

Nrf2 调控 SIRT6 表达的初步研究

杨文娟, 丁 贺, 刘新华, 刘海霞, 桑泽玲, 温传俊

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子细胞生物学研究所, 江苏 南京 210023)

[摘要] 衰老是一个普遍的、动态的, 并持续发展的复杂过程. 对其机制的研究中, 比较公认的是氧化应激损伤理论, 其中核转录因子 Nrf2 发挥重要的作用, 这一理论主要强调在寿命调节中 Nrf2 的抗氧化作用. 而本实验结合生物信息学、生物化学、细胞生物学等方法证明去乙酰化酶蛋白家族成员 SIRT6 的表达受 Nrf2 的调控, 即提示 Nrf2 的抗衰老作用可能是通过 SIRT6 发挥作用.

[关键词] 衰老, Nrf2, SIRT6

[中图分类号] Q28 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2015)03-0049-07

The Preliminary Study on Nrf2 Regulating SIRT6 Expression

Yang Wenjuan, Ding He, Liu Xinhua, Liu Haixia, Sang Zeling, Wen Chuanjun

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Province Key Laboratory for
Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: Aging is an universal, dynamic, complex process. The oxidative stress theory is a generally recognized explanation of a molecular mechanism underlying the aging process. The nuclear transcription factor Nrf2 plays an important role in this process. A series of experiments were done to verify that SIRT6 was a possible target gene of Nrf2 and it may act in conjunction with Nrf2.

Key words: aging, Nrf2, SIRT6

衰老的氧化应激理论指出: 机体内氧化损伤的积累导致了衰老的发生, 而这些损伤主要是由活性氧自由基(ROS, reactive oxygen species)的产生造成的^[1]. 当细胞受到 ROS 刺激时, 细胞内的一个重要抗氧化调节者是 Nrf2(nuclear factor-erythroid2-related factor 2). Nrf2 是一种碱性亮氨酸拉链转录因子, 属于 CNC 的一员. 正常情况下, Nrf2 与其抑制因子 Keap1(kelch-like ECH-associated protein 1)结合, 通过 26s 蛋白酶体的降解作用维持 Nrf2 的表达稳定性^[2]. 在细胞受到 ROS 的刺激后, Nrf2 与 Keap1 解耦联并转入细胞核内, 与小 Maf 蛋白结合形成异二聚体, 识别并结合 ARE(antioxidant response element), 启动下游一系列抗氧化蛋白基因, 如 HO-1(heme Oxygenase 1)、GST(glutathione S-transferases)的转录, 从而提高细胞的抗氧化能力^[3], 检测下游抗氧化基因的表达情况能间接地反映 Nrf2 的表达水平.

研究发现, 去乙酰化酶蛋白家族的成员 Sir2(沉默信息调控因子 2)可以显著延长酵母的寿命. 哺乳动物基因组编码 7 种 Sir2 家族成员即 SIRT1~SIRT7. 其中有报道^[4]: SIRT6 过表达的小鼠寿命较对照组明显延长, 进一步研究发现 SIRT6 可以通过降低血清中 IGF-1(胰岛素样生长因子 1)水平及下游的级联效应^[5], 同时抑制炎症反应, 参与 DNA 修复等途径对寿命进行调控.

虽然衰老不是一种疾病, 但是很多疾病的发生都和衰老有关, 因此寿命的研究对人类的健康有重大意义. Nrf2 可以提高细胞的抗氧化能力, 但有文献报道, 过表达一些主要的抗氧化基因并不能显著延长小鼠寿命^[6]. 另有文献报道, 两种品系的 SIRT6 转基因小鼠中, 雄性小鼠的寿命较野生型明显延长, 而在雌性小鼠中却无此明显差异^[7]. 同样 Keap1 功能部分缺失的雄性果蝇较野生型的寿命明显延长, 而在雌性果蝇

收稿日期: 2014-12-14.

基金项目: 国家自然科学基金(2012104GZ30057).

通讯联系人: 温传俊, 副教授, 研究方向: 肿瘤分子细胞生物学. E-mail: wenchuanjun@hotmail.com

中突变型和野生型寿命也没有明显差异^[8].因此本实验结合 Nrf2 与 SIRT6 在调节寿命中所表现的相似功能,猜想出两者之间可能存在着相互调控的作用.利用一些细胞生物学、生物化学、生物信息学等方法证明,SIRT6 可能是 Nrf2 的靶基因从而介导 Nrf2 延长寿命的作用.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 Nrf2 敲除小鼠

Nrf2 敲除的 C57BL/6J 小鼠来自江苏省中医药研究院.

1.1.2 试剂

真核表达质粒 Nrf2、pGL3-Basic 载体、内参质粒 pRL-TK 为本实验室保存;小提质粒试剂盒购自 Biomega 公司,割胶回收纯化试剂盒购自 Promega 公司,连接酶和限制性核酸内切酶均购自大连宝生物 Takara 公司,转染试剂脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司,高糖 DMEM 培养基和胎牛血清购自 Gibico 生物公司,Nrf2 抗体购自 Abcam 公司,SIRT6 抗体和 NAPDH 抗体均购自 CST 公司,反转录试剂盒和 Q-PCR 试剂盒均购自 Takara 公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司.

1.1.3 细胞

人胚肾细胞株(HEK-293)、肝癌 7402 细胞为本实验室保存,小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)为原代分离细胞.

