

# 沉默信息调节因子1抑制核因子 $\kappa$ B通路调控 癫痫大鼠小胶质细胞活化的机制研究

叶子 马宝君 张毅 王学建 陈振华 蔡骥

226000 南通大学第二附属医院神经外科

通信作者: 马宝君, Email: 781339980@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2020.01.002

**【摘要】目的** 探讨沉默信息调节因子1(SIRT1)在癫痫中对小胶质细胞及炎症因子的影响及作用机制。**方法** 建立氯化锂-匹罗卡品致痫大鼠模型,免疫组化观察各组(对照组和癫痫组)大鼠脑组织内小胶质细胞活化;采用脂多糖(LPS)建立小胶质细胞活化模型,构建pcDNA-SIRT1和si-SIRT1载体,转染至大鼠小胶质细胞中。定量即时聚合酶链反应(qRT-PCR)测定大鼠海马组织及小胶质细胞中SIRT1表达,Western blot检测小胶质细胞的活化标志物Iba1和核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)通路相关蛋白(p65和I $\kappa$ B $\alpha$ )的蛋白表达水平,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测促炎因子[白细胞介素1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素6(IL-6)和肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )]的表达水平。**结果** 与Control组比较,癫痫大鼠海马组织中SIRT1 mRNA表达量显著降低( $P < 0.05$ ),Iba1蛋白表达量显著增加( $P < 0.05$ ),且对照组CA1、CA2区Iba1阳性细胞数分别为(180  $\pm$  21)、(190  $\pm$  18)/mm<sup>2</sup>,癫痫组CA1、CA2区Iba1阳性细胞数分别为(412  $\pm$  35)、(470  $\pm$  37)/mm<sup>2</sup>,两组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。同样,与Mock组比较,LPS活化小胶质细胞中SIRT1表达水平显著降低,Iba1蛋白表达水平显著增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$ )。转染pcDNA-SIRT1及si-SIRT1至LPS活化的小胶质细胞中,LPS+pcDNA-SIRT1组IL-1 $\beta$  [(50.0  $\pm$  3.3)ng/L]、IL-6 [(55.0  $\pm$  3.2)ng/L]和TNF- $\alpha$  [(56.1  $\pm$  3.0)ng/L]表达水平显著低于LPS组和LPS+pcDNA-NC组(均 $P < 0.05$ );LPS+si-SIRT1组中IL-1 $\beta$  [(98.2  $\pm$  4.3)ng/L]、IL-6 [(108.1  $\pm$  4.5)ng/L]和TNF- $\alpha$  [(124.5  $\pm$  4.1)ng/L]表达水平显著高于LPS组和LPS+si-NC组(均 $P < 0.05$ );同时LPS+pcDNA-SIRT1组NF- $\kappa$ B p65的表达水平显著低于LPS组和LPS+pcDNA-NC组(均 $P < 0.05$ ),I $\kappa$ B $\alpha$ 的表达水平显著高于LPS组和LPS+pcDNA-NC组(均 $P < 0.05$ );而LPS+si-SIRT1组NF- $\kappa$ B p65的蛋白表达水平显著高于LPS组和LPS+si-NC组(均 $P < 0.05$ ),I $\kappa$ B $\alpha$ 的表达水平显著低于LPS组和LPS+si-NC组(均 $P < 0.05$ )。加入NF- $\kappa$ B通路激活剂Aconine后,与LPS+pcDNA-SIRT1组比较,LPS+pcDNA-SIRT1+Aconine组大鼠中Iba1表达水平显著升高( $P < 0.05$ );LPS+pcDNA-SIRT1+Aconine组大鼠中IL-1 $\beta$  [(72.2  $\pm$  4.3)ng/L]、IL-6 [(80.1  $\pm$  4.0)ng/L]和TNF- $\alpha$  [(87.2  $\pm$  4.5)ng/L]表达水平显著高于LPS+pcDNA-SIRT1组的[(50.1  $\pm$  2.3)ng/L]、[(55.0  $\pm$  3.4)ng/L]和[(56.3  $\pm$  4.9)ng/L] (均 $P < 0.05$ )。**结论** SIRT1可能通过抑制NF- $\kappa$ B通路活性来抑制癫痫大鼠小胶质细胞的作用。

