

# SIRT1/NF- $\kappa$ B 通路参与白藜芦醇改善大鼠脑缺血再灌注损伤炎症反应

李传文<sup>1,2</sup>, 张 嵘<sup>2</sup>, 侯 亮<sup>1,2</sup>, 管叶明<sup>1,2</sup>, 汪青松<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 研究大鼠脑缺血再灌注损伤后沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 对缺血脑组织周边炎症反应的影响及其与核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 通路的关系。方法 选择健康雄性 SD 大鼠 40 只, 随机均分为 4 组: 假手术组、模型组、白藜芦醇组、EX527 组。采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 法和 Western blot 法检测各组大鼠脑组织匀浆中白细胞介素 (IL) -1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子 (TNF) - $\alpha$ 、SIRT1 及 NF- $\kappa$ B mRNA 含量及蛋白表达变化。于 1、3、7、14 d 对大鼠进行神经功能缺损评分。结果 白藜芦醇组 3、7、14 d 神经功能缺损评分明显低于模型组和 EX527 组 ( $P < 0.01$ )。白藜芦醇组 NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 及蛋白表达量明显低于模型组和 EX527 组 ( $P < 0.01$ ); SIRT1 明显高于模型组和 EX527 组 ( $P < 0.01$ )。结论 SIRT1 的激活可促进脑缺血再灌注大鼠的神经功能缺损恢复, 减轻炎症反应, 其机制可能与 NF- $\kappa$ B 通路有关。

**关键词** 缺血再灌注; SIRT1; 白藜芦醇; NF- $\kappa$ B

**中图分类号** R 741

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0006-04  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.002

脑卒中具有高发病率、高死亡率、高致残率及高复发率等特点, 系威胁人类健康的重要疾病之一, 给家庭和社会带来严重的负担<sup>[1]</sup>。在我国, 脑卒中导致的死亡率已跃居死亡原因的首位, 其中缺血性脑卒中占整个卒中约 70%, 发病率呈逐年上升趋势, 并出现年轻化趋势。在缺血性卒中的治疗上, 目前主要是采用超早期溶栓和神经保护等措施, 但由于有效治疗时间窗短和易诱发脑内出血等特点使其临床应用受到限制<sup>[2]</sup>, 而神经保护药物虽然在临床前实验中效果显著, 但在临床试验中均以失败告终。因此, 深入研究缺血性脑卒中的发病机制, 寻找有效

的新药物和(或)新方法并能在临床推广应用是目前亟待解决的问题。

沉默信息调节蛋白 1 (silent information regulator protein 1, SIRT1) 是一种依赖 NAD<sup>+</sup> 的组蛋白去乙酰化酶。该物质主要作用依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸/NADH 的信号转导, 通过多种转录因子调节蛋白质表达, 起到神经保护的作用。SIRT1 因参与多种细胞功能的调节而成为研究的热点。既往研究<sup>[3]</sup>提示 SIRT1 的上调能够抑制炎症反应和细胞凋亡, 减轻缺血再灌注损伤, 促进神经功能恢复, 具有一定的脑保护作用。该实验通过建立大鼠大脑中动脉栓塞模型, 通过尾静脉注入 SIRT1 的激活剂白藜芦醇及抑制剂 EX527, 观察 SIRT1 表达变化对缺血再灌注大鼠脑组织中炎症因子白细胞介素 (interleukin, IL) -1 $\beta$ 、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-6 水平影响及其与核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 通路的关系。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物和分组** 选择普通级健康雄性 SD 大鼠 40 只, 7~8 周龄, 260~300 g, 购自安徽医科大学实验动物中心。采取自然光照, 自由进食喂养, 1 周后进行实验。所有大鼠随机分为 4 组: 假手术组、模型组、白藜芦醇组、EX527 组, 每组 10 只。

**1.2 试剂及来源** EX527、白藜芦醇、DMSO (美国 Sigma 公司); 兔抗 IL-1 $\beta$ 、兔抗 SIRT1 (北京 Bioss 公司); 兔抗 NF- $\kappa$ B p65、兔抗 IL-6 (英国 Abcam 公司); 兔抗 TNF- $\alpha$  (美国 Bioworld 公司);  $\beta$ -actin 和二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 的 TRIzol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒 (RevertAid<sup>TM</sup> first Strand cDNA Synthesis Kit) (美国 Thermo 公司)。