1.2 方法

1.2.1 质粒构建

1.2.1.1 H-Keap1 质粒的构建

利用 NCBI 找到 H-Keap1 的编码序列,结合 Prime 5.0 设计了如下引物:

up 5'-ATACTCGAGATGCAGCCAGATCCCAGGCC-3';

down 5'-ATGGTACCTCAACAGGTACAGTTCTGCT-3'.

PCR 产物纯化后用 *Xho* I、*Kpn* I 于 37 °C 水浴锅中双酶切 3 h~4 h,割胶回收后,与 *Xho* I、*Kpn* I 双酶切后的 pEGFP-C₃ 载体 16 °C 过夜连接,连接产物转化感受态,挑取克隆,进行菌液验证,提取质粒送去测序.

1.2.1.2 SIRT6 启动子质粒构建

利用 UCSU 找到人的 SIRT6 启动子序列,选取转录起始位点上游约 2 000 bp. 结合 Prime 5.0 及 NCBI 设计如下引物:

up 5'-TATGAGCTCTCAGGGTACCTGGGTAGCTC-3';

down 5'-ATAAGCTTAAGTTCCCTTGTTGAGGCC-3'.

PCR 产物经纯化后用 *Sac* I、*Hind* III 37 °C 水浴双酶切 3 h~4 h,割胶回收后,与 *Sac* I、*Hind* III 双酶切后的 pGL3-Basic 载体 16 °C 过夜连接,连接产物转化感受态细胞,挑取克隆,菌液验证,进行测序.

1.2.1.3 SIRT6 启动子区域缺失突变和点突变质粒的构建

利用 TFSEARCH 分析 SIRT6 启动子区域 Nrf2 转录因子可能的结合位点为 -GCTTCCGGCG-, 并以上述 SIRT6 启动子质粒为模板构建含有 -GCTTCCATG- 点突变序列的质粒并命名为 SIRT6PM, 又构建了 SIRT6 promoter 缺失的突变质粒 SIRT6P2, 及 SIRT6P2 的点突变质粒 SIRT6P2M. 利用 Prime 5.0 设计引物如下:

SIRT6PM(1723bp) up 5'-TATCTCGAGGAGCTCCCGCCACAGTGCC-3',

down 5'-ATAAGCTTAAGTTCCCTTGTTGAGGCCGCTTCCATCGGAAGCGGGGC-3';

SIRT6P2(481bp) up 5'-TATCTCGAGATTGCGCCACTGCACTCCA-3',

down 5'-ATAAGCTTGGGGCGGGCGGGGAAGAA-3';

SIRT6P2M(481bp) up 5'-TATCTCGAGATTGCGCCACTGCACTCCA-3',

down 5'-ATAAGCTTAAGTTCCCTTGTTGAGGCCGCTTCCATCGGAAGCGGGGC-3'.

PCR 产物经纯化后用 *Xho* I、*Hind* III 37 °C 水浴双酶切 3 h~4 h,割胶回收后,与 *Xho* I、*Hind* III 双酶切后的 pGL3-Basic 载体过夜酶连,菌液验证,进行测序.

1.2.2 双荧光素酶报告基因活性检测

弃去24孔板中的细胞培养液,PBS洗2~3次后吸净,每孔加入双荧光素酶报告基因检测试剂盒中的被动裂解液100 μ L,于冰上裂解细胞15 min,每隔15 min摇晃一次.收集细胞裂解液,12 000 r/min离心10 min,吸取20 μ L细胞裂解液于化学发光仪的专用96孔板中后,加入100 μ L 1 \times Luciferase Assay Buffer II测出萤火虫荧光素酶活性值,再在相应孔中加入100 μ L 1 \times Stop&Glo Buffer,检测得到海肾荧光素酶活性值.每孔细胞的转染效率用内参海肾荧光素酶活性校正,处理数据时利用萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值来比较相对荧光值的大小.

1.2.3 RNA提取以及Q-PCR分析

细胞RNA的提取:弃去培养基,1 \times PBS洗1~2次后吸净,六孔板中每孔加入500 μ L Trizol,室温静置15 min,每隔5 min摇晃一次,使细胞充分裂解.将裂解液转至1.5 mL进口EP管中,然后加入0.1 mL预冷的氯仿,振荡15 s使其充分混匀后室温静置5 min,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min离心10 min,可见EP管内溶液分层.转移上层水相至另一EP管中(200 μ L即可),加入等体积预冷的异丙醇,上下颠倒混匀数次后,室温静置10 min,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min离心10 min,EP管底可见RNA沉淀,小心吸尽上清液,向EP管中加入1 mL 75%乙醇(用0.1% DEPC水现配现用),轻轻颠倒数次以清洗RNA沉淀,4 $^{\circ}$ C,7 500 r/min离心5 min,再次沉淀RNA.弃去上清液,并将EP管倒置于干净的滤纸上以除去管内残余的乙醇(不宜太干,以防影响RNA溶解),最后加入适量DEPC水溶解RNA.

