

论著·基础研究

SIRT7 通过抑制内质网应激蛋白 GRP78 减轻脂多糖或 D-氨基半乳糖 / 脂多糖诱导的肝细胞凋亡

阮 昕¹, 张颖婷¹, 韩可琪¹, 林龙帅², 陈 晨¹, 岳 铭¹, 王楚翘¹, 孙英刚³, 赵庆华², 贺 明¹

1. 上海交通大学基础医学院病理生理学系, 细胞分化与凋亡教育部重点实验室, 上海 200025; 2. 上海交通大学附属第一人民医院骨科, 上海 201620; 3. 上海交通大学医学院附属新华医院心血管内科, 上海 200092

[摘要] **目的**·探究 SIRT7 (sirtuin 7) 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 或 D-氨基半乳糖 (D-galactosamine, D-GalN)/LPS 诱导的急性肝损伤的作用及机制。**方法**·将 13 周龄的 C57BL/6J 小鼠随机分为生理盐水组 ($n=5$)、LPS 组 ($n=7$) 和 D-GalN/LPS 组 ($n=8$), 分别腹腔注射生理盐水、LPS 和 D-GalN/LPS。24 h 后收集生理盐水组和 LPS 组的小鼠血清和肝脏, D-GalN/LPS 组于注射后 8 h 收集血清和肝脏。利用苏木精-伊红 (H-E) 染色比较 3 组小鼠肝脏病理学改变, 同时观察血清学生化指标的变化; 利用 TUNEL 染色和 F4/80 染色明确小鼠肝脏内细胞凋亡和炎症细胞浸润程度; 利用 realtime-PCR 检测各组小鼠肝组织中 *SIRT7*、白介素-1 β (interleukin 1 β , *IL-1 β*)、*IL-6*、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , *TNF- α*) 等的 mRNA 水平; 利用 Western blotting 检测各组小鼠肝组织中 SIRT7、激活型胱天蛋白酶 3 (cleaved-caspase3) 和伴侣葡萄糖调节蛋白 (the 78 kDa glucose regulated protein, GRP78) 等的蛋白水平。体外实验中, 在正常小鼠肝细胞 AML-12 细胞中过表达 SIRT7, 并给予 LPS 刺激, 利用 Western blotting 明确 SIRT7 对 LPS 引起的内质网应激信号通路分子的调控。**结果**·注射 LPS 或 D-GalN/LPS 后, 小鼠肝脏出现明显的炎症细胞浸润、充血及肝细胞凋亡, 血清中谷丙转氨酶 (glutamic-pyruvic transaminase, GPT) 和谷草转氨酶 (glutamic-oxalacetic transaminase, GOT) 水平明显升高, 肝组织中 *SIRT7* 的 mRNA 和蛋白水平均明显降低, 内质网应激蛋白 GRP78 表达明显上调。在 AML-12 细胞系中, SIRT7 过表达可明显抑制 LPS 引起的 GRP78 蛋白上调。**结论**·SIRT7 通过抑制内质网应激中的 GRP78 减轻 LPS 或 D-GalN/LPS 诱导的肝细胞凋亡。

[关键词] 去乙酰化酶 (sirtuin); 脓毒症; SIRT7; 急性肝损伤; 内质网应激; 细胞凋亡

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.08.002 **[中图分类号]** R575.1 **[文献标志码]** A

SIRT7 protecting hepatocytes from LPS or D-GalN/LPS-induced apoptosis by attenuating endoplasmic reticulum stress via inactivation of GRP78

RUAN Xin¹, ZHANG Ying-ting¹, HAN Ke-qi¹, LIN Long-shuai², CHEN Chen¹, YUE Ming¹, WANG Chu-qiao¹, SUN Ying-gang³, ZHAO Qing-hua², HE Ming¹

1. Department of Pathophysiology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences; Key Laboratory of Cell Differentiation and Apoptosis of Chinese Ministry of Education, Shanghai 200025, China; 2. Department of Orthopedics, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201620, China; 3. Department of Cardiology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the effects of SIRT7 on acute liver injury induced by lipopolysaccharide (LPS) or D-galactosamine (D-GalN)/LPS and its mechanisms. **Methods**·Thirteen-week-old C57BL/6J mice were randomly divided into normal saline group ($n=5$), LPS group ($n=7$), and D-GalN/LPS group ($n=8$), which were respectively intraperitoneally injected with normal saline, LPS or D-GalN/LPS. The serum and livers of normal saline group and LPS group mice were collected 24 hours after the injection, and the samples of D-GalN/LPS group were collected 8 hours after the injection. Liver pathological changes were compared by using H-E staining, and serological indicators of the mice from three groups were also compared. Liver apoptosis and inflammatory cells infiltration were determined by TUNEL staining and F4/80 staining. Meanwhile, the mRNA levels of *SIRT7* and inflammatory factors, including interleukin-1 β (*IL-1 β*), *IL-6*, and tumor necrosis factor α (*TNF- α*) in livers were detected by realtime-PCR. Western blotting was used to detect the protein levels of SIRT7, cleaved-caspase3 and the 78 kDa glucose regulated protein (GRP78) in mouse liver tissues. AML-12 cell line overexpressing SIRT7 was stimulated with LPS, and Western blotting was used to study the roles of SIRT7 in the endoplasmic reticulum (ER) stress induced by LPS *in vitro*. **Results**·LPS or D-GalN/LPS induced inflammatory cells infiltration, hyperemia and hepatocytes apoptosis in livers. Meanwhile, serum glutamic-pyruvic transaminase (GPT) and glutamic-oxalacetic transaminase (GOT) in the mice treated by LPS or D-GalN/LPS were significantly increased. Moreover, both liver *SIRT7* mRNA and protein levels were down-regulated, while GRP78 protein in ER stress pathway was up-regulated. In AML-12 cells, SIRT7 overexpression inhibited LPS-induced up-regulation of GRP78. **Conclusion**·SIRT7 protects against LPS or D-GalN/LPS-induced hepatocytes apoptosis by attenuating ER stress via inactivating GRP78.

