

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.31.001

SIRT1 及相关因子在抗结核药物致人肝细胞损伤中的作用*

张一杨,李莹淑,李金凤,李 标,崇英之,郑国颖,孙淑丰,冯福民[△]

(华北理工大学公共卫生学院/河北省煤矿卫生与安全重点实验室,河北唐山 063000)

[摘要] 目的 探讨沉默信息调节因子 1(SIRT1)及相关因子在抗结核药物致人肝细胞损伤中的作用。

方法 将培养的人正常肝细胞 HL-7702 分为 4 组:空白对照组(A组)、异烟肼+利福平组(B组)、异烟肼+利福平+SIRT1 激动剂组(C组)、SIRT1 激动剂对照组(D组)。取各组细胞上清液检测丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平;实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法检测肝细胞中 SIRT1、核因子 κ B(NF- κ B)p65 mRNA 表达水平;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 SIRT1、NF- κ B p65、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)蛋白表达水平。结果 与 A 组比较,B 组细胞 SIRT1 的 mRNA 和蛋白表达明显下降($P < 0.01$),其下游靶基因 NF- κ B p65 的 mRNA 及蛋白表达升高($P < 0.01$),炎症因子 IL-6、TNF- α 蛋白表达水平升高($P < 0.01$)。与 B 组比较,C 组细胞 SIRT1 的 mRNA 和蛋白表达增加($P < 0.01$),NF- κ B p65 的 mRNA 及蛋白表达减少($P < 0.01$),炎症因子 IL-6、TNF- α 蛋白表达水平降低($P < 0.01$)。D 组与 A 组比较炎症因子表达差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 抗结核药物刺激可以造成肝细胞的炎症损伤,SIRT1 的激活可通过降低 NF- κ B p65 表达进而减轻肝细胞损伤发生。

[关键词] 沉默信息调节因子 1;核因子- κ B p65;抗结核药;肝损伤

[中图分类号] R183.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)31-3965-03

The effect of SIRT1 and related factors on human hepatocytes induced by anti-tuberculosis drugs*

ZHANG Yiyang, LI Yingshu, LI Jinfeng, LI Biao, CHONG Yingzhi,

ZHENG Guoying, SUN Shufeng, FENG Fumin[△]

(School of Public Health, North China University of Science and Technology/Hebei Province Key Laboratory of Occupational Health and Safety for Coal Industry, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] Objective To investigate the effect of silent information regulator 1 (SIRT1) and related factors on liver injury induced by anti-tuberculosis drugs. Methods Human hepatocytes HL-7702 cells were divided into 4 groups: the control group (group A), the isoniazid+rifampicin group (group B), the isoniazid+rifampicin+SIRT1 agonist group (group C), SIRT1 agonist group (group D). The content of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) were determined. The mRNA expression of SIRT1 and nuclear factor-kappa B p65 (NF- κ B p65) were analyzed by real-time quantitative PCR (RT-PCR). The protein concentrations of SIRT1, NF- κ B p65, interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by ELISA. Results Compared with group A, the mRNA and protein expression of SIRT1 in group B decreased ($P < 0.01$). The expression of mRNA and protein levels of NF- κ B p65 increased, and the expression of IL-6 and TNF- α increased ($P < 0.01$). The mRNA and protein expression of SIRT1 in group C was higher than that in group B ($P < 0.01$), the mRNA and protein expression of NF- κ B p65 decreased ($P < 0.01$), and the expression of IL-6 and TNF- α decreased ($P < 0.01$). There was no significant difference in the expression of inflammatory factors between group D and A. Conclusion The stimulation of anti-tuberculosis drugs could cause hepatocellular inflammatory injury, activation of SIRT1 could reduce the occurrence of hepatocellular injury by reducing the expression of NF- κ B p65.

[Key words] silent information regulator 1; NF- κ B p65; antitubercular agents; liver injury

结核病是由结核分枝杆菌引起的一种慢性传染性疾 病,并在全世界广泛流行,亚洲是结核病发病率和病死率较高的地区。目前世界卫生组织(WTO)推荐的临床上抗结核病的一线治疗方案仍包括异烟肼

(isoniazid, INH)和利福平(rifampicin, RFP)的联用,但异烟肼和利福平联合应用时产生的肝毒性所引起的抗结核药物性肝损伤(anti-tuberculosis drug-induced liver injury, ADLI)是其最主要且最严重的

