

SIRT1基因沉默在辐射诱导的NLRP3和IL-1 β 表达中的作用研究

付岳 王彦 杜利清 徐畅 刘建香 樊飞跃 苏旭 樊赛军 刘强

【摘要】 目的 研究沉默信息调节因子1(SIRT1)基因沉默对间充质干细胞(MSCs)受照后Nod样受体蛋白3(NLRP3)和IL-1 β 表达的影响,探讨SIRT1激活剂——白藜芦醇的辐射防护作用及其机理。方法 将MSCs分为空白对照组、单纯照射组、RNA干扰组、白藜芦醇组和RNA干扰+白藜芦醇组。采用酶联免疫吸附测定、Western blot和RT-PCR等方法检测IL-1 β 、SIRT1和NLRP3在蛋白和mRNA水平的表达。结果 辐射可导致MSCs细胞外IL-1 β 分泌水平明显升高,给予白藜芦醇后,细胞IL-1 β 分泌水平较单纯照射组显著下降($t=21.68, P<0.01$),NLRP3和IL-1 β mRNA水平较单纯照射组明显降低($t=14.44, P<0.01; t=12.35, P<0.01$),SIRT1基因沉默后,NLRP3和IL-1 β 的mRNA水平回升至单纯照射组水平($t=14.86, P<0.01; t=11.12, P<0.01$),即使再给予白藜芦醇,NLRP3和IL-1 β 的mRNA水平仍明显高于白藜芦醇组($t=11.31, P<0.01; t=10.54, P<0.01$)。结论 SIRT1基因沉默减弱了白藜芦醇对辐射诱导的NLRP3和IL-1 β 的抑制作用,说明白藜芦醇可能通过激活SIRT1、抑制NLRP3、降低IL-1 β 的表达,从而减轻辐射引起的细胞损伤。

【关键词】 沉默信息调节蛋白质类;白细胞介素1 β ;辐射,电离;白藜芦醇;Nod样受体蛋白3

Effects of NLRP3 and IL-1 β on radiation-induced expression through SIRT1 gene silencing Fu Yue*, Wang Yan, Du Liqing, Xu Chang, Liu Jianxiang, Fan Feiyue, Su Xu, Fan Saijun, Liu Qiang. *Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Liu Qiang, Email: liuqiang@irm-cams.ac.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of silence information regulator-1 (SIRT1) on NLRP3 and IL-1 β production in mesenchymal stem cells (MSCs) exposed to radiation and to explore the SIRT1 role against radiation. **Methods** MSCs were divided into control, irradiation, RNAi, resveratrol, and RNAi+resveratrol group. IL-1 β , SIRT1, and Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) expressions were detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blot analysis, and real-time PCR assay. **Results** Extracellular IL-1 β secretion induced by radiation was increased significantly. After resveratrol treatment, the levels of IL-1 β secretion decreased compared with those of the radiation group ($t=21.68, P<0.01$). The mRNA level of NLRP3 and IL-1 β also decreased compared with that of the radiation group ($t=14.44, P<0.01; t=12.35, P<0.01$). SIRT1 knockdown significantly suppressed resveratrol-mediated anti-inflammatory activity ($t=14.86, P<0.01; t=11.12, P<0.01$). The mRNA level of NLRP3 and IL-1 β remained higher in the RNAi+resveratrol group than those in the resveratrol group ($t=11.31, P<0.01; t=10.54, P<0.01$). **Conclusions** SIRT1 gene silencing can suppress NLRP3 and IL-1 β expression

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.05.003

基金项目: 卫生部卫生行业科研专项(201002009); 国家自然科学基金(31300695); 天津市自然科学基金(12JCYBJC15300, 13JCQNJC11600)

作者单位: 300192, 中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室(付岳, 王彦, 杜利清, 徐畅, 樊飞跃, 樊赛军, 刘强); 101111, 北京市医疗器械检验所, 医疗器械检验与安全性评价北京市重点实验室(付岳); 100088 北京, 中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所(刘建香, 苏旭)

通信作者: 刘强(Email: liuqiang@irm-cams.ac.cn)

induced by radiation. Thus, resveratrol may alleviate cellular damage induced by radiation through activation of SIRT1, inhibition of NLRP3, and decrease in IL-1 β expression.