**【关键词】** 癫痫; 沉默信息调节因子1; 小胶质细胞; 炎症水平

**基金项目:** 江苏省科技厅自然科学基金项目(BK20161290);江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(2019-WSW-199);南通市科技计划项目(JC2018088)

**Mechanism of SIRT1 regulating the activation of microglia in status epilepticus via inhibiting the NF- $\kappa$ B pathway** Ye Zi, Ma Baojun, Zhang Yi, Wang Xuejian, Chen Zhenhua, Cai Qi  
Neurosurgery Department, the Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226000, China  
Corresponding author: Ma Baojun, Email: 781339980@qq.com

**【Abstract】Objective** To investigate the effect of silent information regulator 1 (SIRT1) on microglia in Status epilepticus (SE) and its mechanism. **Methods** The rat SE model was induced by lithium-pilocarpine injection. The activation of microglia in brain tissues of control and SE rats was observed by immunohistochemistry. Microglial activation model was established by lipopolysaccharide (LPS). PcDNA-SIRT1

and si-SIRT1 vectors were constructed and transfected into rat microglia cells. The expression of SIRT1 in the rat hippocampus and microglia was determined by qRT-PCR. The expression levels of the activation markers of microglia (Iba1) and NF- $\kappa$ B p65 and I $\kappa$ B  $\alpha$  were detected by Western blot, and levels of the inflammatory factors (IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ ) were detected by ELISA. **Results** Comparing with the control group, the mRNA expression of SIRT1 in the hippocampus of SE rats was significantly decreased, while the protein expression of Iba1 was significantly increased. The number of Iba1 positive cells in CA1 and CA2 regions in the control group was  $(180 \pm 21)/\text{mm}^2$  and  $(190 \pm 18)/\text{mm}^2$ , as  $(412 \pm 35)/\text{mm}^2$  and  $(470 \pm 37)/\text{mm}^2$  in the SE group. The difference in Iba1 positive cells in CA1 and CA2 regions between the two groups was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Similarly, the expression level of SIRT1 in LPS activated microglia was significantly decreased, while the expression level of Iba1 protein was significantly increased, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). pcDNA-SIRT1 and si-SIRT1 were transfected into the post-microglia cells activated by LPS. The levels of IL-1 $\beta$  ( $50.0 \pm 3.3$ ) ng/L, IL-6 ( $55.0 \pm 3.2$ ) ng/L and TNF- $\alpha$  ( $56.1 \pm 3.0$ ) ng/L in LPS+pcDNA-SIRT1 were significantly lower than those in LPS group and LPS+pcDNA-NC group ( $P < 0.05$ ). The levels of IL-1 $\beta$  ( $98.2 \pm 4.3$ ) ng/L, IL-6 ( $108.1 \pm 4.5$ ) ng/L and TNF- $\alpha$  ( $124.5 \pm 4.1$ ) ng/L in LPS+si-SIRT1 group were significantly higher than those in LPS group and LPS+si-NC group ( $P < 0.05$ ). Besides, the NF- $\kappa$ B p65 expression in LPS+pcDNA-SIRT1 group was significantly lower than that in LPS group and LPS+pcDNA-NC group, while the I $\kappa$ B  $\alpha$  expression was higher than those two groups ( $P < 0.05$ ). However, the NF- $\kappa$ B p65 expression in LPS+si-SIRT1 group was significantly higher than that in LPS group and LPS+si-NC group, while the I $\kappa$ B  $\alpha$  expression was lower than those two groups ( $P < 0.05$ ). After giving the NF- $\kappa$ B pathway activator (Aconine), compared with the LPS+pcDNA-SIRT1 group, the expression of Iba1 in the LPS+pcDNA-SIRT1+Aconine group was significantly increased ( $P < 0.05$ ). The expression levels of IL-1 $\beta$  were significantly higher in the LPS+pcDNA-SIRT1+Aconine group [ $(72.2 \pm 4.3)$  ng/L, IL-6 ( $80.1 \pm 4.0$ ) ng/L, and TNF- $\alpha$  ( $87.2 \pm 4.5$ ) ng/L] than that in the LPS + pcDNA-SIRT1 group [IL-1 $\beta$  ( $50.1 \pm 2.3$ ) ng/L, IL-6 ( $55.0 \pm 3.4$ ) ng/L, and TNF- $\alpha$  ( $56.3 \pm 4.9$ ) ng/L] ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** SIRT1 could inhibit the activation of microglia in SE rats by inhibiting the NF- $\kappa$ B pathway.