**1.3 大鼠大脑中动脉栓塞模型建立** 除假手术组外, 其余三组采用改良线栓法<sup>[4]</sup>构建大鼠右侧大脑中动脉栓塞模型, 假手术组大鼠仅单纯分离血管。在缺血期内死亡或出现昏迷及抽搐的大鼠均被弃

2017-10-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81171108); 全军医药卫生科研基金 (编号: 15MS172、14MS039)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学附属解放军临床学院, 合肥 230031

<sup>2</sup>解放军第 105 医院神经内科, 合肥 230031

作者简介: 李传文, 女, 硕士研究生;

汪青松, 男, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail:

wangqs65@yahoo.com

去。模型成功的标准: 提大鼠尾部, 使其悬空, 30 s 内出现转颈超过  $10^\circ$ , 左前肢(脑缺血对侧)屈曲内收, 肌张力下降, 爬行时呈典型追尾征, 若无此典型症状予以剔除。术后保持动物体温 ( $37 \pm 0.5$ )  $^\circ\text{C}$ 。白藜芦醇和 EX527 溶于 5% DMSO, 白藜芦醇组分别于缺血前 15 min 和再灌注前 1 min 按照 20 mg/kg 经尾静脉注入白藜芦醇; EX527 组给药时间同白藜芦醇组, 按照 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  经尾静脉注入 EX527。

**1.4 神经功能缺损评分** 除假手术组外, 采用改良的神经功能缺损评分 mNSS 量表<sup>[5]</sup>分别对其余三组于 1、3、7、14 d 时对其进行神经功能缺损评分, 共 18 分, 其中 13~18 分为重度神经功能缺损, 7~12 分为中度神经功能缺损, 1~6 分为轻度神经功能缺损。

**1.5 RT-PCR 法检测梗死脑组织周边 SIRT1、NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA 表达** 在脑梗死周边缺血半暗带区取标本, TRIzol 法提取目的细胞总 RNA。42  $^\circ\text{C}$  反转录 50 min, 95  $^\circ\text{C}$  5 min 灭活反转录酶。RT-PCR 检测。PCR 热循环参数: 96  $^\circ\text{C}$ 、4 min, 然后三步反应: 94  $^\circ\text{C}$ 、30 s, 58  $^\circ\text{C}$ 、30 s, 72  $^\circ\text{C}$ 、30 s, 40 个循环, 于每个循环的第三步即: 72  $^\circ\text{C}$  30 s 收集荧光信号。RT-PCR 结果分析得到目的基因表达的相对定量值(RQ 值), 以  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  计算所得结果, 见表 1。

**1.6 Western blot 法检测梗死周边脑组织 SIRT1、NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ 、IL-6 表达** 在脑梗死周边缺血半暗带区取标本, 加入 RIPA 细胞裂解液裂解, 12 000 r/min, 离心 10 min, 收集上清液, 即含有组织总蛋白, 取等量蛋白样品, 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳分离; 分离后湿法转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭过夜; 之后加入一抗 4  $^\circ\text{C}$  过夜; 加入 TBST 洗涤 3 次; 二抗室温封闭 2 h, TBST 洗涤 3 次, ECL 显色, 拍照进行灰度扫描, 以  $\beta$ -actin 为内参, 将目的基因与内参  $\beta$ -actin 条带的灰度值比值作为目的基因的相对表达量。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行

分析, 计量资料数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组比较采用两独立样本  $t$  检验, 多组比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组不同时间段神经功能缺损评分比较** 假手术组各时间点神经功能缺损评分均为 0 分。与模型组与 EX527 组比较, 白藜芦醇组在 3、7、14 d 神经功能缺损评分明显降低 ( $F = 1.533、9.112、8.820、13.793$ ,  $P < 0.01$ ), 见表 2。