【Key words】 Silent information regulator proteins; Interleukin-1 β ; Radiation, ionizing; Resveratrol; Nod-like receptor protein 3

电离辐射可导致炎症因子 IL-1 β 的高表达, 促进细胞或机体的炎症反应。而 IL-1 β 的分泌与细胞中 Nod 样受体蛋白 3 (Nod-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症复合体相关^[1]。NLRP3 蛋白复合体是近年来发现的炎症复合体, 该复合体是启动固有免疫反应的主要功能单位。NLRP3 一旦被危险信号激活, 该复合体就会切割 IL-1 β 前体使之转化为成熟的细胞因子 IL-1 β , 从而导致炎症反应^[2]。沉默信息调节因子 1 (silence information regulator-1, SIRT1) 可以通过对炎症相关转录因子进行去乙酰化加工抑制 NLRP3 的表达, 进而抑制 IL-1 β 的表达, 实现抗炎抗凋亡的作用。白藜芦醇是 SIRT1 的天然激活剂, 对炎症性疾病表现出良好的治疗前景^[3]。本研究探索了白藜芦醇通过 SIRT1 和 NLRP3 途径在辐射诱导产生的炎症中的调节作用, 为辐射防护药物的开发提供新的方向和思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和放射源

DMEM/F12 培养基、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司; 白藜芦醇购自德国 Sigma 公司, 溶于二甲基亚砷 (购自天津市江天化工科技有限公司) 中, 储液浓度为 50 mmol/L; Human IL-1 β Quantikine 酶联免疫吸附测定试剂盒购自美国 R&D Systems 公司; 实验所用抗体为兔抗人 IL-1 β 抗体、鼠抗人 β -肌动蛋白抗体, 均购自英国 Abcam 公司; PrimeScript RT 试剂盒及 BCA (bicinchoninic acid) 蛋白定量试剂盒购自日本 Takara 公司; RNA 干扰慢病毒载体由上海生工生物工程股份有限公司合成; 人间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 由细胞产品国家工程研究中心赠送。¹³⁷Cs γ 射线照射源由加拿大原子能公司生产 (型号 USD), 剂量率为 0.873 Gy/min。

1.2 细胞培养、实验分组及照射

用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 MSCs。实验共分 5 组, 其中, 空白对照组: 不作处理; 单纯照射

组: 给予细胞 4 Gy 照射; RNA 干扰组: 采用慢病毒载体 pGCSIL-GFP (其中, GFP 为绿色荧光蛋白) 将 SIRT1 短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 转染入细胞 (正义引物: 5'-CCGGGCGGGAATC-CAAAGGATAATTCTCGAGAATTATCCTTTGGATTC-CCGCTTTTTG-3'; 反义引物: 5'-AATTCAAAAAG-CGGGAATCCAAAGGATAATTCTCGAGAATTATCC-TTTGGATTCCCGC-3'); 白藜芦醇组: 给予细胞 200 μ mol/L 的白藜芦醇作为阳性对照; RNA 干扰+白藜芦醇组: 使用慢病毒载体将 SIRT1 shRNA 转染入细胞, 再给予细胞 200 μ mol/L 的白藜芦醇。当细胞生长至对数生长期时进行实验, SIRT1 shRNA 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 200 μ mol/L 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。

1.3 酶联免疫吸附测定

严格按照 Human IL-1 β Quantikine 酶联免疫吸附测定试剂盒中说明书的方法进行操作。取 200 μ 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 μ l IL-1 β 偶联物, 孵育 1 h 后, 再弃去。加入 200 μ l 底物溶液, 避光孵育 20 min 后, 加入 50 μ l 终止液, 于 450 nm 处检测吸光度值, 通过绘制标准曲线, 计算出 IL-1 β 的浓度。

