD of SIRT3^{-/-}.

组间差异无统计学意义 ($P = 0.459$), 表明成功构建稳定细胞株。图 6B、C 则显示 SIRT3-RNAi 后 6 组细胞间 PGC-1 α 及 MnSOD 蛋白的表达有显著性差异 ($FB = 210.827$, $FC = 533.466$, P 均 = 0.000)。SIRT3^{-/-} 3 组细胞 PGC-1 α 及 MnSOD 蛋白的表达与 Vector 组对应的 3 组比较明显下降 ($P < 0.05$), Hyp+OGD 及 OGD 相对于各自 control 组均上调其表达 ($P < 0.05$), 且预处理组的上调更明显 (与 OGD 组比较, $P < 0.05$), 预处理及缺氧刺激后均能减少 SIRT3^{-/-} 与 Vector 间 PGC-1 α 、MnSOD 的表达差异的大小 (与 control 组比较), 而且 Hyp+OGD 组的差值减少的程度最明显。

3 讨论

缺氧使线粒体产生过多的 ROS, 最终导致细胞功能障碍, 因而 ROS 的清除可产生重要的细胞保护作用^[8-9]。线粒体的 ROS 主要是通过细胞内的锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 转变成 H₂O₂ 而被清除^[10]。在本课题的前期研究中发现缺氧预处理后 MnSOD 的表达上调, ROS 的清除增多。

过氧化物酶体增生激活受体- γ 的共刺激因子-1 α (PGC-1 α) 作为核转录共刺激因子可协助相关转录因子上调 MnSOD、人过氧化物酶 3

(Peroxioredoxin 3, Prx3)、还原型硫氧还蛋白 2 (TRXSH2) 等保护性蛋白进而减少 ROS 的累积^[10]。同时本课题的前期研究中发现缺氧预处理后 PGC-1 α 的表达增加, 因此我们推测缺氧预处理后 ROS 的清除增加与 PGC-1 α 上调 MnSOD 的表达有关。

研究报道 Sirtuin3 (SIRT3) 可刺激 cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 的磷酸化, 上调 PGC-1 α 的表达, 减少 ROS 的生成^[7]。同时 SIRT3 可上调 MnSOD 的表达, 减少 ROS 的生成, 参与抗衰老及抗肿瘤^[6,11]。本实验的前期研究也显示缺氧预处理后的 SIRT3 表达增加, 添加重组 SIRT3 蛋白后 PGC-1 α 及 MnSOD 的表达也上调^[12]。可见, SIRT3 与 PGC-1 α 、MnSOD 及 ROS 的清除间存在一定的相关关系。我们猜测 SIRT3 作为能量感受器及 ROS 清除的介导者在缺氧预处理中可能发挥重要作用。因此本实验通过把携带 SIRT3-RNAi 的慢病毒整合到宿主基因组中, 靶向性沉默 SIRT3 基因, 进一步逆向探讨 SIRT3 在缺氧预处理中的重要作用。

结果显示, SIRT3 基因干扰后在正常情况下对细胞的活性影响不大, 但明显降低细胞对于缺氧引起的损伤的耐受力, 而预处理则通过其它的途径相对代偿, 减少细胞的损伤。类似的结果也可见

于其对 ATP 水平的影响。SIRT3 基因干扰后在正常情况下对于 ATP 的水平影响不大, 但则明显降低细胞在缺氧情况下的 ATP 生成, 而预处理则通过其它的途径相对代偿。文献报道 SIRT3 基因敲除后长链酰辅酶 A 脱氢酶(long-chain acyl-CoA dehydrogenase/long-chain acyl coenzyme A dehydrogenase, LCAD) 的第 42 位赖氨酸残基高度乙酰化, 降低其活性, 进而降低脂肪酸氧化的水平, 减少 ATP 的生成^[13]。

干扰 SIRT3 的表达后在正常、预处理及缺氧状态下 PGC-1 α 、MnSOD 的表达均较 Vector 组下降, Hyp+OGD 及 OGD 相对于各自对照组均上调, 预处理及缺氧刺激后均能减少 SIRT3-/- 与 Vector 间 PGC-1 α 、MnSOD 的表达的差异(与对照组间差值比较), 而且 Hyp+OGD 组差值减少的程度最明显。说明基因干扰 SIRT3 后 PGC-1 α 、MnSOD 的表达下降, 但预处理及缺氧均能通过其他的途径上调 PGC-1 α 、MnSOD 的表达, 其中预处理的代偿作用更强, SIRT3 为预处理及缺氧处理上调 PGC-1 α 、MnSOD 的其中一条途径。

综合可见, 预处理及缺氧均可通过 SIRT3 上调 PGC-1 α 及 MnSOD 的表达, 减少 ROS 的生成, 同时增加 ATP 的生成, 进而减少氧化刺激及维持细胞的能量供应, 增强细胞抵御缺氧损害的能力。基因干扰 SIRT3 后正常情况下对细胞的功能影响不大, 但却大大降低细胞对于缺氧刺激的抵抗力, 而缺氧预处理则通过其它的途径代偿下游保护性基因的表达, 使 Hyp+OGD 组的 SIRT3-/- 与 Vector 的功能学差异无统计学意义, 进而从逆向说明 SIRT3 在预处理及缺氧刺激中发挥重要的作用, 但不是唯一的。缺氧预处理的保护网络机制非常广泛而且复杂, 尚需未来的进一步研究探讨。我们对于 SIRT3 在缺氧预处理中的机制探讨可为脑卒中的治疗提供一个新的认识及发展方向。

参考文献:

[1] Prass K, Scharff A, Ruscher K, et al. Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin[J]. *Stroke*, 2003, 34(8): 1981-1986.
[2] 李云霞, 丁素菊, 詹青, 等. 去铁敏预处理对神经元缺氧性损伤的保护作用[J]. *中华神经科杂志*, 2009, 42(2): 119-124.

- [3] 王云皎, 程智刚, 于鹏, 等. 携带 DREAM 基因 shRNA 的慢病毒载体的构建及其对坐骨神经缩窄损伤大鼠的镇痛作用[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2009, 34(8): 723-730.
[4] Pluta K, Kacprzak MM. Use of HIV as a gene transfer vector[J]. *Acta Biochim Pol*, 2009, 56(4): 531-595.
[5] 蒋小, 杨烈, 周总光, 等. PPAR δ 基因 RNA 干扰慢病毒载体的构建及稳定干扰结肠癌细胞株 KM12C 的建立[J]. *生物医学工程学杂志*, 2010, 27(2): 400-406.
[6] Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, et al. SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of ku70 [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(20): 6384-6401.
[7] Shi T, Wang F, Stieren E, et al. SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(14): 13560-13567.
[8] Liu J, Narasimhan P, Yu F, et al. Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin[J]. *Stroke*, 2005, 36(6): 1264-1269.
[9] Stowe DF, Camara AK. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(6): 1373-1414.
[10] Li L, Zhang B, Tao Y, et al. DL-3-n-butylphthalide protects endothelial cells against oxidative/nitrosative stress, mitochondrial damage and subsequent cell death after oxygen glucose deprivation in vitro[J]. *Brain Res*, 2009, 1290: 91-101.
[11] Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, et al. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress[J]. *Cancer Cell*, 2010, 17(1): 41-52.
[12] 李超英, 李玲, 赵嘉, 等. Sirtuin3 参与缺氧预处理对神经元得保护作用[J]. *中华神经科杂志*, 2011, 44(7): 482-486.
[13] Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, et al. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation[J]. *Nature*, 2010, 464(7285): 121-125.

(编辑 刘清海)