[Key words] sirtuin; sepsis; SIRT7; acute liver injury; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

[基金项目] 国家自然科学基金 (81470841); 上海市浦江人才计划 (16PJ1405400, 16PJ0004679); 上海市自然科学基金 (19ZR1428400); 上海交通大学医工 (理) 交叉研究基金 (YG2017MS02) (National Natural Science Foundation of China, 81470841; Shanghai Pujiang Program, 16PJ1405400, 16PJ0004679; Natural Science Foundation of Shanghai, 19ZR1428400; Medicine and Industry Crossing Project from Shanghai Jiao Tong University, YG2017MS02)。

[作者简介] 阮 昕 (1993—), 女, 硕士生; 电子信箱: kunxinhua123@sjtu.edu.cn。

[通信作者] 贺 明, 电子信箱: heming@shsmu.edu.cn。

脓毒症是由于宿主对感染反应的失调所引起的一种非常复杂的疾病, 可导致多种器官功能紊乱^[1]。脓毒症在全世界范围内发病率和死亡率均很高, 是全球人类死亡的主要因素之一^[2]。肝脏在脓毒症中发挥着十分重要的作用: 肝脏既是抵抗微生物攻击的重要防线, 也是炎症失调引起损伤的重要靶器官^[3-4]。脓毒症可导致缺血性肝炎、胆汁淤积的发生, 随后可引起继发性硬化性胆管炎。脓毒症患者入院 48 h 内, 主要发生的是缺氧性肝炎, 其临床特征是血清中谷丙转氨酶 (glutamic-pyruvic transaminase, GPT) 和谷草转氨酶 (glutamic-oxalacetic transaminase, GOT) 的活性急剧上升^[5], 提示肝细胞大量凋亡或坏死。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰阴性菌内毒素的主要成分, 在细菌感染性疾病以及消化道疾病中起到非常重要的作用。而且, 在革兰阴性菌感染患者中, LPS 可引起各个系统的炎症, 严重时可导致脓毒症^[6]。因此, LPS 是导致脓毒症的主要因素之一。利用 LPS 或 D-氨基半乳糖 (D-galactosamine, D-GalN) /LPS 诱导肝损伤的小鼠模型是研究脓毒症肝损伤机制的常用模型^[7-9]。

而最近的研究表明内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 可能参与脓毒症导致的肝细胞凋亡^[10-11]。内质网是分泌途径中重要的细胞内细胞器, 通常被称为蛋白质折叠工厂。它负责蛋白质易位、蛋白质折叠和蛋白质翻译后修饰^[12-13]。某些病理状况, 如脓毒症、创伤、局部缺血和病毒感染以及少量药物 (包括衣霉素、毒胡萝卜素、布雷菲德菌素 A) 会导致未折叠或错误折叠的蛋白质积聚, 从而改变内质网内的平衡并引起 ER stress^[14-17]。发生 ERS 时, 未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 被激活以使内质网功能恢复到其正常平衡。然而, 如果应激超出 UPR 的补偿能力上限, 细胞就会发生凋亡。UPR 信号通路中有 3 个典型分支, 分别由 3 个 ERS 感受器介导: 蛋白激酶 RNA (protein kinase RNA, PKR) 样 ER 激酶 (PKR-like ER kinase, PERK)、肌醇需要激酶 1 α (inositol-requiring kinase 1 α , IRE1 α) 和激活转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6)。其中, 78 kDa 葡萄糖调节蛋白 (the 78 kDa glucose regulated protein, GRP78) 作为 UPR 的主调节器是 ERS 的主要效应分子, GRP78 直接与 3 种感受器相互作用, 在非应激情况下将它们维持在非活性形式; 应激时, GRP78 和错误折叠的蛋白结合, 释放激活 UPR 感受器^[18]。GRP78 在脂肪肝 ERS 中发挥着重要的作用^[19]。但 ERS 或 GRP78 参与脓毒症引起的肝损伤的机制尚不清楚。

Sirtuin 蛋白家族是一类烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 依赖的组蛋

白去乙酰化酶或二磷酸腺苷 (the adenosine diphosphate, ADP) 核糖基转移酶, 它们具有高度保守的 NAD⁺ 结合域和催化功能域。Sirtuins 可以通过对多种底物进行去乙酰化作用, 从而参与机体内一系列生物过程的调节, 包括 DNA 损伤和修复、基因转录调控、细胞代谢、衰老和凋亡等^[20-21]。在哺乳动物中, 7 种已知的 sirtuin (SIRT1 ~ 7) 具有不同的亚细胞定位和各自的特异性底物^[22]。其中 SIRT7 主要定位于核仁中^[23], 是调节细胞稳态的关键因子, 在转录、核糖体生物发生、染色质结构和细胞增殖等方面发挥重要作用^[23-26]。同时, SIRT7 可以减轻细胞应激。低氧状态下, 敲低 SIRT7 能够促进低氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) 蛋白的表达, 且不依赖于 SIRT7 的酶活性^[27]。SIRT7 可以通过与癌基因 c-Myc 相互作用, 抑制核糖体蛋白的生成, 进而减轻 ERS 和非酒精性脂肪肝的发生^[19, 28]。而 SIRT7 在急性肝损伤中是否有保护作用尚不清楚。

本研究利用小鼠模型和细胞实验, 检测 SIRT7 在急性肝损伤中的表达变化, 同时研究 SIRT7 是否可以通过抑制 ERS 减轻脓毒症导致的肝细胞凋亡。

1 材料与方法

1.1 脓毒症急性肝损伤小鼠模型构建

SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 雌性, 13 周龄, 20 只, 体重 20 ~ 25g。随机分为 3 组, 生理盐水组 ($n=5$), LPS 组 ($n=7$) 和 D-GalN/LPS 组 ($n=8$)。LPS 组腹腔注射 LPS, 剂量为 20 mg/kg; D-GalN/LPS 组腹腔注射 D-GalN/LPS, 剂量为 D-GalN 300 mg/kg 和 LPS 40 μ g/kg; 生理盐水组注射等量生理盐水。注射后观察并记录各组小鼠死亡情况, 计算死亡率。生理盐水组和 LPS 组给药后 24 h, 处死小鼠取全血和肝脏; D-GalN/LPS 组给药后 8 h 取全血和肝脏。

1.2 肝损伤血清学指标检测

利用 GPT 试剂盒 (96T) (南京建成生物研究所) 和 LX-20 全自动生化分析仪 (Bio-Tek, 美国) 检测小鼠血清中 GPT 和 GOT 水平。

1.3 肝脏组织病理学观察

利用 4% 多聚甲醛固定肝组织, 然后包埋于石蜡中。组织石蜡切片后进行苏木精-伊红 (H-E) 染色。利用试剂盒进行末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸缺口末端标记 (TUNEL) (罗氏, 瑞士) 染色。用针对

F4/80 (CST, 美国) 的抗体 (1:125) 对切片进行免疫染色, 用显微镜 Nano Zoomer (滨松, 日本) 观察 TUNEL 和 F4/80 染色, 每张切片随机选取 20 个视野, 并记录 TUNEL 或 F4/80 阳性的细胞数目。