**【Key words】** Status Epilepticus; SIRT1; Microglia; Inflammation factors

**Fund programs:** Natural Science Foundation Project of Science and Technology Department of Jiangsu Province (BK20161290); "Six Talent Peaks" High-Level Talent Project of Jiangsu Province (2019-ww-199); Nantong Science and Technology Plan Project (JC2018088)

癫痫是一种仅次于脑血管疾病的常见神经系统疾病,严重危害人类健康<sup>[1]</sup>。临床试验和动物实验结果显示,癫痫发作后存在明显的炎症反应,炎症反应增加了神经元的兴奋性,加速了癫痫发作后神经元的凋亡,进一步促进了癫痫的再次发作,增加了癫痫发作的易感性<sup>[2]</sup>。长时间癫痫发作,若不及时治疗,可因高热、循环衰竭或神经元兴奋毒性损伤导致不可逆的脑损伤,致残率和病死率很高<sup>[3]</sup>。癫痫的发病机制复杂且多样,所以寻找新的治疗靶点迫在眉睫<sup>[3-4]</sup>。小胶质细胞起源于血循环中的单核细胞,是存在于中枢神经系统的一种具有免疫活性的巨噬样细胞。在癫痫模型中,癫痫传播区域的神经元未见明显损伤时,该区域内小胶质细胞已经被激活<sup>[5]</sup>。活化小胶质细胞可释放大量炎症介质如白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )等,进一步提高突触兴奋性,降低癫痫发作阈值,促进癫痫发生<sup>[6]</sup>。

沉默信息调节因子1(silent information regulator 1, SIRT1)是一种依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的组蛋白去乙酰化酶,与细胞衰老、寿命延长、抗氧化应激

和能量代谢调节等细胞多种功能活动有关<sup>[7]</sup>。研究表明,SIRT1可使核因子 $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)RelA/p65亚单位去乙酰化,进而抑制NF- $\kappa$ B活性,从而起到抗炎作用<sup>[8-9]</sup>。因此研究认为,SIRT1可作为癫痫治疗的潜在靶点<sup>[10]</sup>。本研究中,通过构建匹罗卡品诱导大鼠癫痫模型,观察癫痫大鼠小胶质细胞中SIRT1的表达,并通过SIRT1的真核表达质粒载体pcDNA和RNA干扰(RNA interference, RNAi)的干扰技术研究其对小胶质细胞及炎症因子的影响,从而探讨SIRT1抑制NF- $\kappa$ B通路调控癫痫小胶质细胞活化作用,为进一步研究其在癫痫中的作用奠定基础。

## 材料与方法

### 一、实验动物

SD雄性大鼠(6~8周龄,体质量200~250g),由本院实验动物中心提供。动物饲养环境温度控制在 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$ 下,12/12h明暗交替循环,给予其自由饮食和饮水。所有动物实验操作内容及流程符合国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)实

验动物使用规范, 遵守国家规定的《实验动物管理条例》并获得医院实验动物伦理委员会审核批准。

## 二、方法

1. 癫痫大鼠模型的建立: 大鼠随机分为对照组(20只)及癫痫组(60只)。参考前人研究构建大鼠癫痫模型<sup>[11]</sup>, 给予癫痫组大鼠腹腔注射氯化锂(批号: L4408 MSDS, Sigma, USA)溶液(127 mg/kg)预处理20 h后, 腹腔注射匹罗卡品(批号: 1000970434, Sigma, USA) (15 mg/kg), 依其行为学改变确定癫痫大鼠模型; 给予对照组的大鼠腹腔注射适量的生理盐水。模型建立成功的标准为大鼠发作等级Racine分级标准 $\geq$ IV级。

