

siRNA 干扰 SIRT1 对辐射后 IL-6 表达的影响

王璐 李晴 徐畅 王彦 杜利清 王芹 杨福军 孙元明 刘强

【摘要】目的 研究 siRNA 干扰沉默信息调节因子 2 相关酶 1(SIRT1)对间充质干细胞(MSCs)电离辐射后诱导的炎性因子白细胞介素 6(IL-6)的影响,探究 SIRT1 的辐射防护作用。**方法** 使用 0、2、4、8 Gy 照射 MSCs,分别在照后 3、6、12、24 h 提取总 RNA 和总蛋白,检测 IL-6 表达水平;将 MSCs 分为空白对照组、单纯照射组和 SIRT1 干扰联合照射组,使用 Western blot、RT-PCR 检测 SIRT1 和 IL-6 胞内表达。**结果** MSCs 在电离照射后,IL-6 的表达水平先升高后降低;在照后 12 h 达到最高,24 h 恢复基准水平;而联合 SIRT1 干扰会引起 IL-6 水平进一步升高,加重 MSCs 电离辐射后的炎症反应。**结论** SIRT1 可能通过抑制电离辐射诱导的炎性因子 IL-6 的表达,发挥辐射防护作用。

【关键词】 沉默信息调节蛋白类;RNA 干扰;间充质干细胞;白细胞介素 6;辐射,电离

Effect of SIRT1 siRNA interference on the expression of IL-6 after radiation Wang Lu, Li Qing, Xu Chang, Wang Yan, Du Liqing, Wang Qin, Yang Fujun, Sun Yuanming, Liu Qiang. Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300192, China

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

【Abstract】 Objective To investigate the effect of the knockdown of silent information regulation factor 2 related enzyme on inflammatory factor IL-6 produced in irradiated mesenchymal stem cells (MSCs) and explore the radioprotective effect of SIRT1. **Methods** MSCs was treated with different dose of irradiation, and the expression of IL-6 in different time was detected by Western-blot and RT-PCR; MSCs were divided into control group, radiation group and combination group, the expression of IL-6 and SIRT1 was detected by Western-blot and RT-PCR. **Results** Ionizing radiation could lead to the increasing of IL-6 expression in MSCs. In detail, the expression level of IL-6 protein reached the peak in 12 hours after radiation and then slowly recovered to the baseline in 24 hours after radiation. And interfered with SIRT1 could aggravate the expression of ionizing radiation-induced IL-6 and worsen inflammation. **Conclusion** SIRT1 may inhibit the ionizing radiation-induced expression of inflammatory cytokines IL-6.

【Key words】 Silent information regulator proteins; RNA interference; Mesenchymal stem cells; Interleukin-6; Ionizing, radiation

沉默信息调节因子 2 相关酶 1(silent information regulator factor 2 related enzyme 1, SIRT1)是一种高度保守的依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的组蛋

白去乙酰化酶,主要通过组蛋白及其下游信号蛋白的去乙酰化作用对细胞代谢、衰老、凋亡等系列活动进行调节^[1]。近年来,研究发现,SIRT1 在炎症反应中也发挥着重要作用^[2]。前期研究发现,SIRT1 的激活剂白藜芦醇能够抑制辐射诱导的白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)的表达,但其机制尚不明确。本研究采用小干扰 RNA(siRNA)技术对 SIRT1 进行敲降,探究 SIRT1 对辐射诱导后 IL-6 表达的影响。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.05.017

基金项目: 国家自然科学基金(31300695,31170804);天津市自然科学基金(13JCYBJC23500,13JCQJJC11600);中国医学科学院放射医学研究所发展基金(1553)