* 基金项目:河北省自然科学基金资助项目(H2016209300)。 作者简介:张一杨(1992-),在读硕士研究生,主要从事传染病防治研究。

[△] 通信作者, E-mail: fm_feng@sina.com。

不良反应之一^[1]。目前认为抗结核药物代谢引起的炎症反应在肝损伤的发生过程中起重要作用,并可能成为 ADLI 防治的重要靶点^[2]。组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)作为催化核心组蛋白和非组蛋白发生去乙酰化作用的重要酶类物质,在调控细胞生长、参与氧化应激反应和炎症基因表达等方面发挥着重要功能^[3-4]。沉默信息调节因子 1(SIRT1)是一种依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)的Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶,与细胞衰老、抗氧化应激、抑制炎症和能量代谢调节等细胞多种功能活动有关^[5-8]。研究发现,核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)在肝脏炎症等损伤中起着重要作用,而激活 SIRT1-NF- κ B 信号通路可以改善和治疗酒精性肝损伤^[9]。因此,已知 NF- κ B 是 SIRT1 的靶分子,故推测在抗结核药物致肝损伤过程中由 NF- κ B 介导的促炎症反应增强也可能与 SIRT1 的表达变化有关。本研究通过抗结核药物异烟肼和利福平联合刺激人正常肝细胞,观察在其致肝细胞损伤过程中 SIRT1 及相关因子的表达变化,并通过加入 SIRT1 的激动剂 SRT1720 影响 SIRT1 表达,观察其对下游炎症因子的影响,从而探讨 SIRT1 及相关因子在抗结核药物致人肝细胞损伤中的作用,为 ADLI 的预防和结核病患者的高效保肝治疗研究提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂与仪器

人正常肝细胞株 HL-7702 引自上海中科院细胞所;异烟肼(批号:YSMXE-OM)、二甲基亚砜[(dimethyl sulfoxide, DMSO)批号:W3OKK-MI]购自日本 TCI 公司;青霉素与链霉素(批号:1634678)购自德国 BI 公司;0.25%胰蛋白酶(批号:25200-072)购自美国 GIBCO 公司;SIRT1 激动剂 SRT1720(批号:S112906)购自美国 Selleck 公司;90% Roswell Park Memorial Institute(RPMI)1640(批号:24916002)购自美国 CORNING 公司;10%胎牛血清(批号:JC50166)购自美国 CLARK 公司;PrimeScript™ RT Master Mix 试剂盒(批号:AK4601)、SYBR® Premix Ex Taq™ II PCR 试剂盒(批号:AK4602)购自大连宝生物工程有限公司;TRI pure Reagent 总 RNA 抽提试剂盒(批号:0020161010)购自北京百泰克生物技术有限公司;丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒(批号:20170301)购自南京建成生物工程研究所;SIRT1、NF- κ B p65、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)蛋白检测试剂盒(批号:201612)购自北京冬歌伟业生物技术有限公司。Heraeus 高速冷冻离心机购自德国 Thermo Scientific 公司;CA94089 型连续光谱酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司;C1000PCR 扩增仪购自美国 BIO-RAD 公司;实时荧光定量 PCR(RT-PCR)仪器购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养

用含 90% RPMI 1640, 10%胎牛血清, 1%双抗的培养液作为 HL-7702 细胞的培养基,将细胞放置于 5%CO₂, 37 °C 的细胞培养箱中进行培养。取对数生长期的细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL,接种到 6 孔板上,每孔为 2 mL。接种预培养 24 h 后更换培养基并予以相应处理,再次培养 48 h 后分别收集细胞及上清液。

1.2.2 细胞分组及干预

将实验按处理不同分为 A、B、C、D 4 组, A 组:采用 1640 培养基作为空白对照; B 组:采用含 120 μ g/mL 异烟肼和 240 μ g/mL 利福平的 1640 培养基; C 组:采用含 120 μ g/mL 异烟肼, 240 μ g/mL 利福平和 1 μ mol/L SIRT1 激动剂 SRT1720 的 1640 培养基; D 组:采用含 1 μ mol/L SIRT1 激动剂 SRT1720 的 1640 培养基作为 SIRT1 激动剂对照。