2. 原代小胶质细胞分离: 取SD大鼠新生鼠大脑, 于冰面上改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM; 货号: A4192101, Thermo Fisher scientific, USA)中快速剥离脑膜, 分离大脑皮质后剪碎, 加入0.25%胰蛋白酶(货号: 15050057, Thermo Fisher scientific, USA)消化, 冲洗, 去上清, 重悬细胞, 种于提前用多聚赖氨酸包被的培养瓶中, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^6$ /ml, 培养10~14 d后, 于恒温摇床上分离纯化小胶质细胞(200 r/min), 小胶质细胞/巨噬细胞特异性蛋白(Iba1)抗体(ab178846, Abcam, UK)鉴定小胶质细胞。

3. 细胞转染: 将获取的小胶质细胞, 应用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS; 批号: L2630 MSDS, Sigma, USA)诱导使其活化, 分为2组: 空白对照组(Mock组)、LPS模型组(LPS组)。同时将pcDNA-SIRT1过表达质粒、阴性对照(pcDNA-NC)及SIRT1 siRNA(si-SIRT1)和阴性对照(si-NC) [均购自上海吉玛制药技术有限公司(上海, 中国)]转染其LPS处理的小胶质细胞中, 将其随机分为LPS组、LPS+pcDNA-SIRT1组、LPS+pcDNA-NC组、LPS+si-SIRT1组、LPS+si-NC组。LPS+pcDNA-SIRT1组加入0.25  $\mu$ mol/l的NF- $\kappa$ B通路激活剂Aconine(HY-N0277, MCE, MedChemExpress, USA)后构成LPS+pcDNA-SIRT1+Aconine组。

4. 定量实时聚合酶链反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测: 取待测组织及细胞, 使用Trizol试剂(批号: 15596018, Invitrogen, 美国)提取各样品中的总RNA。再按照逆转录试剂盒PrimeScript RT reagent kit gDNA Eraser (Takara, 大连, 中国)合成cDNA。应用ABI7500定量PCR仪(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)进行

qRT-PCR实验, 得到各反应管的循环阈值(threshold cycle, Ct值), 数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法<sup>[12]</sup>进行分析, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为SIRT1内参, 实验重复3次。各基因及其引物的扩增引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成, 见表1。

表1 各基因及其引物的扩增引物序列

基因引物名称	引物序列
SIRT1上游引物	5' -CAGGTACAGGAATTGCTCCACCA-3'
SIRT1下游引物	5' -CTGATCTCTTGTTCAGTTCACAG-3'
NF- $\kappa$ B上游引物	5' -GAAGAAGCGAGACCTGGAG-3'
NF- $\kappa$ B下游引物	5' -TCCGGAACACAATGGCCAC-3'
GAPDH上游引物	5' -ACACCTTCTACAATGAGCTG-3'
GAPDH下游引物	5' -CTGTTGCTGATCCACATCT-3'

注: SIRT1 沉默信息调节因子1; NF- $\kappa$ B 核因子 $\kappa$ B; GAPDH 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

5. Western blot检测: 取各组细胞, 加入RIPA裂解液(批号: 89900, Thermo Fisher scientific, USA)提取蛋白。取适量提取的蛋白样品加入 $5 \times$  Loading buffer, 水中煮沸10 min, 进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 将蛋白质转移到PVDF(聚偏二氟乙烯, Polyvinylidene fluoride, 货号: 88520, Thermo Fisher scientific, USA)膜上, 5%脱脂牛奶-TBST(Pierce<sup>TM</sup> Protein-Free T20 (TBS) Blocking Buffer, 货号: 88520, Thermo Fisher scientific, USA)封闭, 洗膜液漂洗PVDF膜, 加入兔抗鼠GAPDH、Iba1、核因子活化B细胞 $\kappa$ 轻链增强子p65(NF- $\kappa$ B p65)、核因子 $\kappa$ B抑制因子 $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ )、SIRT1, 4 $^{\circ}$ C过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG, 室温振荡孵育1 h, 进行化学发光显色, 曝光、显影、定影, 数据分析。内参为GAPDH。