作者单位: 300192 天津,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

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

1 材料与方法

1.1 主要试剂与放射源

siRNA Reagent System(sc-45064)及人 SIRT1 特异 siRNA 慢病毒颗粒基因沉默子(sc-40986)购自美国 Santa Cruz 公司。RIPA 蛋白裂解液(P0013B)购自上海碧云天公司;兔抗人 IL-6 一抗(ab6672)购自英国 Abcam 公司;兔抗人 GAPDH 一抗(G9545)购自美国 Sigma 公司;PrimeScript RT 及 BCA(bicinchoninic acid)蛋白定量试剂盒购自日本 Takara 生物公司;FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)购自瑞士 Roche 公司。 ^{137}Cs γ 射线照射源由加拿大原子能研究院生产,剂量率为 0.873 Gy/min。

1.2 细胞培养

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。DMEM/F12 培养基与胎牛血清均购自美国 Gibco 公司。细胞培养采用含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,在 37°C 含 5% CO_2 饱和湿度下培养。选取处于对数生长期的细胞进行实验,将 MSCs 分为空白对照组(不作任何处理),单纯照射组(4 Gy 单纯照射)与 SIRT1 干扰联合照射组(简称联合组, SIRT1 siRNA 干扰后 48 h 进行 4Gy 照射)。

1.3 慢病毒转染实验

在 MSCs 生长至 60%~70% 时进行实验,按照 siRNA Reagent System 操作步骤,将配制好的慢病毒转染试剂 200 μl 室温孵育 30 min 后,加入 0.8 ml 转染培养基,为细胞更换此转染培养基,在 37°C 含 5% CO_2 饱和湿度条件下培养 7 h。加入含两倍血清的正常培养基 1 ml, 48 h 后进行随后实验。

将 MSCs 分为空白对照组(不作任何处理),空载体慢病毒干扰组(简称空载体组,含空载体慢病毒转染试剂)和 siRNA 干扰 SIRT1 组(简称 SIRT1 干扰组,含 SIRT1 siRNA 慢病毒转染试剂)。

1.4 RT-PCR 法检测

处于对数生长期的 MSCs 生长至 60%~70% 时进行照射处理:将细胞进行 2, 4, 8Gy 剂量照射,分别在照后 3、6、12、24 h 用 Trizol 法提取细胞总 RNA,采用逆转录试剂盒逆转录为 cDNA,使用 Rox 酶试剂盒 25 μl 反应体系进行 PCR 反应,ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems-Life Technologies) 分析。引物序列由北

京华大基因科技有限公司合成,见表 1。以 GAPDH 为内参,空白组为对照,用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算相对表达量。

表 1 RT-PCR 反应所用引物序列

Table 1 Primers in RT-PCR

基因名称	序列
IL-6	上游 5'-ATGAACCTCCTTCTCCACAAGC-3' 下游 5'-CTACATTTGCCGAAGAGCCCTCAGGCTGGA-CTG-3'
SIRT1	上游 5'-TAGCCTTGTCAGATAAGGAAGGA-3' 下游 5'-ACAGCTTCACAGTCAACTTTGT-3'
GAPDH	上游 5'-ACAACCTTTGCTATCCTGGAAGG-3' 下游 5'-GCCATCAGCCACAGTTTC-3'

注:表中, SIRT1: 沉默信息调节因子 2 相关酶 1; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.5 Western blot 检测

MSCs 生长至对数期进行实验,每 10^6 个细胞加入 100 μl RIPA 蛋白液裂解细胞,按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白定量。取 30 μg 蛋白进行不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳, SIRT1 蛋白使用湿转、IL-6 和 GAPDH 蛋白使用半干转至聚偏二氟乙烯膜上,用封闭液室温封闭 1 h, 4°C 孵育一抗过夜,洗膜 3 次后加入相应的山羊抗鼠或山羊抗兔的二抗,室温孵育 1 h,洗膜 3 次后,采用化学发光法检测。以 GAPDH 作为内参蛋白。

1.6 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行统计学分析。两两比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSCs 接受不同剂量照射后不同时间点 IL-6 的表达情况