**2.2 缺血区周边脑组织 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、SIRT1、NF- $\kappa$ B mRNA 水平** 白藜芦醇组 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、NF- $\kappa$ B mRNA 表达量均低于模型组和 EX527 组 ( $P < 0.01$ ), SIRT1 mRNA 表达高于模型组和 EX527 组 ( $F = 104.260、111.703、218.101、58.318、277.261$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 1。

**2.3 缺血区周边脑组织 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、SIRT1、NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平** 白藜芦醇组 NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 表达均低于模型组和 EX527 组 ( $P < 0.01$ ), SIRT1 表达高于模型组和 EX527 组 ( $F = 179.998、305.022、110.542、401.454、78.912$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 2。

表 1 RT-PCR 引物序列及产物片段

靶基因	引物序列(5'-3')	产物长度 (bp)
$\beta$ -actin	正义链: CCCATCTATGAGGGTTACGC 反义链: TTTAATGTCACGCACGATTTTC	150
IL-1 $\beta$	正义链: GCATCCAGCTTCAAATCTCA 反义链: ATCATCCCACGACTCACAGA	191
TNF- $\alpha$	正义链: AAACACACGAGACGCTGAAG 反义链: AAACACACGAGACGCTGAAG	132
IL-6	正义链: ACTGACAACACCGGAAGCCA 反义链: GGCCGGCACTGAGAACTTG	143
SIRT1	正义链: TGTGTGTGGTCTATGCCTT 反义链: CCTGCAATCCCAGGTACTTT	99
NF- $\kappa$ B	正义链: CATCCACCATGGAAGACAAG 反义链: CCAGCAGCATCTTCACATCT	138

表 2 各组不同时间段神经功能缺损评分比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

组别	1 d	3 d	7 d	14 d
假手术	0	0	0	0
模型	10.90 $\pm$ 0.78	9.30 $\pm$ 0.82	8.50 $\pm$ 0.53	7.80 $\pm$ 0.79
白藜芦醇	10.20 $\pm$ 1.13	8.20 $\pm$ 0.63 <sup>***</sup>	7.50 $\pm$ 0.70 <sup>***</sup>	6.10 $\pm$ 0.74 <sup>***</sup>
EX527	10.40 $\pm$ 0.84	9.60 $\pm$ 0.84	8.70 $\pm$ 0.95	7.60 $\pm$ 0.84

与模型组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 EX527 组比较: <sup>##</sup>  $P < 0.01$

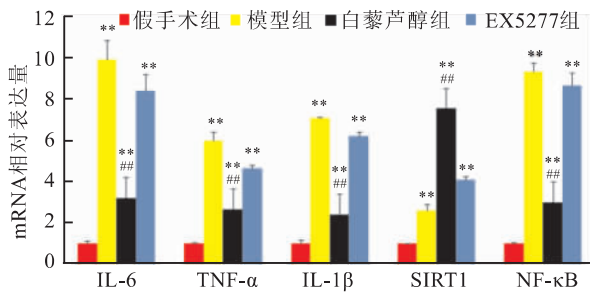


图1 各组缺血脑组织半暗带 IL-6、TNF-α、IL-1β、SIRT1、NF-κB mRNA 表达的变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

与假手术组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组和 EX527 组比较: ##  $P < 0.01$

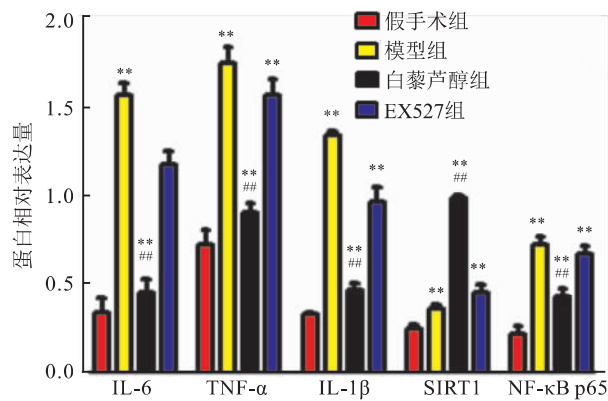
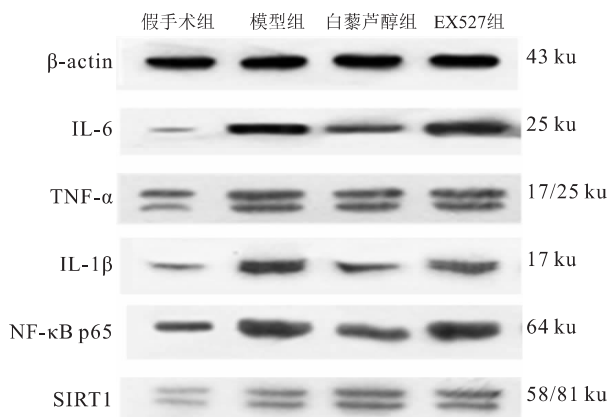