1.4 SIRT7 质粒转染

小鼠肝脏细胞株 AML-12 购自美国模式菌种保藏中心 (ATCC)。细胞用含有 10% 胎牛血清、细胞培养添加物 ITS (100×) (Sigma, 美国)、40 ng/mL 地塞米松 (Sigma, 美国) 的 DMEM/F12 培养基, 于 37℃、5% CO₂ 恒温箱中培养。待细胞密度至 70% ~ 90% 时用 Lipofectamine2000 转染试剂 (Thermo, 美国) 进行 pfugw 空载质粒和 pfugw-SIRT7 质粒 (University of California, Berkeley 惠赠) 转染。10 cm 培养皿的 AML-12 细胞转染 12 μg, 质粒溶于无血清 L15 培养基中, 6 h 后换成完全培养基。24 h 后将上述细胞接种至 6 孔板和 12 孔板, 给予 0 或 1 μg/mL 的 LPS 处理, 刺激 24 h 后收获细胞, 用于 Western blotting 分析。

1.5 Western blotting 分析

将小鼠肝组织置于液氮中快速冷冻后, 充分研磨成组织匀浆。AML-12 细胞用 LPS 处理后, 收集细胞悬液。均加入 RIPA 缓冲液。然后用 10%SDS-PAGE 电泳, 并转移至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂牛奶封闭后, 用 SIRT7 (1:1 000)、GRP78 (1:1 000)、激活型胱天蛋白酶 3 (cleaved-caspase3) (1:500)、磷酸化信号转导及转录激活因子 3 (p-STAT3) (1:1 000)、总 STAT3 (t-STAT3) (1:500)、β 微管蛋白 (β-tublin) (1:1 000) 一抗 (CST, 美国) 探测印迹。4℃ 孵育过夜。TBST 摇动洗涤 3 次, 每次 5 min。滴加稀释后的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗, 室温孵育 1 h。TBST 摇动洗涤 3 次, 每次 5 min。利用增强化学发光法, 于 LAS4000 Mini 化学发光仪 (富士, 日本) 中显影。

1.6 RNA 抽提和 realtime-PCR

取 20 ~ 30 mg 肝组织, 加入 500 μL TRIzol (Invitrogen, 美国) 进行匀浆。匀浆后按照标准操作办法抽提组织 RNA。利用 AMV 反转录酶 (TaKaRa, 日本) 将 mRNA 反转录成 cDNA。采用 Power SYBR green PCR Master Mix 荧光实时定量试剂盒 (Applied Biosystems, 美国) 进行实验, 设计针对目的基因扩增的荧光定量 PCR 引物 (表 1)。

表 1 Realtime-PCR 引物列表
Tab 1 Primer sequences for realtime-PCR

基因名称	上游引物 5' → 3'	下游引物 5' → 3'
SIRT7	AGCATCACCCGTTTGCATGA	GGCAGTACGCTCAGTCACAT
RPL13a ^①	GAGGTCGGGTGGAAGTACCA	TGCATCTTGGCCTTTTCCTT
IL-6 ^②	GTTGTGCAATGGCAATTCTG	CTGGCTTTGTCTTCTTCTGTTATCT
TNF-α ^③	CCCAGGTATATGGGCTCATACC	GCCGATTGCTATCTCATACCAGG
IL-1β	TCAGGCAGGCAGTATCACTCA	TGCAGTTGTCTAATGGGAACGT

注: ①核糖体蛋白 L13a (ribosomal protein L13a), 内参基因; ②白介素 6 (interleukin 6); ③肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α)

1.7 统计学方法

所有数据统计分析应用软件 GraphPad PRISM 6.0, 用 $\bar{x} \pm s_x$ 表示连续型定量数据, 采用非配对 student-*t* 检验进行 2 组间比较, 以 *P* < 0.05 判定为差异具有统计学意义。