6. 免疫组化: 将海马区切片放入二甲苯后取出, 脱水, 切片, 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>孵育, 5%牛奶封闭, 加入一抗(Iba1, 1 : 500)孵育过夜, 生物素化二抗室温孵育1 h, 干燥后二氨基联苯胺(货号: TA-060-QHDX, Thermo Fisher scientific, USA)染色, 冲洗, 风干, 苏木素染细胞核, 酒精脱水, 封片, 观察, 拍照。

7. 炎症因子检测: IL-1 $\beta$ 、IL-6以及TNF- $\alpha$ 水平测定参照酶联免疫吸附剂测定(ELISA)试剂盒(ADI, Texas, USA)说明书进行, 应用酶标仪(spectraMAX 340, Molecular Devices, Sunnyvale, 美国)在450/550 nm波长处测定各孔的吸光度, 根据标准曲线定量。

8. 免疫荧光: 胶质细胞爬片, 玻片提前以多聚赖氨酸包被, 培养 24 h, 磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffer saline, PBS) 冲洗, 4% 多聚甲醛固定, PBS 冲洗, 加入适量 0.2% Triton-X100(货号: 85111, Thermo Fisher scientific, USA) 穿透 10~15 min, PBS 冲洗, 2% 牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA; 货号: 30036727, Thermo Fisher scientific, USA) 封闭, PBS 冲洗, 加入一抗(Iba1, 1 : 500; ab153696, Abcam, UK) 孵育过夜, 荧光二抗[ Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) preadsorbed, 1 : 1 000; ab150117, Abcam, UK ]室温孵育, PBS 冲洗, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI; 货号: P36931, Thermo Fisher scientific, USA) 染核, 漂洗后避光封片, 荧光显微镜下观察。

9. 统计学方法: 应用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism.v 7.01 统计软件分析数据, 正态分布的计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 来表示。所有实验重复 3 次, 两组间的比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Tukey 多重比较。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结 果

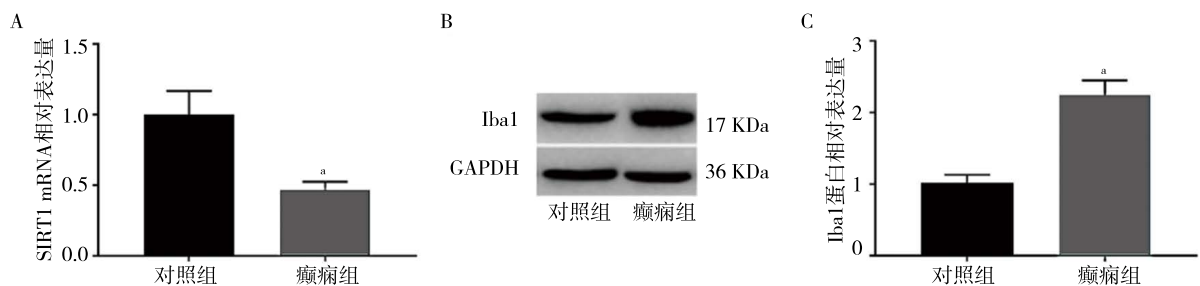
1. SIRT1 参与癫痫大鼠小胶质细胞活化: 癫痫组大鼠 Racine 分级高于 IV 级, 癫痫发作频率为 (13.5 ± 1.1) 次/d, 发作潜伏期为 (16.7 ± 1.5) min。qRT-PCR 检测各组大鼠海马组织中 SIRT1 mRNA 的表达, 结果表明, 与对照组比较, 癫痫组大鼠的 SIRT1 mRNA 表达水平显著降低 (*P* < 0.05, 图 1A)。Western blot 及免疫组化检测各组大鼠海马区 Iba1 的蛋白表达水平结果显示, 与对照组比较, 癫痫组区域 Iba1 表达量明显增加, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05, 图 1B、1C); 对照组 CA1、CA2 区阳性细胞数分别为