组织RNA的提取:劲椎脱白处死小鼠后,于解剖板上取出所需组织,预冷的1 \times PBS清洗组织直至没有血迹.手术剪剪取50 mg~100 mg组织于进口EP管中,加入1 mL Trizol,将组织剪碎后,组织匀浆器破碎,室温静置10 min. EP管中加入预冷的300 μ L氯仿,振荡20 s,室温静置10 min,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min离心15 min.转移上清至另一个EP管中,加入等体积的预冷异丙醇,充分混匀后,-20 $^{\circ}$ C静置30 min,管底即可见白色沉淀.4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min离心10 min,弃上清,加入1 mL预冷的75%乙醇(用0.1% DEPC水现配现用),4 $^{\circ}$ C,7 500 r/min离心5 min,弃上清.并将EP管倒置于干净的滤纸上以除去管内残余的乙醇(不宜太干,以防影响RNA溶解),最后加入适量DEPC水溶解RNA.

RNA经NanoDrop分光光度仪测定合格后一部分于-80 $^{\circ}$ C保存,一部分反转录得到cDNA,利用Q-PCR检测其mRNA表达水平.操作过程严格按照Takara试剂盒说明书进行.

1.2.4 蛋白提取以及Western blot分析

弃去培养基,1 \times PBS洗3次,六孔板中每孔加入200 μ L RIPA裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH=7.5, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 100 \times PMSF, 10 \times cocktail)置冰上裂解细胞30 min,每隔5 min摇晃一次,充分裂解细胞,收集裂解液于1.5 mL EP管中,12 000 r/min离心10 min,将上清转移至新的1.5 mL EP管,加入5 \times Sample Buffer充分混匀,95 $^{\circ}$ C煮样10 min,煮样后分装样品,一部分存放于-80 $^{\circ}$ C,另一部分进行后续实验分析. 10%~12% SDS PAGE电泳恒压90 V,待样品跑过浓缩胶,电压改为120 V.恒流350 mA,90 min转移蛋白于PVDF膜上,5%脱脂牛奶封闭90 min,4 $^{\circ}$ C孵育一抗过夜,37 $^{\circ}$ C孵育辣根过氧化物酶标记的二抗2 h~4 h,利用ECL显色法进行显色并曝光,保存数据.

1.2.5 原代小鼠胚胎成纤维细胞的分离

取8周龄的雌、雄小鼠,下午2:00按1:1比例合笼,次日早8:30前检查母鼠孕栓(乳白色或蛋黄色胶冻状物即定为怀孕0.5 d).将妊娠12.5 d~13.5 d的母鼠颈椎脱白处死,在75%酒精中浸泡1 min~2 min,于超净台中,用止血钳夹住腹部皮肤向头尾两侧牵拉,撕开腹腔,暴露出母鼠子宫.用眼科镊夹住一侧子宫,分离子宫系膜,剪断子宫角和子宫颈,将整个子宫分离下来(注意勿使子宫滑落到腹腔外,避免污染).用含有双抗的PBS冲洗子宫,直至无血迹,转入含双抗PBS的培养皿中.无菌取出胎儿,去头、内脏和四肢于EP管中保存,用于胚胎小鼠基因型鉴定,将剩余的躯干部置于离心管中,加入适量含双抗的PBS反复振荡几次,直至无血迹.将洗净的躯干部剪碎(<1 mm³),置于(0.25%+0.02%)EDTA胰酶中37 $^{\circ}$ C消化30 min.将滤液转移至15 mL离心管中,1 000 r/min离心5 min~10 min,弃上清液,加4 mL含双抗的PBS,用移液枪反复缓慢吹打,使细胞重新悬浮,1 000 r/min离心5 min~10 min,重复此过程3~4次,以洗去小血块以及其他杂质,直至沉淀呈乳白色为止.吸弃上清后,再加入7 mL左右培养液,重新制成细胞悬液,接种在细胞培养皿中,24 h全量换液.置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂饱和湿度的CO₂培养箱内培养.

1.2.6 统计学处理分析

实验重复3次,采用Origin 8统计软件分析数据,t检验计算标准差组间差异,其中 $P>0.05$, $*P<0.05$, $***P<0.001$.

2 结果

2.1 Nrf2 蛋白增加了 SIRT6 的启动子活性

利用生物信息学软件 UCSC 查找 SIRT6 的启动子(包含转录起始位点上游 2 000 bp),又因为考虑到有些特定基因的转录区域内部也存在着转录因子的结合位点,因此选取 SIRT6 转录起始位点上游的 1 687 bp 与下游的 35 bp 插入 pGL3-Basic 载体中,将构建好的质粒转染 HEK-293 细胞,48 h 提取蛋白,利用双荧光素酶报告基因检测构建好的 SIRT6 启动子质粒的活性. PGL3-SIRT6 启动子的活性较 PGL3-Basic 上升了将近 60 倍(图 1(a)),充分说明 SIRT6 启动子质粒构建成功. 随着 Nrf2 的转染浓度的增加, SIRT6 启动子活性也随之增加,并具有显著性差异(图 1(b)). 加入 Keap1 干扰 Nrf2 的表达后, SIRT6 启动子的活性也明显下降(图 1(c)). 以上结果说明, Nrf2 这一转录因子对 SIRT6 启动子具有一定的激活作用.