1.4 Western blot

照射后 24 h 收集细胞提取细胞总蛋白, 每 10⁶ 个细胞加入 100 μ l Thermo Scientific Pierce 裂解液裂解细胞。蛋白定量方法按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行。取 25 μ g 蛋白进行不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转移至聚偏二氟乙烯膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h, 加入一抗, 4 $^{\circ}$ 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, 采用增强化学发光法检测。以 β -肌动蛋白作为内参蛋白。

1.5 RT-PCR

用 Trizol 法提取总 RNA, 采用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 25 μ l 体系配制好后, 用

ABI Prism 7500 Sequence Detection System 进行分析。引物由上海生工生物工程有限公司合成，序列见表 1。

表 1 RT-PCR 所用引物序列

Table 1 Sequences of primers used in RT-PCR	
基因名称	引物序列
SIRT1	(正向) 5'-GACTTCAGGTCAAGGGAT-3'
	(反向) 5'-CGTGCTATGTTCTGGGA-3'
NLRP3	(正向) 5'-ACAGCATTGAAGAGGAGTGGA-3'
	(反向) 5'-TCGTGTGTAGCGTTTGTGAG-3'
IL-1 β	(正向) 5'-GTGGCAATGAGGATGACTTGT-3'
	(反向) 5'-TGTAGTGGTGGTCGGAGATTC-3'
GAPDH	(正向) 5'-ATGACATCAAGAAGGTGCTG-3'
	(反向) 5'-CATACCAGGAAATGAGCTTG-3'

注：表中，SIRT1：沉默信息调节因子 1；NLRP3：Nod 样受体蛋白 3；GAPDH：甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.6 统计学方法

上述实验均重复 3 次，数据采用 SPSS13.0 统计学软件进行分析。组间差异采用单因素方差分析，两两比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs 受照后 IL-1 β 的分泌及表达水平

辐射对 MSCs IL-1 β 的影响见图 1。如图 1 所示，MSCs 在接受照射后，IL-1 β 胞外分泌量(2 Gy: $t = 14.47, P < 0.01$; 4 Gy: $t = 16.33, P < 0.01$)以及胞内表达量较空白对照组明显升高，并且在 0~4 Gy 照射剂量范围内随着照射剂量的升高而升高，而在 8 Gy 照射后有所下降。

2.2 SIRT1 基因沉默对 NLRP3 和 IL-1 β 表达的影响

SIRT1 shRNA 转染进入细胞后，RNA 干扰组 SIRT1 mRNA 表达水平较白藜芦醇组显著降低($t = 15.79, P < 0.01$)(图 2 中 A)。受照细胞给予白藜芦醇后，MSCs IL-1 β 的分泌水平较单纯照射组显著下降($t = 21.68, P < 0.01$)。SIRT1 基因沉默后，MSCs IL-1 β 的分泌水平较白藜芦醇组显著升高($t = 18.57, P < 0.01$)，抵抗了白藜芦醇对辐射诱导 IL-1 β 的抑制作用(图 2 中 B)。给予白藜芦醇后，MSCs 的 NLRP3 和 IL-1 β 蛋白表达水平明显降低，而 SIRT1 沉默后再给予白藜芦醇，细胞内 NLRP3 和 IL-1 β 的表达水平较单纯照射组无明显变化(图 2 中 C)。同样，如图 2 中 D 所示，给予白藜芦醇后，MSCs

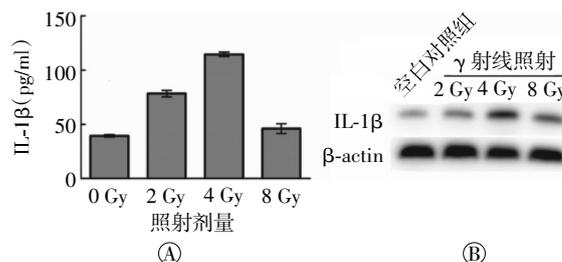


图 1 不同剂量照射后 MSCs IL-1 β 的分泌和表达水平 图中，A：给予 MSCs 不同剂量(0、2、4 和 8 Gy)照射，照射后 24 h MSCs 胞外分泌 IL-1 β 的变化情况(与空白对照组比较，2 Gy: $t = 14.47, P < 0.01$; 4 Gy: $t = 16.33, P < 0.01$)；B：MSCs 受照后 24 h 胞内 IL-1 β 蛋白的表达改变。MSCs：间充质干细胞。