1.2.3 细胞上清液中 ALT、AST 水平检测

收集细胞培养的上清液,严格按照商品化的 ALT、AST 检测试剂盒说明书进行操作,测定各指标水平。

1.2.4 肝细胞中 SIRT1、NF- κ B p65 mRNA 表达水平的检测

采用 RT-PCR 方法测定肝细胞中 SIRT1、NF- κ B p65 mRNA 表达水平。收集细胞用 Trizol 提取 RNA,测定并计算 RNA 的纯度和浓度;取 RNA 在逆转录酶的作用下合成 cDNA。用 SYBR Green 嵌合荧光法进行实时 PCR 扩增。反转录和 RT-PCR 严格按照试剂盒说明书进行操作。反转录条件为 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C 1 min。mRNA 表达水平的检测以 GAPDH 为内参,反应条件:95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 40 个循环。荧光引物均由上海生工负责设计与合成,引物序列如下, GAPDH 上游引物:5'-GAA GGT CGG AGT CAA CGG ATT-3', 下游引物:5'-CCT GGA AGA TGG TGA TGG GAT-3'; SIRT1 上游引物:5'-CAT AGA CAC GCT GGA ACA GG-3', 下游引物:5'-TTG AGG GAA GAC CCA ATA ACA-3'; NF- κ B p65 上游引物:5'-GCG AGA GGA GCA CAG ATA CC-3', 下游引物:5'-GCA CAG CAT TCA GGT CGT AG-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 mRNA 表达水平。

1.2.5 肝细胞中 SIRT1、NF- κ B p65、IL-6、TNF- α 蛋白水平的检测

采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肝细胞中 SIRT1、NF- κ B p65、IL-6、TNF- α 蛋白表达水平,严格按照试剂盒说明书操作。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组细胞上清液中 ALT、AST 水平比较

抗结核药物刺激引起 HL-7702 细胞上清液 ALT、AST 水

平增加,与 A 组比较,B、C 组细胞上清液 ALT、AST 水平均明显升高($P < 0.01$);D 组与 A 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 B 组比较,C 组的 ALT、AST 水平明显降低($P < 0.01$),见表 1。

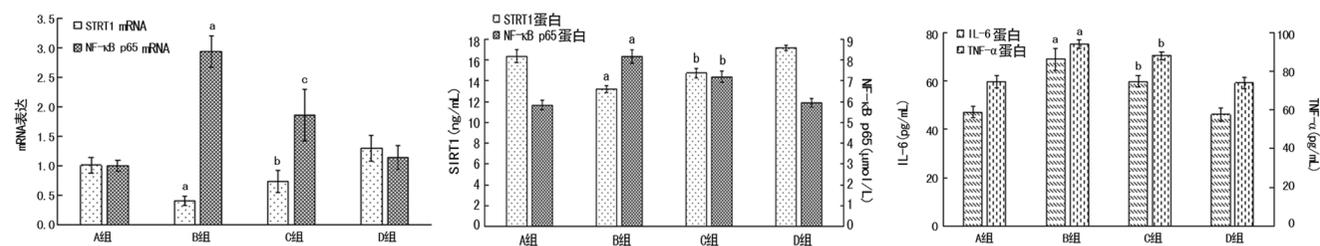
2.2 各组细胞上清液中 SIRT1、NF- κ B p65 mRNA 和蛋白等水平比较 与 A 组比较,B 组 HL-7702 细胞的 SIRT1 mRNA 和蛋白表达降低,NF- κ B p65 的 mRNA 和蛋白及 IL-6、TNF- α 蛋白表达升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。D 组与 A 组各炎症因子表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 B 组比较,C 组细胞的 NF- κ B p65 mRNA 和蛋白及 IL-

6、TNF- α 蛋白表达下降,SIRT1 mRNA 和蛋白表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 1。

表 1 各组细胞上清液中 ALT、AST 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 6, U/L$)

组别	ALT	AST
A 组	5.00 \pm 0.56	7.92 \pm 0.52
B 组	12.88 \pm 0.63 ^a	14.96 \pm 0.42 ^a
C 组	10.71 \pm 0.45 ^{ab}	12.94 \pm 0.65 ^{ab}
D 组	5.19 \pm 0.58	8.23 \pm 0.56

^a: $P < 0.01$,与 A 组比较;^b: $P < 0.01$,与 B 组比较



^a: $P < 0.01$,与 A 组比较;^b: $P < 0.05$,^c: $P < 0.01$,与 B 组比较

图 1 各组细胞中 SIRT1、NF- κ B p65 mRNA 和蛋白及 IL-6、TNF- α 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