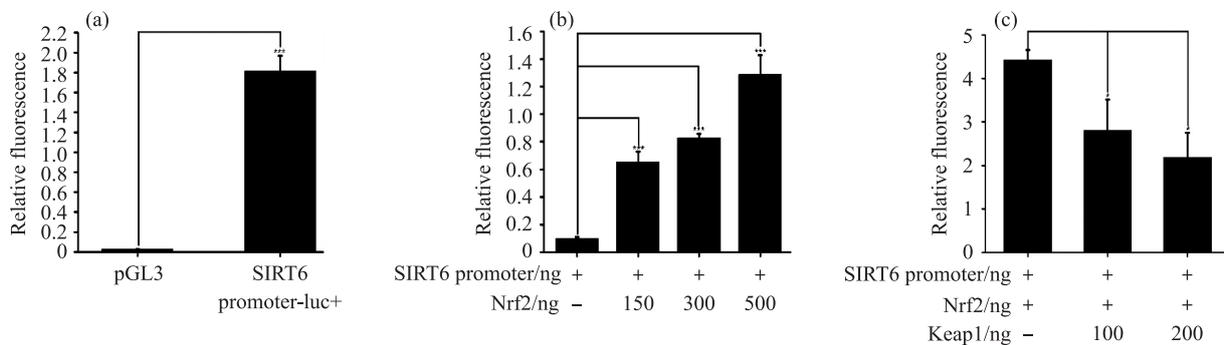


图 1 293 细胞中 Nrf2 蛋白增加了 SIRT6 的启动子活性

Fig.1 Nrf2 protein increased SIRT6 promoter activity in 293 cells

(a)利用双荧光素酶报告基因验证 SIRT6 启动子的活性;(b)利用双荧光素酶报告基因验证 Nrf2 转录因子对 SIRT6 启动子活性的作用;(c)利用双荧光素酶报告基因验证 Keap1 对 Nrf2 促进 SIRT6 启动子活性的作用

(a)SIRT6 promoter activity was verified by the dualluciferase reporter assay. (b)In the dualluciferase reporter assay, Nrf2 increased the activity of SIRT6 promoter. (c)Verified the functions of Nrf2 inhibitory factor Keap1 on the SIRT6 promoter activity

利用 TFSEARCH 分析 SIRT6 启动子区域可能存在的 Nrf2 结合位点(转录起始位点下游+6 处,序列为-GGC-),并对其点进行点突变,同时缺失 SIRT6 启动子区域上游约 1 000 bp 构建了 SIRT6 启动子缺失突变质粒(图 2(a)),双荧光素酶报告基因鉴定一系列突变质粒活性后,又检测了 Nrf2 对 SIRT6PM、SIRT6P2M、SIRT6P2 活性的作用. 图 2(b)结果显示,加入 Nrf2 对 SIRT6PM 的活性没有促进作用,加入 Keap1 后也没有抑制作用,说明预测位点对于 Nrf2 转录因子与 SIRT6 靶基因结合的重要性. 图 2(c)结果显

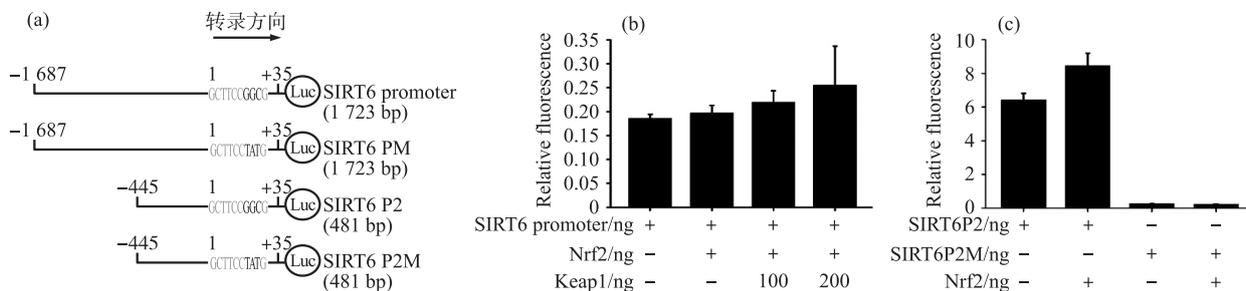


图 2 293 细胞中检测 Nrf2 对 SIRT6 启动子区点突变和缺失突变质粒的活性

Fig.2 The effects of Nrf2 on the SIRT6 promoter mutation plasmids activities in 293 cells

(a)SIRT6 启动子的一系列缺失突变和点突变的片段简图;(b)双荧光素酶报告基因检测 Nrf2 对 SIRT6PM 的活性;(c)双荧光素酶报告基因检测 Nrf2 对 SIRT6P2 和 SIRT6P2M 的活性

(a)SIRT6 promoter deletion and point mutations were shown by schematic. (b)Analyzed the effects of Nrf2 on mutated plasmid SIRT6PM activity by the dualluciferase reporter assay. (c)Verified the function of Nrf2 on SIRT6P2 and SIRT6P2M

示,Nrf2可以增加SIRT6P2启动子的活性,虽然没有显著性差异,推测缺失的上游1 000 bp可能还有Nrf2的结合位点.点突变预测位点后,Nrf2对于SIRT6P2M的活性没有影响.进一步说明了Nrf2预测的结合位点对促进SIRT6启动子活性的重要作用.

2.2 细胞中过表达Nrf2可以增加SIRT6的蛋白水平

在293细胞和肝癌7402细胞中,利用细胞转染技术,分别转入Nrf2真核表达质粒、Keap1真核表达质粒,48 h后提取RNA和蛋白,检测相关基因的mRNA表达水平和蛋白表达水平.mRNA表达水平结果如图3(a)、3(b)所示,在293细胞中过表达Nrf2,其下游抗氧化基因HO-1的mRNA水平上升,转入Keap1后,HO-1 mRNA表达水平下降.SIRT6的mRNA表达水平没有出现明显差异,这可能和实验选择的细胞系有关.由图3(c)、3(d)结果所示,在HEK-293细胞和7402细胞中,分别过表达Nrf2均可以增加SIRT6的蛋白表达水平,转染Keap1抑制Nrf2的蛋白表达后,SIRT6的蛋白表达水平也下降.由此说明,在蛋白水平上Nrf2对SIRT6活性也有一定的促进作用.