Fig.1 MSCs IL-1 β expression levels after radiation

的 NLRP3 和 IL-1 β mRNA 水平较单纯照射组明显降低($t = 14.44, 12.35, P$ 均 < 0.01)，而 SIRT1 沉默后，NLRP3 和 IL-1 β 的 mRNA 水平回升至单纯照射组水平($t = 14.86, 11.12, P$ 均 < 0.01)，即使再给予白藜芦醇，细胞内 NLRP3 和 IL-1 β 的 mRNA 水平仍明显高于白藜芦醇组($t = 11.31, 10.54, P$ 均 < 0.01)，提示 SIRT1 基因沉默后，白藜芦醇对辐射诱导的 NLRP3 和 IL-1 β 的抑制作用明显减弱。

3 讨论

众所周知，白藜芦醇是组蛋白去乙酰化酶 SIRT1 的天然激活剂，具有很好的抗炎作用^[5-7]，近年来有研究发现，白藜芦醇可以通过激活 SIRT1 蛋白抑制 TNF- α 引起的炎症反应^[8-9]。辐射应激可诱导细胞 IL-1 β 的表达水平升高，进而导致细胞凋亡和组织损伤。本研究发现白藜芦醇具有降低辐射导致的 IL-1 β 的分泌作用，进而减轻由 IL-1 β 产生的炎症反应。提示白藜芦醇可能通过抗炎反应发挥其辐射防护作用。因此，本研究进一步观察了白藜芦醇是否通过 SIRT1 通路在 IL-1 β 的上游调控其表达。

受到促炎因子的刺激后，炎症复合体 NLRP3 可切割 proIL-1 β 使之转化为成熟的炎症因子 IL-1 β ^[2]，SIRT1 可以通过对炎性相关转录因子进行去乙酰化加工，进而抑制 NLRP3 的表达^[10-11]，所以笔者推测白藜芦醇通过激活 SIRT1，降低 NLRP3 和 IL-1 β 的表达。本研究显示，白藜芦醇可以显著提高 SIRT1 蛋白在间充质干细胞内的表达水平，说明白藜芦醇很可能是通过 SIRT1 来抑制辐射诱导 IL-1 β 产生的。然而当细胞内 SIRT1 基因沉默后，胞内 SIRT1 mRNA 水平降低，NLRP3 和 IL-1 β 水平升高，白藜芦醇的