目前对抗结核药物性肝损伤的研究较为深入,但由于其机制十分复杂,迄今为止尚不明确。SIRT1 是广泛存在在人类组织细胞中的一种蛋白,属于第 III 类 HDAC,目前在肝脏疾病中已备受关注。有研究显示,SIRT1 激活剂白藜芦醇可能通过调控 SIRT1/p53 信号通路和抑制对乙酰氨基酚的活化进而保护对乙酰氨基酚诱导的肝损伤^[10]。此外,SIRT1 缺乏还可以抑制 lipin-1 信号通路进而加重酒精性肝损伤,提示 SIRT1 是调控酒精性肝损伤的重要因子^[11]。本研究结果显示 SIRT1 在抗结核药物致人正常肝细胞损伤的过程中呈低表达状态,提示其可能参与到抗结核药物致人正常肝细胞损伤的过程中。

越来越多的研究发现药物代谢引起的炎症反应在其发生、发展过程中起着重要的作用。NF- κ B 是一组广泛存在于真核细胞细胞质内的复合蛋白,是一种核转录因子,当其被激活后可移位至细胞核内并与相应的双链 DNA 结合,从而启动下游多种基因的表达,在炎症发生和发展中起着极其重要的作用^[12]。有研究发现,使用抗炎药物 Corilagin 治疗胆汁淤积性肝损伤的动物,随着治疗时间的延长,NF- κ B 水平明显下降,这证明了 NF- κ B 与肝脏疾病密切相关^[13]。课题组前期研究发现,异烟肼致小鼠肝损伤发生过程中,NF- κ B 通路被激活,促炎性因子 TNF- α 过量产生,而利福平使 NF- κ B 表达先升高后降低^[14]。本研究结果显示,异烟肼、利福平联用引起的肝细胞损伤中 NF- κ B p65 表达升高,炎症因子 IL-6、TNF- α 也随之表达上升,这可能是综合了异烟肼的促进作用和利福平的抑制作用,进一步提示药物代谢引起的炎症反

应在 ADLI 发生过程中的重要作用。

早有研究指出,在炎症反应中,NF- κ B 的 p65 亚单位是 SIRT1 的直接靶点,SIRT1 通过去乙酰化其第 310 位赖氨酸残基,进而降低 NF- κ B p65 的乙酰化水平,从而抑制其对于下游炎症因子的转录^[15]。为深入探讨差异 SIRT1 表达参与的生理功能,本研究通过加入特异性 SIRT1 激动剂来改变 SIRT1 表达情况,进而观察细胞炎症损伤的改变。结果发现,SIRT1 的激活减轻了抗结核药物引起的炎症反应,而这很可能是由 SIRT1 对 NF- κ B p65 的去乙酰化作用来实现的。

尽管本研究推测出 SIRT1 低表达与抗结核药物致人正常肝细胞损伤的关系,但尚未明确其具体机制。有研究学者发现,SIRT1 能够对 Per2 基因启动子区组蛋白 H3K9、H4K16 进行去乙酰化从而抑制其转录,进而调节生物钟和机体老龄化的平衡状态^[16]。因此,在抗结核药物致人肝细胞损伤过程中,SIRT1 调控炎症反应的机制还可能通过对 NF- κ B p65 靶基因启动子区组蛋白发挥去乙酰化来完成的,这有待于进一步研究。

参考文献

[1] WHO TB REPORT. Global tuberculosis 2015 report[J]. J Chem Inf Model,2013,53(9):1689-1699.
 [2] MOURIK B C,LEENEN P J,DE KNEGT G J,et al. Immunotherapy added to antibiotic treatment reduces relapse of disease in a mouse model of tuberculosis[J]. Am J Respir Cell Mol Biol,2017,56(2):233-241.
 [3] BERTHIAUME M,BOUFAIED N,MOI(下转第 3972 页)