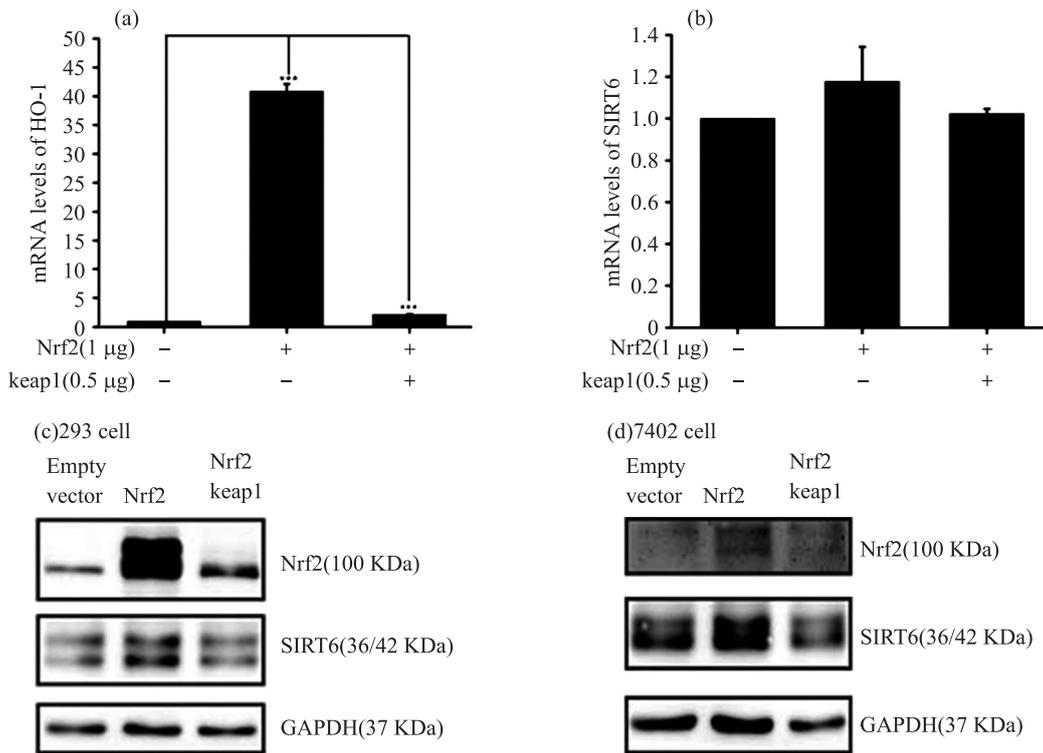


图3 细胞水平上过表达Nrf2可以增加SIRT6蛋白水平

Fig.3 Overexpression of Nrf2 can improve the SIRT6 protein expression levels in cells

(a)293细胞中Q-PCR检测Nrf2下游抗氧化基因HO-1的mRNA表达水平.(b)293细胞中Q-PCR检测SIRT6的mRNA表达水平.
(c)293细胞中Western blot分析Nrf2及SIRT6的蛋白表达水平.(d)7402细胞中Western blot分析Nrf2及SIRT6的蛋白表达水平

(a)The mRNA levels of HO-1 was analyzed by Q-PCR in 293 cells. (b)The mRNA levels of SIRT6 was analyzed by Q-PCR in 293 cells.
(c)The protein levels of Nrf2 and SIRT6 were analyzed by Western blot in 293 cells. (d)The protein levels of Nrf2 and SIRT6 were analyzed by Western blot in 7402 cells

2.3 小鼠胚胎成纤维细胞及小鼠部分组织中Nrf2与SIRT6 mRNA表达水平检测

在293细胞中利用瞬转过表达Nrf2,证明了在蛋白水平上Nrf2对SIRT6的促进作用.接下来分析在Nrf2^{+/+}型、Nrf2^{+/-}型、Nrf2^{-/-}型小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)及心脏和肺部组织中,Nrf2与SIRT6的表达相关性.如图4(a)所示,利用PCR法鉴定胚胎期小鼠的基因型,野生型在262 bp处有一条带,敲除型在400 bp处有一条带,杂合型在262 bp~400 bp之间均有带.图4(b)和图4(c)显示了较Nrf2^{+/+}型的MEF,Nrf2^{-/-}型MEF细胞中,Nrf2及其下游抗氧化基因NQO1的mRNA的表达水平均出现了显著下降.在持续低表达Nrf2的MEF细胞中,利用Q-PCR检测了SIRT6的mRNA表达水平,结果如图4(c)所示,Nrf2^{-/-}型MEF细胞中,SIRT6 mRNA的表达水平也出现了显著性的下降.这充分说明在MEF细胞中Nrf2对SIRT6的mRNA表达水平的调控作用.