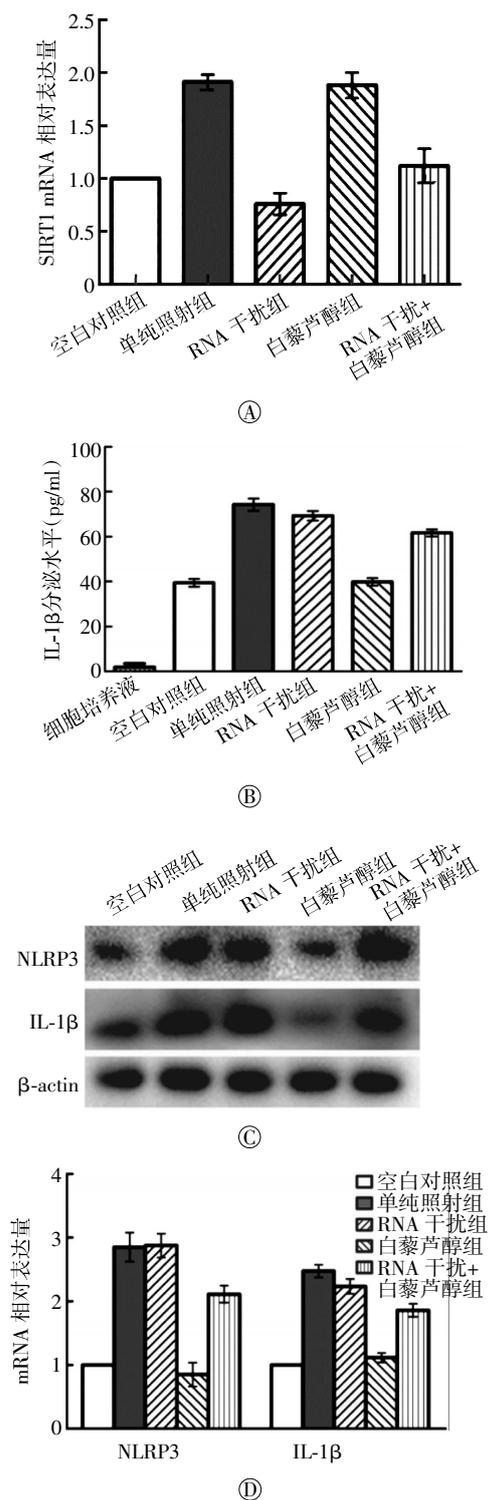


图 2 SIRT1 基因沉默对白藜芦醇抗炎活性的影响 图中, A: SIRT1 基因沉默后各组 SIRT1 mRNA 水平; B: SIRT1 基因沉默对 IL-1 β 细胞外分泌水平的影响; C: SIRT1 基因沉默对 NLRP3 和 IL-1 β 胞内表达水平的影响; D: SIRT1 基因沉默对 NLRP3 和 IL-1 β 转录水平的影响。SIRT1: 沉默信息调节因子 1; NLRP3: Nod 样受体蛋白 3。

Fig.2 Influences on the anti-inflammation effect of resveratrol after SIRT1 gene silence

抗炎作用明显减弱,说明 SIRT1 在辐射诱发而产生 IL-1 β 的过程中具有重要作用,可见白藜芦醇在体外可通过激活 SIRT1,抑制 NLRP3 的表达,进而降低 IL-1 β 的表达,发挥辐射防护作用。

综上所述,白藜芦醇可在体外激活 SIRT1,抑制 NLRP3 的转录和表达,进而抑制炎症因子 IL-1 β 的表达,发挥其辐射防护作用。本研究将为新型辐射防护药物的开发并明确其作用机制提供科学依据。

参 考 文 献

- [1] Chen M, Wang H, Chen W, et al. Regulation of adaptive immunity by the NLRP3 inflammasome[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(5): 549-554.
- [2] 王月英, 吴红英, 李德冠, 等. 不同剂量 ^{137}Cs γ 射线照射对小鼠造血系统的影响[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2013, 37(1): 1-4.
- [3] Martín AR, Villegas I, La Casa C, et al. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats[J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67(7): 1399-1410.
- [4] 付岳, 杜利清, 王彦, 等. 白藜芦醇抑制辐射诱导的 IL-1 β 表达[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2013, 33(3): 239-241.
- [5] Xu Q, Si LY. Resveratrol role in cardiovascular and metabolic health and potential mechanisms of action[J]. *Nutr Res*, 2012, 32(9): 648-658.
- [6] Sheth S, Jajoo S, Kaur T, et al. Resveratrol reduces prostate cancer growth and metastasis by inhibiting the Akt/MicroRNA-21 pathway [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51655[2015-01-07]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0051655>.
- [7] Osman AM, Bayoumi HM, Al-Harhi SE, et al. Modulation of doxorubicin cytotoxicity by resveratrol in a human breast cancer cell line[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2012, 12(1): 47[2015-01-07]. <http://www.cancerci.com/content/12/1/47>.
- [8] Gertz M, Nguyen GT, Fischer F, et al. A molecular mechanism for direct sirtuin activation by resveratrol[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49761[2015-01-07]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0049761>.
- [9] Zhu X, Liu Q, Wang M, et al. Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF- α induced inflammation in fibroblasts[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27081. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0027081>.
- [10] Bauer C, Duesell P, Mayer C, et al. Colitis induced in mice with dextran sulfate Sodium(DSS) is mediated by the NLRP3 inflammasome[J]. *Gut*, 2010, 59(9): 1192-1199.
- [11] 李德冠, 王月英, 吴红英, 等. 大剂量 γ 射线照射对小鼠免疫系统损伤远期影响的研究[J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2012, 36(2): 109-112.

(收稿日期: 2015-01-07)