不同剂量照射后不同时间点细胞内 IL-6 mRNA 的表达水平见图 1。由图 1 可知,照射后 IL-6 的表达水平升高,其中,经 2 Gy 照射后,仅 12 h 细胞内 IL-6 mRNA 的表达水平与空白对照组相比,差异有统计学意义($t=4.626$, $P < 0.05$);经 4 Gy 照射后,3、6、12 h 细胞内 IL-6 mRNA 的表达水平与空白对照组相比,差异有统计学意义(3 h: $t=8.924$, $P < 0.05$; 6 h: $t=5.489$, $P < 0.05$; 12 h: $t=5.344$, $P < 0.05$);经 8 Gy 照射后,6、12 h 细胞内 IL-6 mRNA 的表达水平与空白对照组相比,差异具有统计学意义(6 h: $t=4.641$, $P < 0.05$; 12 h: $t=4.47$, $P < 0.05$)。

4Gy 照射 IL-6 mRNA 的表达水平与 2 Gy、8 Gy 相比, 差异无统计学意义(2Gy: $t=1.343$, $P=0.542$; 8 Gy: $t=0.765$, $P=0.74$)。将与临床剂量接近的 4Gy 为随后实验剂量。

使用 Western blot 检测 IL-6 蛋白表达水平, 结果见图 2。由图 2 可见, 4 Gy 照射后不同时间点 IL-6 蛋白表达先升高, 后降低, 在 12 h 时达到最高, 24 h 后下降至基准状态。

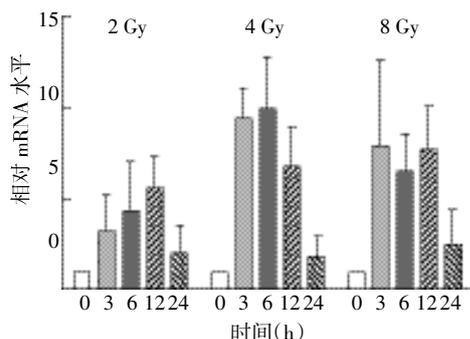


图 1 不同剂量照射不同时间点细胞内 IL-6 mRNA 的表达水平 图中, 0 组: 空白对照组。

Fig.1 Intracellular level of IL-6 mRNA in different time after different dose of radiation

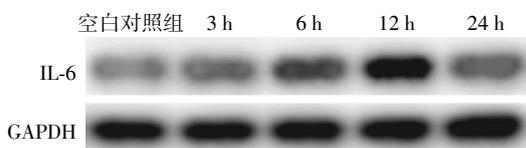


图 2 4 Gy 照射后不同时间点细胞内 IL-6 蛋白表达水平 图中, GAPDH: 上样内参蛋白。

Fig.2 Intracellular level of IL-6 protein in different time after 4 Gy radiation

2.2 siRNA 干扰 SIRT1 对照射后 MSCs IL-6 水平的影响

MSCs 生长至 50%~60% 时进行转染实验, 分别使用空载体慢病毒和含 SIRT1 siRNA 的慢病毒转染, 48 h 后用 RT-PCR 检测 SIRT1 敲降情况, 结果发现, 空载组与空白对照组相比, 差异无统计学意义 ($t=0.195$, $P=0.875$), 与预期结果一致; SIRT1 干扰组与空白对照组和空载组相比, mRNA 的表达水平明显下降, 差异具有统计学意义(与空白对照组相比: $t=3.923$, $P<0.05$; 与空载组相比: $t=2.813$, $P<0.05$)(图 3)。此研究结果提示, 空载组对 MSCs SIRT1 的表达无显著影响; 而 SIRT1 干扰组对 SIRT1 的表达有显著抑制作用。