由于Nrf2小鼠在繁育过程中,生育的雄性幼鼠占雌性幼鼠的比例较大,同窝出生的雌性各基因型小鼠较难得到.因此为了减少影响实验结果的干扰因素,只选用了同窝出生的8周大的Nrf2^{+/+}、Nrf2^{+/-}、Nrf2^{-/-}基因型雄性小鼠各3只为实验材料,提取其代谢较为旺盛的组织,提取肺部和心脏组织中的RNA,利用Q-PCR检测mRNA水平.结果如图5(a)~5(e)显示,在Nrf2^{-/-}基因型的小鼠心脏和肺部组织中,Nrf2及其下游抗氧化基因GST的mRNA表达水平较Nrf2^{+/+}、Nrf2^{+/-}基因型均显著性下降.又分析了在不同基因型小鼠组织中SIRT1-7的mRNA表达水平,结果发现SIRT家族成员在Nrf2^{+/+}、Nrf2^{+/-}、Nrf2^{-/-}基因型雄性小鼠的心脏和肺部组织中存在表达差异性.其中在心脏组织中,SIRT1-7中细胞核成员只有SIRT1在Nrf2^{-/-}基因型中出现显著性降低,线粒体成员中SIRT2、SIRT5在Nrf2^{-/-}基因型出现显著性上升.在肺部组织中,SIRT1-7中细胞核成员只有SIRT7在Nrf2^{-/-}基因型中出现显著性降低,线粒体成员中SIRT4在Nrf2^{-/-}基因型出现显著性下降.由此可见,在不同组织中Nrf2可能影响着SIRT1-7成员的表达,从而发挥着对寿命的调控作用.

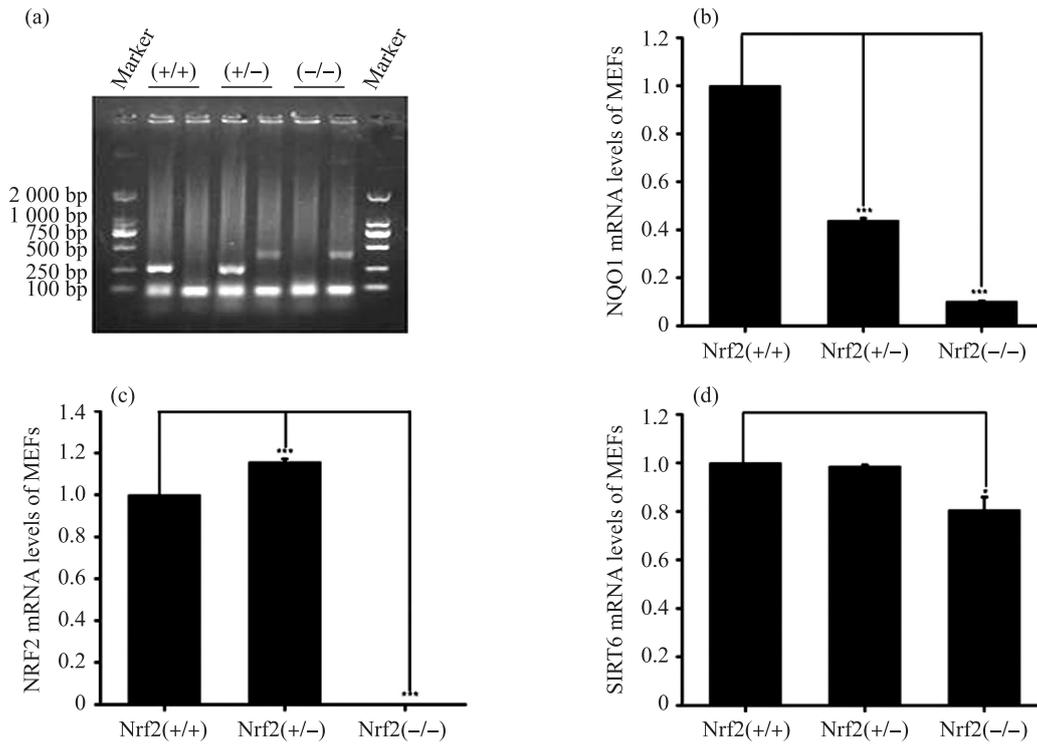


图4 小鼠胚胎成纤维细胞中Nrf2与SIRT6的mRNA表达水平检测

Fig.4 The correlation between the expression of Nrf2 and SIRT6 in MEFs

(a)取13.5 d的胚胎小鼠部分组织利用PCR法基因鉴定结果.(b)Q-PCR分析Nrf2^{+/+}、Nrf2^{+/-}、Nrf2^{-/-}基因型的MEF细胞中Nrf2下游基因NQO1的mRNA表达水平.(c)Q-PCR分析Nrf2^{+/+}、Nrf2^{+/-}、Nrf2^{-/-}基因型的MEF细胞中Nrf2的mRNA表达水平.(d)Q-PCR分析了Nrf2^{+/+}、Nrf2^{+/-}、Nrf2^{-/-}基因型的MEF细胞中SIRT6的mRNA表达水平

(a)The genotype identification of embryonic mice. (b)The NQO1 mRNA levels were analyzed by Q-PCR in Nrf2^{+/+} MEFs、Nrf2^{+/-} MEFs、Nrf2^{-/-} MEFs. (c)The NQO1 mRNA levels were analyzed by Q-PCR in Nrf2^{+/+} MEFs、Nrf2^{+/-} MEFs、Nrf2^{-/-} MEFs. (d)The SIRT6 mRNA levels were analyzed by Q-PCR in Nrf2^{+/+} MEFs、Nrf2^{+/-} MEFs、Nrf2^{-/-} MEFs

3 讨论

研究衰老的发生机制有利于为研究与衰老有关的疾病提供一定的理论基础.许多物种的长寿常常和抗氧化损伤^[7,8]有关,但是通过抗氧化损伤治疗来延缓衰老没能起到有益的效果^[9-12].