- 疾病中的基础研究进展[J]. 新医学, 2017, 48(8): 524-527.
- [2] BADAWEY A, SOBH M A, AHADY M, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell repair of cyclophosphamide-induced ovarian insufficiency in a mouse model[J]. *Int J Womens Health*, 2017(9): 441-447.
- [3] 冯春, 冯磊, 梁素丽, 等. 人脐带间充质干细胞的生物学特征及在妇产科中的研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(12): 2133-2136.
- [4] SONG D, ZHONG Y, QIAN C, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells therapy in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure rat model[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016(6): 1-13.
- [5] 李慧, 张琛, 崔恒, 等. 人脐带间充质干细胞治疗早发性卵巢功能不全的研究进展[J]. 中国妇产科临床杂志, 2017, 18(5): 478-480.
- [6] 吕晓丹. 脐带间充质干细胞移植治疗卵巢早衰的实验研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
- [7] 赵雪静. 促性腺激素释放激素拮抗剂(GnRHant)预防化疗损伤性卵巢功能早衰的实验研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2011.
- [8] 王婷. 人脐带间充质干细胞治疗卵巢早衰的实验研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- [9] HASS R, KASPER C, BOHM S, et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC[J]. *Cell Commun Signal*, 2011, 9(1): 12-15.
- [10] 杜静, 刘文慧, 王婷, 等. 人脐带间充质干细胞对卵巢早衰大鼠卵巢超微结构和功能的影响[J]. 现代妇产科进展, 2018, 27(2): 127-130.
- [11] WANG F, WEI Z L, SUN X R, et al. Apoptosis inducing factor is involved in stretch-induced apoptosis of myoblast via a caspase-9 independent pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(4): 829-838.
- [12] 朱少芳. 人脐带间充质干细胞移植改善化疗损伤卵巢功能的实验研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2011.
- [13] ZHU S F, HU H B, XU H Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation restores damaged ovaries[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(9): 2108-2117.
- [14] 李彩霞, 王凤英, 李玉艳, 等. 小鼠卵巢早衰动物模型的构建[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(6): 506-509.
- [15] YANG N, QIN X, PENGLI X U, et al. The value of AMH and INHB in prediction of ovarian reserve function in ovarian benign tumor[J]. *Lab Med Clin*, 2017, 14(21): 3178-3179, 3182.

(收稿日期: 2018-03-18 修回日期: 2018-06-16)

(上接第 3967 页)

- SAN A, et al. High levels of oxidative stress globally inhibit gene transcription and histone acetylation[J]. *DNA Cell Biol*, 2006, 25(2): 124-134.
- [4] SWYGERT S G, PETERSON C L. Chromatin dynamics: interplay between remodeling enzymes and histone modifications[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1839(8): 728-736.
- [5] KONG X X, WANG R, LIU X J, et al. Function of SIRT1 in physiology[J]. *Biochemistry(Mosc)*, 2009, 74(7): 703-708.
- [6] DI VINCENZO S, HEIJINK I H, NOORDHOEK J A, et al. SIRT1/FoxO3 axis alteration leads to aberrant immune responses in bronchial epithelial cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(4): 2272-2282.
- [7] RADA P, PARDO V, MOBASHER M A, et al. SIRT1 controls acetaminophen hepatotoxicity by modulating inflammation and oxidative stress[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 28(13): 1187-1208.
- [8] NAKAMURA K, KAGEYAMA S, KE B, et al. Sirtuin 1 attenuates inflammation and hepatocellular damage in liver transplant ischemia/Reperfusion; from mouse to human[J]. *Liver Transpl*, 2017, 23(10): 1282-1293.
- [9] SHEN Z, AJMO J M, ROGERS C Q, et al. Role of SIRT1 in regulation of LPS- or two ethanol metabolites-induced TNF- α production in cultured macrophage cell lines[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296(5): G1047-1053.
- [10] WANG Y, JIANG Y M, FAN X M, et al. Hepato-protective effect of resveratrol against acetaminophen-induced liver injury is associated with inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of SIRT1-p53 signaling pathways[J]. *Toxicol Lett*, 2015, 236(2): 82-89.
- [11] YIN H Q, HU M, LIANG X M, et al. Deletion of SIRT1 from hepatocytes in mice disrupts lipin-1 signaling and aggravates alcoholic fatty liver [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(3): 801-811.
- [12] LAN W W, PETZNICK A, HERYATI S, et al. Nuclear Factor- κ B: central regulator in ocular surface inflammation and diseases[J]. *Ocul Surf*, 2012, 10(3): 137-148.
- [13] JIN F, CHENG D, TAO J Y, et al. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of corilagin in a rat model of acute cholestasis[J]. *BMC Gastroenterol*, 2013, 13(1): 1-10.
- [14] 史哲. 一线抗结核药物诱导小鼠肝损伤对肝细胞 NF- κ B 表达的影响[D]. 唐山: 华北理工大学, 2015.
- [15] YEUNG F, HOBERG J E, RAMSEY C S, et al. Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase[J]. *EMBO J*, 2004, 23(12): 2369-2380.
- [16] WANG R H, ZHAO T R, CUI K R, et al. Negative reciprocal regulation between Sirt1 and Per2 modulates the circadian clock and aging[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(6): 28633-28648.

(收稿日期: 2018-01-18 修回日期: 2018-06-12)