选定具有显著差异, 且与临床剂量用量接近的

4 Gy 为实验照射剂量, 照后 12 h 为实验时间点。将生长对数期的 MSCs 细胞进行转染, 48 h 后 4 Gy 照射, 12 h 后分别提取总 RNA 和总蛋白, 用 RT-PCR 和 Western-blot 检测 SIRT1 和 IL-6 的 mRNA、蛋白表达水平。结果表明, 联合组 SIRT1 的 mRNA 水平与单纯照射组相比, 显著降低, 差异有统计学意义($t=7.992$, $P<0.05$), 单纯照射组与空白对照组比较, 差异无统计学意义($t=0.378$, $P=0.720$)(图 4 中 A); 单纯照射组、联合组的 IL-6 水平与空白对照组比较, 均显著性升高(单纯照射组: $t=6.487$, $P<0.05$; 联合组: $t=16.28$, $P<0.01$), 联合组较单纯照射组相比, IL-6 水平进一步升高 ($t=4.792$, $P<0.05$)(图 4 中 B)。Western blot 检测结果显示, 单纯照射组的 SIRT1 mRNA 水平较对照组有所下降, 联合干扰后进一步降低; 单纯照射组的 IL-6 mRNA 蛋白水平较空白对照组有所升高, 联合干扰后进一步升高, 与 SIRT1 蛋白的表达呈负相关(图 5)。

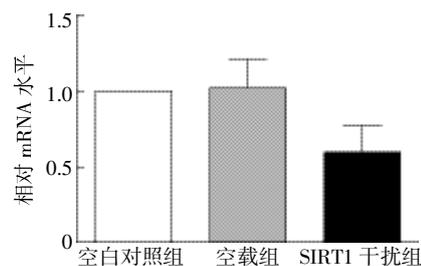


图 3 空载组和 SIRT1 干扰组的 mRNA 水平 Fig.3 Intracellular level of SIRT1 mRNA in different groups

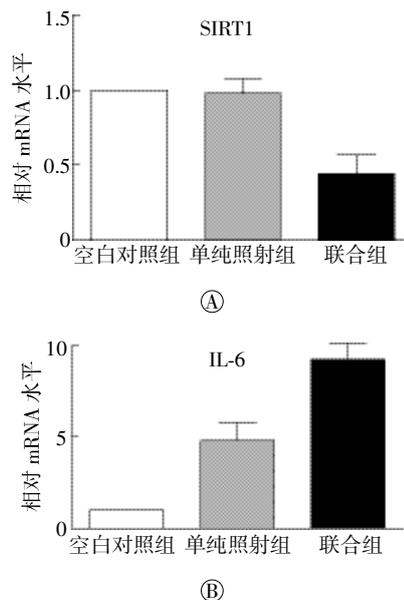


图 4 不同处理组 SIRT1 和 IL-6 的 mRNA 水平 Fig.4 Intracellular level of SIRT and IL-6 mRNA in different groups

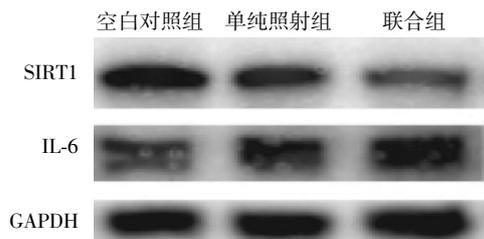


图5 不同处理组 SIRT1 和 IL-6 的蛋白表达水平 图中, SIRT1: 沉默信息调节因子 2 相关酶 1; GAPDH: 上样内参蛋白。

Fig.5 Intracellular level of SIRT1 and IL-6 protein in different groups

3 讨论

MSCs 是干细胞家族的重要成员, 由于其低免疫原性, 在免疫、炎症、辐射防护领域具有很好的应用前景^[3]。IL-6 是 MSCs 分泌的一种重要细胞因子, 也是急性炎症反应初期的一个重要的促炎因子, 在临床中常作为评价炎症反应严重程度的重要指标^[4]。但过高水平的 IL-6 会催化放大炎症反应的毒性作用, 造成细胞损伤。提示降低 IL-6 水平是减轻辐射诱导的炎症的一个重要机制。此外 IL-6 与肿瘤的发生、发展、转移和迁移更是密切相关^[5-6]。MSCs 作为基质细胞, 通过旁分泌途径影响肿瘤细胞的微环境, 影响肿瘤细胞存活, 从而影响临床放疗的预后。