(180 ± 21)、(190 ± 18)/mm<sup>2</sup>; 癫痫组 CA1、CA2 区阳性细胞数分别为 (412 ± 35)、(470 ± 37)/mm<sup>2</sup>, 癫痫组 CA1、CA2 区阳性细胞数均明显多于对照组, 差异均有统计学意义 (*t* 值分别为 13.7、16.7, 均 *P* < 0.05), 见图 1D(见本期封二)。

2. SIRT1 参与 LPS 诱导大鼠小胶质细胞活化: qRT-PCR 及 Western blot 检测小胶质细胞中 SIRT1 表达的结果显示(图 2A~2C), LPS 组 SIRT1 表达水平显著低于 Mock 组(均 *P* < 0.05), 与大鼠大脑海马组织中结果一致。Western blot 及免疫荧光检测小胶质细胞活化标志物 Iba1 表达的结果显示, LPS 组 Iba1 蛋白表达水平显著高于 Mock 组 (*P* < 0.05), LPS 组 Iba1 的免疫荧光强度 [(58.7 ± 3.0) × 10<sup>5</sup>] 显著高于 Mock 组 [(15.7 ± 0.9) × 10<sup>5</sup>] [图 2D、2E、2F(见本期封二)], 提示 LPS 可以有效诱导小胶质细胞活化。

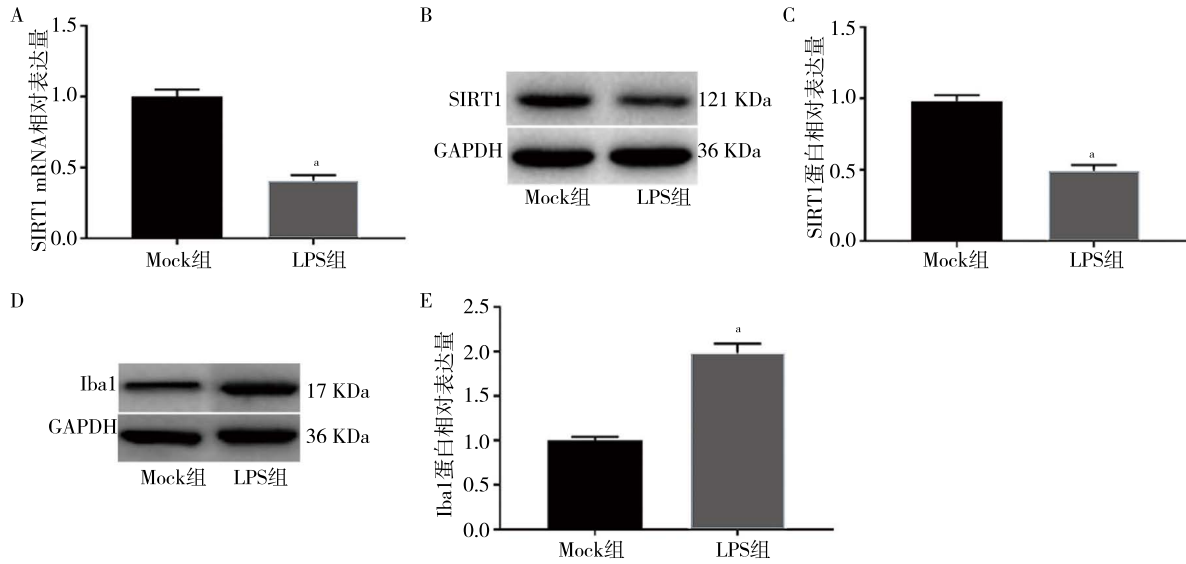
3. SIRT1 抑制小胶质细胞炎症因子的分泌: 见表 2。结果显示, 与 LPS 组和 LPS+pcDNA-NC 组比较, LPS+pcDNA-SIRT1 组大鼠中 IL-1 β、IL-6 和 TNF-α 表达水平显著降低(均 *P* < 0.05); 与 LPS 组和 LPS+si-NC 组比较, LPS+si-SIRT1 组大鼠中 IL-1 β、IL-6 和 TNF-α 表达水平显著升高(均 *P* < 0.05)。