为此,本实验探索了Nrf2这一转录因子的其他靶基因.由于文献报道过表达长寿基因SIRT6可以显著延长雄鼠的寿命,Keap1缺失导致Nrf2过表达可以显著延长雄性果蝇的寿命.结合Nrf2和SIRT6在这两种模式生物中的相似功能,本实验猜测Nrf2可能通过SIRT6来介导对寿命的调控.本实验通过双荧光素酶报告基因实验,验证了Nrf2可以增加SIRT6的启动子活性.又利用细胞瞬转技术干扰Nrf2的表达及分离了Nrf2低表达的MEF细胞,通过Q-PCR和Western blot等检测技术,发现在这些细胞中SIRT6的表达也受到抑制,提示Nrf2可以调控SIRT6的表达.

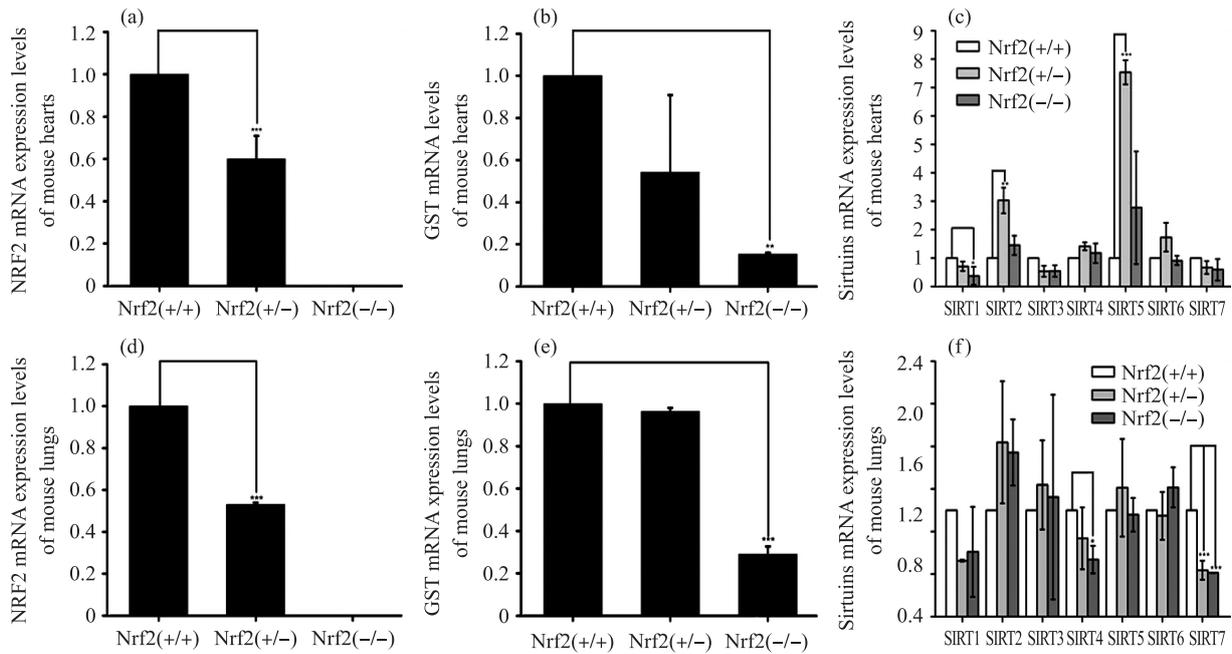


图5 Nrf2^{+/+}、Nrf2^{+/-}、Nrf2^{-/-}基因型的3组小鼠心脏和肺部组织中Nrf2与SIRT6的mRNA表达水平检测

Fig.5 The mRNA levels of Nrf2 and SIRT6 in the hearts and lungs of mice

(a)Q-PCR分析Nrf2^{+/+}、Nrf2^{+/-}、Nrf2^{-/-}基因型小鼠心脏组织中Nrf2的mRNA表达水平。(b)Q-PCR分析Nrf2^{+/+}、Nrf2^{+/-}、Nrf2^{-/-}基因型小鼠心脏组织中GST的mRNA表达水平。(c)Q-PCR分析Nrf2^{+/+}、Nrf2^{+/-}、Nrf2^{-/-}基因型小鼠心脏组织中SIRT1-7的mRNA表达水平。(d)Q-PCR分析Nrf2^{+/+}、Nrf2^{+/-}、Nrf2^{-/-}基因型小鼠肺部组织中Nrf2的mRNA表达水平。(e)Q-PCR分析Nrf2^{+/+}、Nrf2^{+/-}、Nrf2^{-/-}基因型小鼠肺部组织中GST的mRNA表达水平。(f)Q-PCR分析Nrf2^{+/+}、Nrf2^{+/-}、Nrf2^{-/-}基因型小鼠肺部组织中SIRT1-7的mRNA表达水平