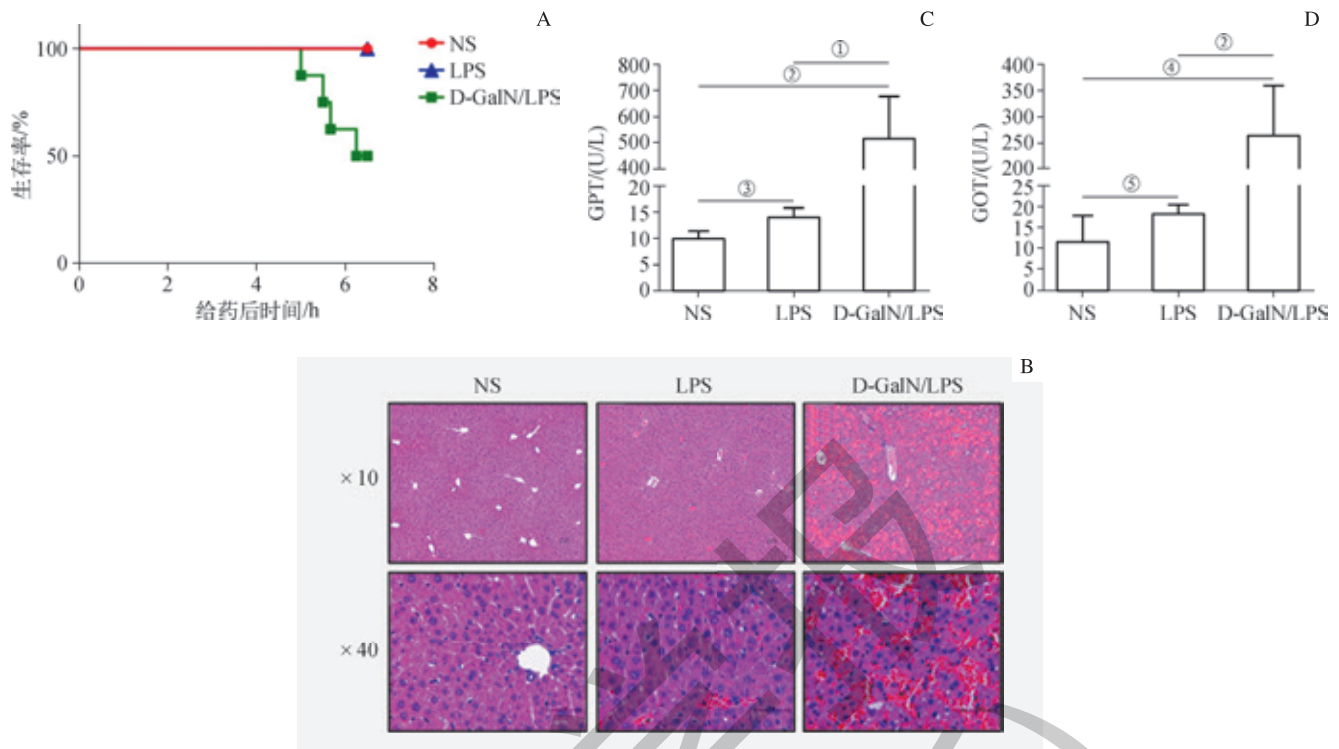
2 结果

2.1 脓毒症急性肝损伤小鼠模型的构建及死亡率

首先分别利用 LPS 和 D-GalN/LPS 诱发小鼠急性普通型肝炎和急性肝衰竭。3 组 C57BL/6J 小鼠分别腹腔注射生理盐水 (*n*=5)、LPS (*n*=7) 和 D-GalN/LPS (*n*=8), 于 24 h 内观察小鼠死亡情况。结果显示, 生理盐水组和 LPS 组 24 h 内未见小鼠死亡, D-GalN/LPS 组小鼠于注射后 5 h 开始陆续出现死亡, 至注射后 8 h 共死亡 5 只小鼠, 死亡率为 62.5% (图 1A)。肝脏 H-E 染色显示: 相比生理盐水组, LPS 组和 D-GalN/LPS 组小鼠的肝脏有明显的炎症细胞浸润和充血, D-GalN/LPS 组更加严重 (图 1B)。血清学肝损伤指标检测结果显示, LPS 组和 D-GalN/LPS 组小鼠血清 GPT 和 GOT 水平明显升高, D-GalN/LPS 组上升幅度更大 (图 1C、D), 提示 LPS 和 D-GalN/LPS 诱发的急性普通型肝炎和急性肝衰竭小鼠模型发生了明显的肝损伤。

2.2 LPS 和 D-GalN/LPS 诱导小鼠肝脏发生肝细胞凋亡

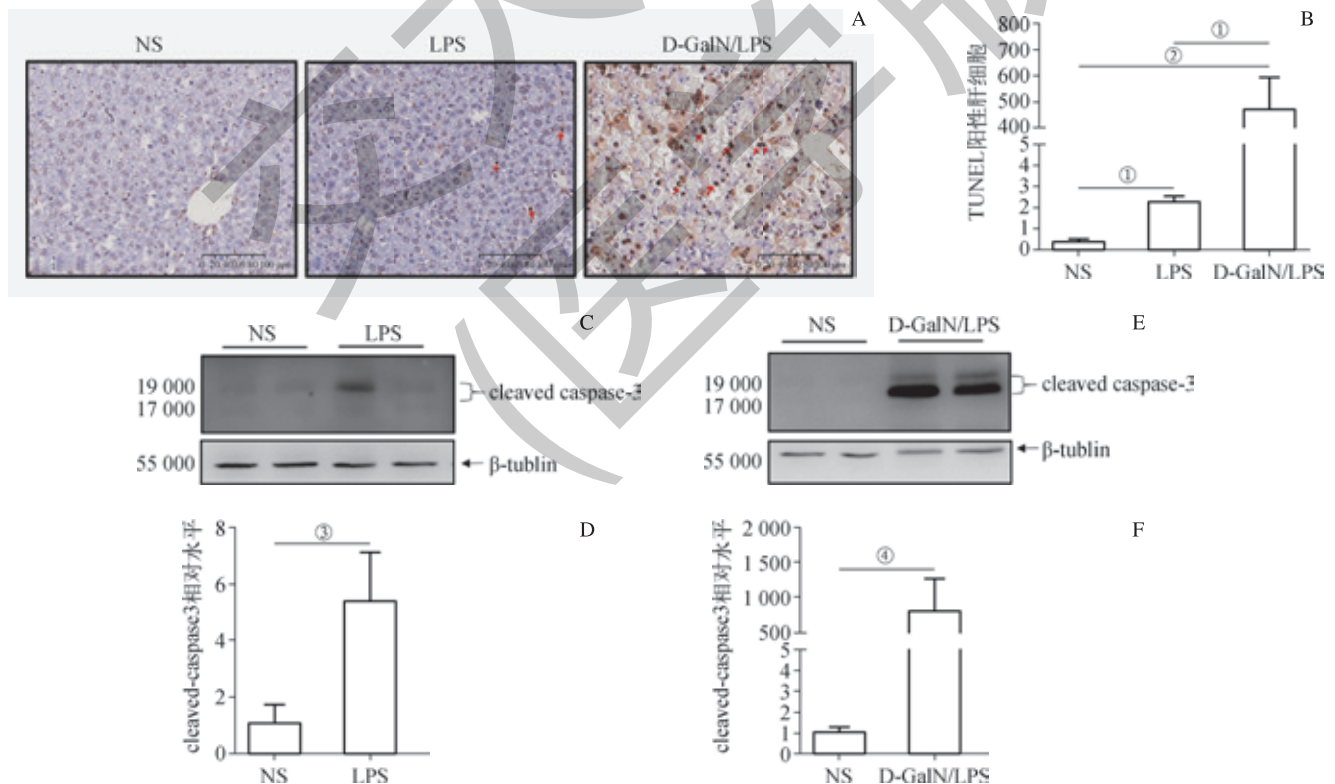
TUNEL 染色显示: LPS 组和 D-GalN/LPS 组小鼠均出现大量肝细胞凋亡。但相比 LPS 组, D-GalN/LPS 组的肝细胞凋亡数目显著增多 (图 2A、B)。同时, 较生理盐水组, LPS 组和 D-GalN/LPS 组的凋亡相关通路中的 cleaved-caspase3 蛋白水平均明显升高, D-GalN/LPS 组升高幅度更大 (图 2C ~ F)。以上结果提示, LPS 和 D-GalN/LPS 可导致小鼠肝脏发生肝细胞凋亡。



注: A. 小鼠注射药物后 8 h 生存曲线; B. 脓毒症急性肝损伤模型小鼠肝组织 H-E 染色 (标尺为 50 μ m); C. 小鼠血清 GPT 水平; D. 小鼠血清 GOT 水平。
^a $P=0.000$, ^b $P=0.006$, ^c $P=0.039$, ^d $P=0.049$, NS 指生理盐水

图 1 不同的脓毒症急性肝损伤小鼠模型的构建及死亡率

Fig 1 Construction and mortality of different mouse models of acute liver injury induced by sepsis