本研究发现, 电离辐射促进 MSCs 炎症因子 IL-6 的表达, 而 SIRT1 干扰使 IL-6 的表达进一步升高。本研究使用的慢病毒转染试剂对 SIRT1 的抑制率为 40%~50%, 具有统计学意义, 干扰效率略低, 但 IL-6 的 mRNA 表达水平和蛋白表达水平均显著增高, 效果明显, 间接证明 SIRT1 能够在转录水平上有效抑制 IL-6 的表达, 提示 SIRT1 可能在电离辐射引起的急性炎症反应中发挥着抗炎的作用。MSCs 在受到电离辐射之后, IL-6 的表达先升高, 在照后 6~12 h 到达最高, 随后降低, 照后 24 h 降至基准水平, 照后 IL-6 表达水平变化呈时间依赖性, 是否与照后 SIRT1 表达的变化相关, 有待进一步实验探究。另外, 本研究发现, 在电离辐射后, SIRT1 mRNA 水平无显著性变化, 蛋白水平下降, 提示在 MSCs 受到电离辐射后, SIRT1 可能在转录后翻译水平发生变化, 导致 SIRT1 蛋白水平下降。

SIRT1 并不直接参与 IL-6 的调节, 在急性炎症反应中, SIRT1 一方面可以直接对促炎因子的组

蛋白进行去乙酰化发挥抗炎作用, 另一方面主要对核转录因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 的 P65 亚基进行去乙酰化, 抑制其转录活性, 从而降低炎症因子诸如 IL-1 β 、IL-6 等转录^[7-8]。一般认为, SIRT1 通过 NF- κ B/P65 通路参与 IL-6 的调节, NF- κ B 是一种异源二聚体蛋白, 静息状态下与其抑制蛋白 I κ B 结合并滞留在细胞质中, 激活后入核, 可直接与 IL-6 等炎症因子的启动子结合, 促进 IL-6 的表达。另外, NF- κ B 的活性与 P65 亚基 K310 的乙酰化水平有关, SIRT1 正是通过对 P65 K310 的去乙酰化, 抑制 NF- κ B 的活性^[9-10]。而在本研究中, SIRT1 干扰对照后 IL-6 表达的影响是否通过 NF- κ B 通路, 有待进一步确证。

参 考 文 献

- [1] Price NL, Gomes AP, Ling AJ, et al. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function[J]. *Cell Metab*, 2012, 15(5): 675-690.
- [2] Fu YE, Wang Y, Du LQ, et al. Resveratrol inhibits ionising irradiation-induced inflammation in MSCs by activating SIRT1 and limiting NLRP-3 inflammasome activation[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(7): 14105-14118.
- [3] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(11): 2739-2749.
- [4] Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(5): 878-888.
- [5] Calabrese LH, Rose-John S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2014, 10(12): 720-727.
- [6] Taniguchi K, Karin M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer[J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(1): 54-74.
- [7] 王璐, 徐畅, 刘强. 沉默信息调节因子 2 相关酶 1 在炎症反应中的调节机制研究进展[J]. *国际免疫学杂志*, 2015, 38(3): 252-255.
- [8] Liu TF, Yoza BK, El Gazzar MA, et al. NAD(+)-dependent SIRT1 deacetylase participates in epigenetic reprogramming during endotoxin tolerance[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(11): 9856-9864.
- [9] Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, et al. Antagonistic crosstalk between NF- κ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(10): 1939-1948.
- [10] 韩响, 鲁建华, 张文芳, 等. 白藜芦醇对兔急性高血压视网膜节细胞 NF- κ B 表达和 IL-6 浓度的影响[J]. *国际眼科杂志*, 2011, 11(6): 958-960.

(收稿日期: 2015-08-10)