图2 各组缺血脑组织半暗带 IL-6、IL-1β、TNF-α、SIRT1、NF-κB 蛋白表达量的变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

与假手术组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组和 EX527 组比较: ##  $P < 0.01$

### 3 讨论

既往研究<sup>[6]</sup>显示 SIRT1 能够减轻氧化应激和炎症反应,还能够抑制缺血再灌注所致脑组织损伤凋亡,保护神经细胞<sup>[7]</sup>。近年研究<sup>[8]</sup>显示在小鼠的脂肪肝模型中,白藜芦醇可以通过激活 SIRT1 抑制

NF-κB 炎症反应通路,该研究提示白藜芦醇可减少炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 及 NF-κB p65 的表达。

白藜芦醇是一种多酚化合物,广泛存在于植物如花生、中药的虎杖、葡萄以及红葡萄酒中等。随着老龄化上升和细胞的衰老,SIRT1 的水平和活性在缓慢下降<sup>[9]</sup>。在大鼠脑缺血模型治疗前,尾静脉注射白藜芦醇,可以增加 SIRT1 的活性,改善炎症反应,减少大鼠神经元的死亡<sup>[10]</sup>。白藜芦醇能穿过血脑屏障到脑组织,对中枢神经病变起保护作用。本实验中,课题组发现与模型组和抑制剂组比较,白藜芦醇明显提高了 SIRT1 的蛋白表达,下调 TNF-α、IL-1β、IL-6 及 NF-κB p65 炎症因子的表达。提示白藜芦醇抑制大鼠脑缺血再灌注损伤的炎症反应,对抗大鼠脑损伤的保护作用可能与其激活 SIRT1/NF-κB 信号通路有关。而 EX527 组与模型组比较差异无统计学意义,理论上两组应该有意义,本实验未作出相应的结果,可能主要是由于当大鼠脑缺血损伤时,本身的 SIRT1 消耗过多,导致体内含量较少,使得抑制剂未发挥作用,其次是注射药物浓度低及样本量少的原因。本研究表明 SIRT1 的激活能够有效改善大鼠缺血再灌注损伤的炎症反应。

脑缺血再灌注损伤后激活白细胞、小胶质细胞和星形胶质细胞等炎症细胞产生大量炎症因子,如细胞因子、趋化因子和黏附分子等。NF-κB 是一种介导细胞内信号转导的核转录因子,在炎症反应中发挥重要作用,通过增强 TNF-α、IL-1β 及 IL-6 等促炎症因子基因的表达进一步促进炎症反应<sup>[11]</sup>。越来越多的证据显示,SIRT1 激活能使 NF-κB 的 RelA/p65 亚单位去乙酰化,抑制 NF-κB 的转录活性,在炎症损伤中起保护作用。既往研究<sup>[12]</sup>表明,SIRT1 具有抗炎并抑制细胞间黏附分子表达的作用,当炎症反应途径激活转录因子 NF-κB,刺激线粒体产生大量氧自由基,而 SIRT1 则通过使 Rel A/p65 去乙酰化,抑制其与 NF-κB 启动子的结合,从而干扰 NF-κB 信号转导来减少氧自由基的产生,最终起到抗炎作用<sup>[13]</sup>。

综上所述,本研究结果表明在白藜芦醇激活 SIRT1 的条件下,能够减轻大鼠缺血再灌注损伤后的炎症反应,改善大鼠神经功能缺损的恢复,其机制可能是通过抑制 NF-κB 通路实现的。