注: A. 小鼠肝组织 TUNEL 免疫组化染色结果 (标尺为 100 μ m, 箭头表示 TUNEL 阳性细胞); B. 小鼠 TUNEL 免疫组化染色半定量结果; C、E. Western blotting 分析急性肝损伤小鼠模型中 cleaved-caspase3 蛋白水平; D、F. 分别为 LPS 组、D-GalN/LPS 组相比于 NS 组, cleaved-caspase3 条带灰度扫描和 β -tubulin 比值的数据分析统计结果。^a $P=0.000$, ^b $P=0.002$, ^c $P=0.015$, ^d $P=0.046$

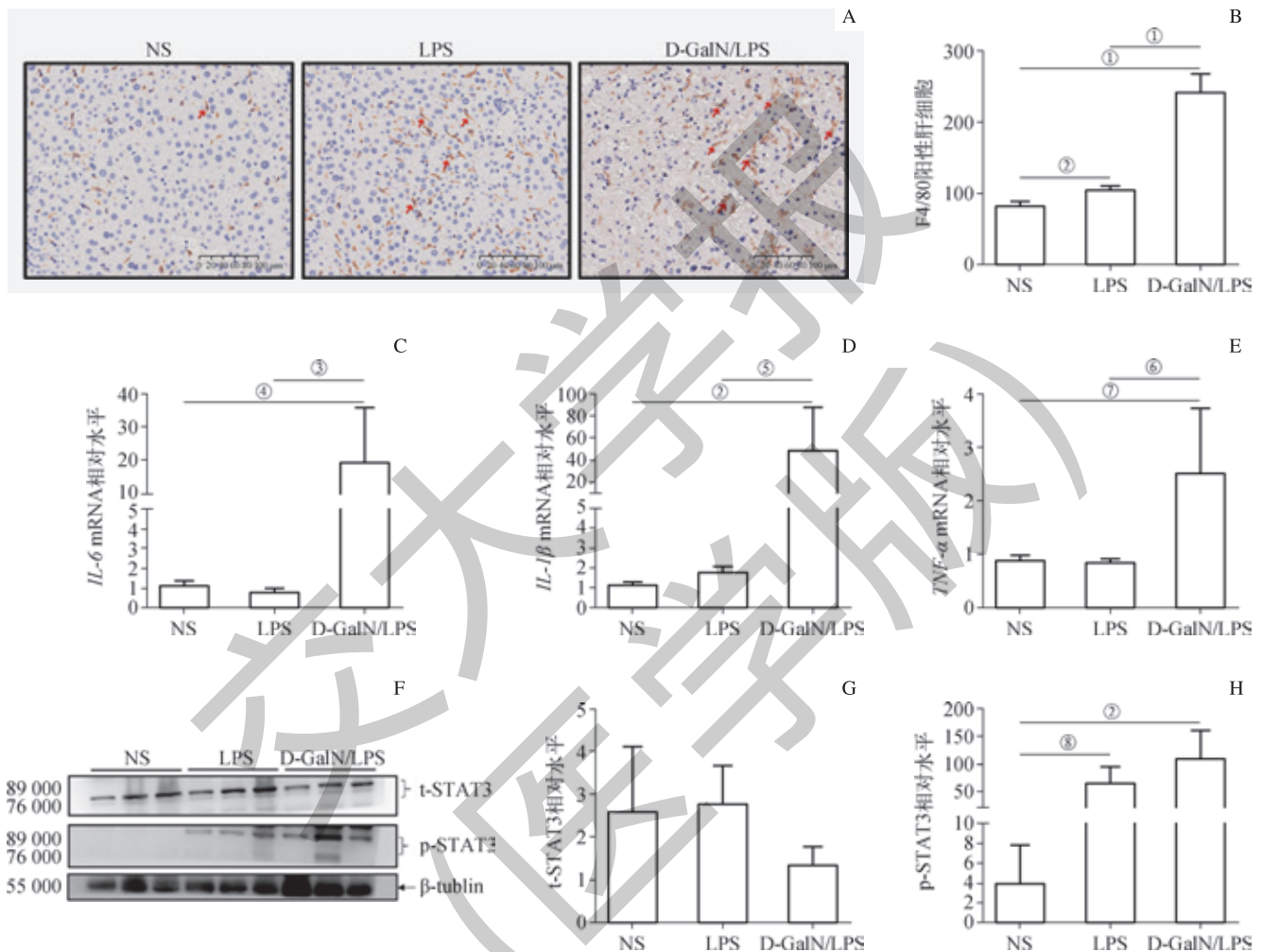
图 2 LPS 和 D-GalN/LPS 诱导小鼠肝脏发生肝细胞凋亡

Fig 2 Hepatocyte apoptosis in the livers of mice induced by LPS and D-GalN/LPS

2.3 LPS 和 D-GalN/LPS 诱导小鼠肝脏发生炎症

通过 F4/80 免疫组化染色检测小鼠肝脏中巨噬细胞浸润程度。结果显示: 较生理盐水组, LPS 组和 D-GalN/LPS 组小鼠肝内巨噬细胞数目均明显增加, 但 D-GalN/LPS 组巨噬细胞浸润更显著 (图 3A、B)。然后利用 realtime-PCR 检测 3 组小鼠肝组织中的炎症通路相关基因的表达。结果显示: 较生理盐水组, LPS 组小鼠肝脏中炎

症因子 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 的 mRNA 水平未见明显升高, 但 D-GalN/LPS 组炎症因子明显上调 (图 3C ~ E)。此外, 相比生理盐水组, JAK/STAT3 信号通路中的 p-STAT3 蛋白在小鼠急性肝损伤时明显上调, 而各组间的 t-STAT3 蛋白无明显差异 (图 3F ~ H), 说明 LPS 和 D-GalN/LPS 诱导的小鼠急性肝损伤发生时, 肝脏内发生炎症反应, 炎症信号通路被激活。



注: A. 小鼠肝组织 F4/80 免疫组化染色结果 (标尺为 100 μ m, 箭头表示 F4/80 阳性细胞); B. 小鼠 F4/80 免疫组化染色半定量结果; C ~ E. 分别为脓毒症急性肝损伤模型小鼠肝组织内 $IL-1\beta$ (C)、 $IL-6$ (D)、 $TNF-\alpha$ (E) 的 mRNA 水平; F. Western blotting 分析脓毒症急性肝损伤模型小鼠肝组织内 p-STAT3 和 t-STAT3 的蛋白水平; G、H. 分别为 t-STAT3 (G) 和 p-STAT3 (H) 条带灰度扫描和 β -tubulin 比值的数据分析统计结果。① $P=0.000$, ② $P=0.029$, ③ $P=0.044$, ④ $P=0.047$, ⑤ $P=0.031$, ⑥ $P=0.018$, ⑦ $P=0.043$, ⑧ $P=0.039$