(a)The Nrf2 mRNA levels were analyzed by Q-PCR in hearts of mice. (b)The GST mRNA levels were analyzed by Q-PCR in hearts of mice. (c)The SIRT1-7 mRNA levels were analyzed by Q-PCR in mice hearts. (d)The Nrf2 mRNA levels were analyzed by Q-PCR in lungs of mice. (e)The GST mRNA levels were analyzed by Q-PCR in lungs of mice. (f)The SIRT1-7 mRNA levels were analyzed by Q-PCR in mice lungs

在探索Nrf2和SIRT6的结合位点过程中,缺失SIRT6启动子的上游序列后,双荧光素酶报告基因结果提示,缺失的上游1000 bp和软件预测的结合位点对于Nrf2与SIRT6启动子区的结合也具有重要作用,因此进一步的验证还可以通过染色质免疫沉淀技术(chromatin immunoprecipitation assay,CHIP)分析出Nrf2与SIRT6的具体结合位置.如果Nrf2不是直接作用于SIRT6,也可能是Nrf2影响了其他转录因子的表达从而间接地影响了SIRT6启动子的活性.

在动物水平上,检测Nrf2各基因型小鼠肺部和心脏组织中SIRT1-7的mRNA表达,结果提示Nrf2对SIRT其他家族成员也有一定的调控作用.但因为存在组织表达差异性及其复杂性,导致在肺部组织和心脏组织中的SIRT家族成员的mRNA表达上也存在不一致的现象.就SIRT6而言,与之前在细胞水平上的研究结果有出入,但由细胞到组织的过渡其间涉及的表达调控网络更多,因此并不能就此否定在细胞中所得到的Nrf2可以激活SIRT6的表达这一结论.组织上的结果只是从另一个层面上为Nrf2介导寿命延长的研究拓宽了研究思路.

[参考文献]

[1] Harman D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1067: 10-21.
 [2] Zhang D D, Lo S C, Cross J V, et al. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24: 10 941-10 953.
 [3] Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. Antioxid [J]. Redox Signal, 2005, 7: 385.
 [4] Kanfi Y, David B, Lombard A, et al. Sorting out sirtuins[J]. Nature, 2012, 483: 218-221.

(下转第63页)

-
- [14] Wang X H, Tang J, Xing L J, et al. Interaction of MAGED1 with nuclear receptors affects circadian clock function[J]. *The EMBO Journal*, 2010, 29: 1 389–1 400.
- [15] Carlos D, Tuan N, Olivier S, et al. Loss of Maged1 results in obesity, deficits of social interactions, impaired sexual behavior and severe alteration of mature oxytocin production in the hypothalamus[J]. *Human Molecular Genetics*, 2012, 21(21): 4 703–4 717.
- [16] Akihiro M, Aya S, Ken W, et al. MAGE-D1 regulates expression of depression-like behavior through serotonin transporter ubiquitylation[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2012, 32(13): 4 562–4 580.
- [17] Teuber J, Mueller B, Fukabori R, et al. The ubiquitin ligase Praja1 reduces NRAGE expression and inhibits neuronal differentiation of PC12 cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63067.
- [18] Sasaki A L, Hinck L, Watanabe K. RumMAGE-D the members: structure and function of a new adaptor family of MAGE-D proteins[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2005, 25(3): 181–198.
- [19] Andrew C, Samuel W. Production of neurons, astrocytes and oligodendrocytes from mammalian CNS stem cells[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 935–940.
- [20] Feng Z H, Li K Z, Liu M, et al. NRAGE is a negative regulator of nerve growth factor-stimulated neurite outgrowth in PC12 cells mediated through TrkA-Erk signaling[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2010, 88: 1 822- 1 828.
- [21] Maheswara R E, Sivarajan T C, Navjot K, et al. Dlxin-1, a MAGE family protein, induces accelerated neurite outgrowth and cell survival by enhanced and early activation of MEK and Akt signalling pathways in PC12 cells[J]. *Experimental Cell Research*, 2010, 316: 2 220–2 236.

[责任编辑:黄 敏]

(上接第 55 页)

- [5] Itoh K, Mochizuki M, Ishii Y, et al. Transcription factor Nrf2 regulates inflammation by mediating the effect of 15-deoxy-D12, 14-prostaglandin J2[J]. *Cell Biol*, 2004, 24: 36–45.
- [6] Andersen P K, Borgan O, Gill R D, et al. *Statistical Models Based on Counting Processes* [M]. New York: Springer, 1993: 1 797–1 798.
- [7] Kanfi Y, Naiman S, Amir G, et al. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice[J]. *Nature*, 2012, 483(7 388): 218–221.
- [8] Sykiotis G, Bohmann D. Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in drosophila[J]. *Developmental Cell*, 2008, 14(1): 76–85.
- [9] Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism[J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10: 549–557.
- [10] Lee J M, Li J, Johnson D A, et al. Nrf2, a multi-organ protector?[J]. *FASEB J*, 2005, 19: 1 061–1 066.
- [11] Harper J M, Salmon A B, Chang Y, et al. Stress resistance and aging: influence of genes and nutrition[J]. *Mech Ageing Dev*, 2006, 127: 687–694.
- [12] Murakami S. Stress resistance in long-lived mouse models[J]. *Exp Gerontol*, 2006, 41: 1 014–1 019.
- [13] Pe'rez V I, Van Remmen H, Bokov A, et al. The over-expression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice[J]. *Aging Cell*, 2009(8): 73–75.
- [14] McCord R A, Michishita E, Hong T, et al. SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand breaking[J]. *Aging*, 2009(1): 109–121.

[责任编辑:黄 敏]