### 参考文献

[1] Go A S, Mozaffarian D, Roger V L, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics—2014 update: a report from the

- American Heart Association [J]. *Circulation*, 2014, 129(3): 399.
- [2] Gumbinger C, Reuter B, Stock C, et al. Time to treatment with recombinant tissue plasminogen activator and outcome of stroke in clinical practice: retrospective analysis of hospital quality assurance data with comparison with results from randomised clinical trials [J]. *BMJ*, 2014, 348: g3429.
- [3] Meng X, Jin T, Li M, et al. Sirt1: Role under the condition of ischemia/hypoxia [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2016, 37(1): 17–28.
- [4] 帕尔哈提·热西提, 更·党木仁加甫, 汪永新, 等. 改良线栓法制作大鼠局灶性脑缺血模型 [J]. *新疆医科大学学报*, 2006, 29(2): 145–7.
- [5] Chen J, Sanberg P Y, Wang L, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32(11): 2682–8.
- [6] Pantazi E, Zaouali M A, Bejaoui M, et al. Role of sirtuins in ischemia-reperfusion injury [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(43): 7594–602.
- [7] Wan D, Zhou Y, Wang K, et al. Resveratrol provides neuroprotection by inhibiting phosphodiesterases and regulating the cAMP/AMPK/SIRT1 pathway after stroke in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2016, 121: 255–62.
- [8] Tian Y, Ma J, Wang W, et al. Resveratrol supplement inhibited the NF- $\kappa$ B inflammation pathway through activating AMPK $\alpha$ -SIRT1 pathway in mice with fatty liver [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 422(1–2): 75–84.
- [9] Petegnief V, Planas A M. SIRT1 regulation modulates stroke outcome [J]. *Transl Stroke Res*, 2013, 4(6): 663.
- [10] Simão F, Matté A, Matté C, et al. Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na(+)K(+)ATPase activity induced by transient global cerebral ischemia in rats [J]. *J Nutr Biochem*, 2011, 22(10): 921–8.
- [11] Harari O A, Liao J K. NF- $\kappa$ B and innate immunity in ischemic stroke [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1207(1): 32–40.
- [12] Hernández-Jiménez M, Hurtado O, Cuartero M I, et al. Silent information regulator 1 protects the brain against cerebral ischemic damage [J]. *Stroke*, 2013, 44(8): 2333–7.
- [13] Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, et al. SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(48): 40364.

## SIRT1/NF- $\kappa$ B pathway participates in resveratrol improve inflammatory response of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

Li Chuanwen<sup>1,2</sup>, Zhang Rong<sup>2</sup>, Hou Liang<sup>1,2</sup>, et al

(<sup>1</sup>The Clinical College of PLA Affiliated Anhui Medical University, Hefei 230031;

<sup>2</sup>Dept of Neurology, The 105th Hospital of PLA, Hefei 230031)

**Abstract Objective** To investigate the role of silent information regulator protein 1 (SIRT1) in inflammatory reaction in peri-ischemic brain tissue after ischemia reperfusion injury in rats and its relationship with nuclear factor- $\kappa$ -gene binding (NF- $\kappa$ B) pathway. **Methods** Forty healthy male SD rats were randomly divided into sham group, I/R group, Res + I/R group and EX527 + I/R group (10 in each group). The expression levels of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), SIRT1 and NF- $\kappa$ B in peri-ischemic brain tissues were detected using Western blot and RT-PCR respectively. Neurological severity score (NSS) were measured 1 d, 3 d, 7 d and 14 d after reperfusion. **Results** NSS in Res + I/R group in 3, 7, 14 day after reperfusion was significantly lower than those of I/R group and EX527 + I/R group ( $P < 0.01$ ); Compared with I/R and EX527 + I/R group, the peri-ischemic brain tissue mRNA expression and the protein expression of NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were significantly decreased in Res + I/R group. SIRT1 was significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The activation of SIRT1 can improve cerebral ischemic damage and reduce inflammatory reaction in rats. Its mechanism may be related to the NF- $\kappa$ B pathways.

**Key words** ischemia/reperfusion; SIRT1; resveratrol; NF- $\kappa$ B