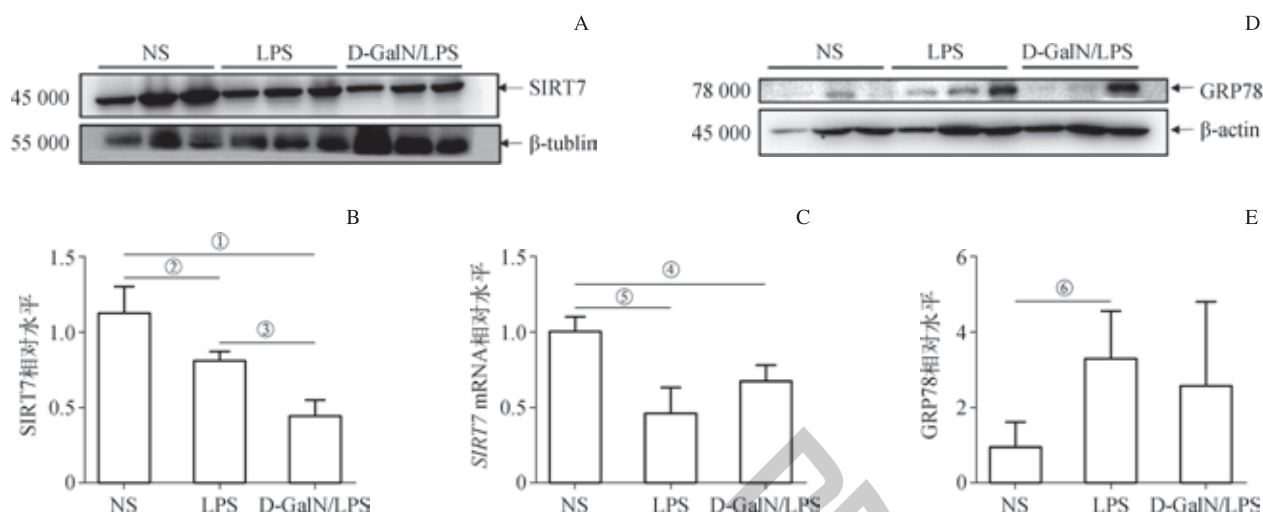
图 3 LPS 和 D-GalN/LPS 诱导小鼠肝脏发生炎症

Fig 3 Inflammation in the livers of mice induced by LPS and D-GalN/LPS

2.4 脓毒症急性肝损伤小鼠肝脏中 SIRT7 表达下调而 ERS 蛋白 GRP78 表达上调

利用 realtime-PCR 和 Western blotting 分别检测了小鼠肝组织中 $SIRT7$ 的 mRNA 和蛋白水平, 发现相比生理盐水组, LPS 组和 D-GalN/LPS 组小鼠肝脏中 $SIRT7$ 的 mRNA 和蛋白水平均明显下调 (图 4A ~ C), 说明 LPS

和 D-GalN/LPS 可明显抑制小鼠肝脏 $SIRT7$ 的表达, 也提示 $SIRT7$ 可能在脓毒症导致的肝细胞凋亡中发挥一定的作用。此外, 我们检测小鼠肝组织 ERS 通路中 GRP78 蛋白水平, 发现 LPS 组、D-GalN/LPS 组的 GRP78 蛋白上调 (图 4D ~ E), 说明 LPS 和 D-GalN/LPS 能够激活小鼠肝组织中 ERS 信号通路。



注: A. Western blotting 分析脓毒症急性肝损伤模型小鼠肝组织内 SIRT7 蛋白水平; B. 采用 SIRT7 和 β -tubulin 灰度扫描后比值进行数据分析并作图; C. Realtime-PCR 分析脓毒症急性肝损伤模型小鼠肝组织内 *SIRT7* mRNA 水平; D. Western blotting 分析 NS 组、LPS 组和 D-GalN/LPS 组小鼠肝组织内 GRP78 蛋白水平; E. 采用 GRP78 和 β -actin 的灰度扫描后比值进行数据分析并作图。① $P=0.004$, ② $P=0.043$, ③ $P=0.006$, ④ $P=0.003$, ⑤ $P=0.002$, ⑥ $P=0.047$

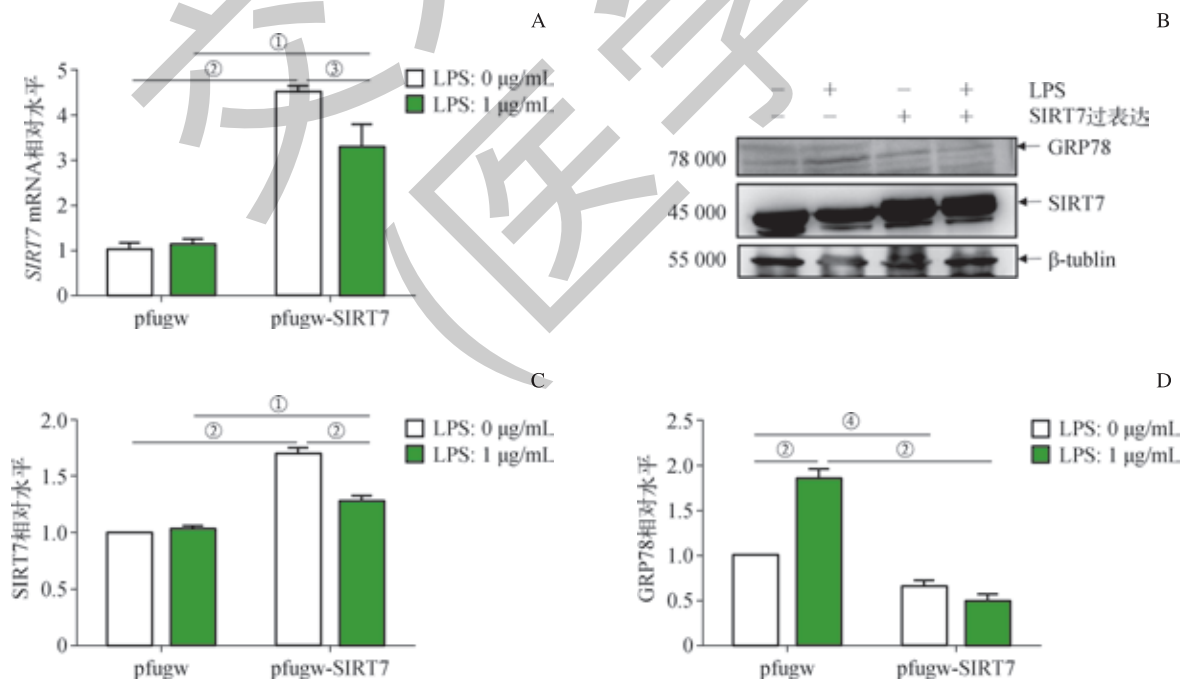
图 4 脓毒症急性肝损伤小鼠肝脏中 SIRT7 表达下调而 GRP78 表达上调

Fig 4 SIRT7 down-regulated but GRP78 up-regulated in the livers of mice under the condition of acute liver injury induced by sepsis

2.5 SIRT7 抑制 LPS 诱导的 ERS 蛋白 GRP78 的表达升高

为了验证 SIRT7 是否可以抑制 LPS 引起的 ERS, 我们在正常小鼠肝细胞 AML-12 细胞中过表达 SIRT7, 并给 LPS 刺激 (图 5A)。Western blotting 的结果显示: 与小鼠模型的结果一致, LPS 可显著上调 AML-12 细胞内

的 GRP78 蛋白水平, 而 SIRT7 可以明显抑制 LPS 诱导的 GRP78 蛋白水平的升高 (图 5B ~ D)。以上结果表明, LPS 可以激活 ERS 中的 GRP78 蛋白, 而 SIRT7 能够通过抑制 GRP78 蛋白减轻 LPS 引起的肝细胞 ERS。



注: A. AML-12 细胞过表达 pfugw 空载质粒和 pfugw-SIRT7 质粒后给予 LPS (1 μ g/mL) 对细胞内 *SIRT7* mRNA 水平的影响; B. AML-12 细胞过表达 pfugw 空载质粒和 pfugw-SIRT7 质粒后给予 LPS (1 μ g/mL) 对细胞内 GRP78 和 SIRT7 蛋白水平的影响; C、D. 分别为 SIRT7 (C)、GRP78 (D) 和 β -tubulin 灰度扫描比值的的数据分析及作图。① $P=0.002$, ② $P=0.000$, ③ $P=0.020$, ④ $P=0.010$

图 5 SIRT7 抑制 LPS 诱导的 ERs 蛋白 GRP78 的表达升高

Fig 5 Inhibition of LPS-induced upregulation of GRP78 by SIRT7

3 讨论

在我们的研究中,利用 LPS 和 D-GalN/LPS 构建了脓毒症急性肝损伤模型,发现不同模型小鼠肝脏均发生明显的炎症和细胞凋亡,并伴随肝内的 ERS 通路显著激活。同时, SIRT7 的表达水平明显下调。SIRT7 过表达后能够抑制 LPS 导致的 ERS 中 GRP78 蛋白的上调。这些发现提示 SIRT7 可以在 LPS 和 D-GalN/LPS 诱导的急性肝损伤中抑制 ERS 通路的激活,从而在脓毒症造成的肝损伤中发挥保护作用。

目前脓毒症小鼠模型主要分为三大类,包括外源性毒素的施用、活病原体的施用以及动物体内保护屏障的破坏^[29]。输注内毒素是研究脓毒症的常用模型^[9,30]。D-GalN/LPS 模型常被用来研究炎症诱导的肝损伤^[31]。我们利用 LPS 和 D-GalN/LPS 成功构建了脓毒症急性肝损伤模型,分别模拟急性普通型肝炎和急性肝衰竭。而通过 H-E 染色、TUNEL 染色、F4/80 染色、血清学生化指标 GPT 和 GOT 检测,发现肝脏炎症和肝细胞凋亡程度在 D-GalN/LPS 诱导的脓毒症急性肝损伤模型中更加严重, JAK/STAT3 和凋亡通路激活也更加明显,这与其他研究^[32-33]结果一致。同时我们发现相比于 LPS 组, D-GalN/LPS 组肝脏中的 SIRT7 蛋白表达更低,提示 SIRT7 可能与肝损伤的程度呈负相关。

目前关于脓毒症的治疗主要是针对包括感染本身的治疗,包括针对病原、抗生素和器官功能保护等治疗。除了这些治疗,近些年来还有利用生物学标记治疗脓毒症的方法,这些生物学标记包括 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、降钙素原(procalcitonin, PCT)、人类白细胞抗

原-DR 同种型(HLA-DR)、乳酸、静脉-动脉血二氧化碳压力差(ΔpCO_2)、肾上腺髓质素等。但是由于脓毒症的病理生理学机制的复杂性,目前未找到能够单一有效治疗脓毒症的生物学标志物^[34]。所以找到更多的脓毒症发病过程中的生物学标志对于脓毒症本身以及其引起的器官功能紊乱的治疗尤其重要。

我们通过 Western blotting 分析急性肝损伤模型小鼠肝组织中 SIRT7 的表达水平,发现 LPS 抑制 SIRT7 表达。此外,我们发现 LPS 还可以抑制线粒体内 sirtuin 的表达,包括 SIRT3、SIRT4、SIRT5(结果未显示)。LPS 对 sirtuin 表达调控的机制还需进一步研究。

脓毒症发病过程中,肝脏会发生损伤, ERS 通路的激活会引起肝细胞的凋亡^[10]。那么寻找脓毒症疾病中 ERS 通路的抑制分子可能会帮助减轻肝损伤时的肝细胞凋亡程度。而据报道, SIRT7 在非酒精性脂肪肝中能够通过抑制 Myc 的活性来抑制 ERS 通路的激活,从而减轻脂肪肝^[19]。因此,我们推测在急性肝损伤中, SIRT7 也可能抑制 ERS 通路。所以在研究过程中将研究靶点放在了 SIRT7 和 ERS 通路上面。GRP78 作为 UPR 的主调节器,调节内质网内的稳态。我们通过体外 AML-12 细胞内过表达 SIRT7,给予 LPS 刺激,发现 SIRT7 能够抑制 LPS 诱导的 GRP78 的升高,提示 SIRT7 可以抑制 LPS 引起的 ERS 的激活。整体研究结果显示 SIRT7 能够在 LPS 和 D-GalN/LPS 诱导的急性肝损伤中起到一定的保护作用。

总之,本研究表明 SIRT7 能够通过抑制 ERS 通路中的 GRP78 来抑制 LPS 和 D-GalN/LPS 引起的肝细胞凋亡,这为未来的脓毒症导致的肝损伤治疗提供了线索。

参·考·文·献

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)[J]. JAMA, 2016, 315(8): 801-810.
- [2] Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis: current estimates and limitations[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2016, 193(3): 259-272.
- [3] Protzer U, Maini MK, Knolle PA, et al. Living in the liver: hepatic infections[J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(3): 201-213.
- [4] Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases[J]. Gastroenterology, 2014, 146(6): 1513-1524.
- [5] Strnad P, Tacke F, Koch A, et al. Liver: guardian, modifier and target of sepsis[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14(1): 55-66.
- [6] Kilar A, Dornyei A, Kocsis B, et al. Structural characterization of bacterial lipopolysaccharides with mass spectrometry and on and off line separation techniques[J]. Mass Spectrom Rev, 2013, 32(2): 90-117.
- [7] Ferencikova R, Cervinkova Z, Drahota Z. Hepatotoxic effect of D-galactosamine and protective role of lipid emulsion[J]. Physiol Res, 2003, 52(1): 73-78.
- [8] Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, et al. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture[J]. Shock, 2000, 13(2): 110-116.
- [9] Godin PJ, Fleisher LA, Eidsath A, et al. Experimental human endotoxemia increases cardiac regularity: results from a prospective, randomized, crossover trial[J]. Crit Care Med, 1996, 24(7): 1117-1124.
- [10] Khan MM, Yang WL, Wang P, et al. Endoplasmic reticulum stress in sepsis[J]. Shock, 2015, 44(4): 294-304.
- [11] Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(12): 3460-3470.
- [12] Jian B, Hsieh CH, Chen J, et al. Activation of endoplasmic reticulum stress response following trauma-hemorrhage[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1782(11): 621-626.
- [13] Senft D, Ronai ZA. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response[J]. Trends Biochem Sci, 2015, 40(3): 141-148.
- [14] Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities[J]. Nat Rev Drug Discov, 2008, 7(12): 1013-1030.
- [15] Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease[J]. Circ Res, 2010, 107(9): 1071-1082.

- [16] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(7): 519-529.
- [17] Kim HJ, Jeong JS, Kim SR, et al. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates lipopolysaccharide-induced lung inflammation through modulation of NF- κ B/HIF-1 α signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1142.
- [18] Luo B, Lee AS. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies[J]. *Oncogene*, 2013, 32(7): 805-818.
- [19] Shin J, He M, Liu Y, et al. SIRT7 represses Myc activity to suppress ER stress and prevent fatty liver disease[J]. *Cell Rep*, 2013, 5(3): 654-665.
- [20] Mesquita I, Varela P, Belinha A, et al. Exploring NAD⁺ metabolism in host-pathogen interactions[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(6): 1225-1236.
- [21] Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J, et al. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(4): 225-238.
- [22] Finkel T, Deng C, Mostoslavsky R, et al. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins[J]. *Nature*, 2009, 460(7255): 587-591.
- [23] Ford E, Voit R, Liszt G, et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(9): 1075-1080.
- [24] Tsai YC, Greco TM, Boonmee A, et al. Functional proteomics establishes the interaction of SIRT7 with chromatin remodeling complexes and expands its role in regulation of RNA polymerase I transcription[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11(5): 60-76.
- [25] Tsai YC, Greco TM, Cristea IM, et al. Sirtuin 7 plays a role in ribosome biogenesis and protein synthesis[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13(1): 73-83.
- [26] Michishita E, Park JY, Burneskis JM, et al. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins[J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(10): 4623-4635.
- [27] Boulon S, Westman BJ, Hutten S, et al. The nucleolus under stress[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 216-227.
- [28] Kiran S, Chatterjee N, Singh S, et al. Intracellular distribution of human SIRT7 and mapping of the nuclear/nucleolar localization signal[J]. *FEBS J*, 2013, 280(14): 3451-3466.
- [29] Buras JA, Holzmam B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(10): 854-865.
- [30] Martich GD, Boujoukos AJ, Suffredini AF, et al. Response of man to endotoxin[J]. *Immunobiology*, 1993, 187(3-5): 403-416.
- [31] Jaeschke H, Fisher MA, Lawson JA, et al. Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF- α -induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model[J]. *J Immunol*, 1998, 160(7): 3480-3486.
- [32] Wen J, Lin H, Zhao M, et al. Piceatannol attenuates D-GalN/LPS-induced hepatotoxicity in mice: involvement of ER stress, inflammation and oxidative stress[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 64: 131-139.
- [33] Dong JZ, Wang LP, Zhang SN, et al. LPS pretreatment ameliorates D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver failure in rat[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(11): 7399-7408.
- [34] Rello J, Valenzuela-Sanchez F, Ruiz-Rodriguez M, et al. Sepsis: a review of advances in management[J]. *Adv Ther*, 2017, 34(11): 2393-2411.

[收稿日期] 2019-03-07

[本文编辑] 邵碧云

学术快讯

第十二届中澳双边科研论坛圆满结束

2019年8月8日,由上海交通大学基础医学院,上海交通大学医学影像技术研究院,上海交通大学医学院附属瑞金医院、附属上海儿童医学中心、附属精神卫生中心组成的医学院脑科学研究团队在上海交通大学医学院副院长江帆教授的带领下去访澳大利亚悉尼大学,参加第十二届中澳双边科研论坛——神经科学前沿研究。悉尼大学医学与健康学院副院长 Mark Rees 教授、本次论坛澳方主席 Russell Dale 教授等科学家代表们参加论坛。

论坛上,江帆教授总结了双方在过去 11 届论坛中有关科研合作、联合发表论文、博士生联合培养、暑期学校等领域的合作进展,并介绍了上海交通大学医学院“脑计划”项目的整体规划与布局。出席论坛的 10 位中澳科学家代表分别从神经科学基础研究、神经退行性疾病临床研究、儿童脑发育、脑影像学等 4 个方面进行报告分享并展开讨论。随后,医学院代表团参观了悉尼大学 Brain and Mind 研究中心,并参加了生物医学科学专业本科生暑期学校结业典礼。

自 2007 年签订合作备忘录以来,双方医学院在过去的 12 年间取得了多项成果,包括共同举办双边科研论坛 12 次,共同合作发表论文 145 篇,合作论文单篇平均引用次数 87.8,获得国家自然科学基金国际合作项目 2 项、上海地方高水平大学建设项目“国际及港澳台地区培育项目”2 项等。