4. SIRT1 抑制小胶质 NF-κ B 通路活性: qRT-PCR 检测 NF-κ B 在小胶质细胞内的表达, 结果显示(图 3A), 与 LPS 组和 LPS+pcDNA-NC 组比较, LPS+pcDNA-SIRT1 组大鼠小胶质细胞内 NF-κ B 活化入核减少 (*P* < 0.05); 与 LPS 组和 LPS+si-NC 组比较, LPS+si-SIRT1 组大鼠小胶质细胞内 NF-κ B 活化入核显著增加 (*P* < 0.05)。进一步采用 Western blot 检测 NF-κ B 通路关键蛋白(NF-κ B p65 和 Iκ B α) 的表达水平, 结果显示(图 3B、3C), 与 LPS 组和 LPS+pcDNA-NC 组比较, LPS+pcDNA-SIRT1 组 NF-κ B p65 的蛋白表达水平显著降低 (*P* < 0.05), 而



注: 1A qRT-PCR 检测各组大鼠海马区 SIRT1 mRNA 表达水平, 示癫痫组明显低于对照组; 1B Western blot 检测 Iba1 蛋白电泳图, 示癫痫组 Iba1 蛋白表达明显高于对照组; 1C Western blot 检测各组癫痫大鼠海马区 Iba1 蛋白表达水平, 示癫痫组明显高于对照组; SIRT1 沉默信息调节因子 1; Iba1 小胶质细胞/巨噬细胞特异性蛋白; GAPDH 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; qRT-PCR 实时荧光定量多聚酶链反应; 与 Control 组比较, \**P* < 0.05

图 1 SIRT1 在癫痫大鼠海马区的小胶质细胞活化过程中低表达



注: 2A 小胶质细胞 SIRT1 mRNA 水平表达, 示 LPS 组明显低于 Mock 组; 2B Western blot 检测小胶质细胞 SIRT1 蛋白电泳图, 示 LPS 组 SIRT1 蛋白表达明显低于 Mock 组; 2C Western blot 检测小胶质细胞 SIRT1 蛋白水平表达, 示 LPS 组明显低于 Mock 组; 2D Western blot 检测小胶质细胞 Iba1 蛋白电泳图, 示 LPS 组明显高于 Mock 组; 2E Western blot 检测小胶质细胞 Iba1 蛋白表达水平, 示 LPS 组明显高于 Mock 组; LPS 脂多糖; SIRT1 沉默信息调节因子 1; GAPDH 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; Iba1 小胶质细胞/巨噬细胞特异性蛋白; Mock 组 空白对照组, LPS 组 LPS 模型组; 与 Mock 组比较,  $^*P < 0.05$

图 2 SIRT1 在 LPS 诱导大鼠小胶质细胞活化中低表达

表 2 各组小胶质细胞炎症因子表达水平比较 (ng/L,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组别	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$
LPS 组	74.8 $\pm$ 3.8	85.3 $\pm$ 4.1	95.2 $\pm$ 4.0
LPS+pcDNA-NC 组	80.0 $\pm$ 4.5	88.3 $\pm$ 4.4	92.3 $\pm$ 4.5
LPS+pcDNA-SIRT1 组	50.0 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	55.0 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup>	56.1 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>
LPS+si-NC 组	78.1 $\pm$ 3.5	90.1 $\pm$ 3.5	98.1 $\pm$ 3.5
LPS+si-SIRT1 组	98.2 $\pm$ 4.3 <sup>b</sup>	108.1 $\pm$ 4.5 <sup>b</sup>	124.5 $\pm$ 4.1 <sup>b</sup>

注: LPS 为脂多糖; SIRT1 为沉默信息调节因子 1; NC 为阴性对照; 与 LPS 组或 LPS+pcDNA-NC 组比较,  $^*P < 0.05$ ; 与 LPS 组或 LPS+si-NC 组比较,  $^bP < 0.05$

I $\kappa$ B $\alpha$  的表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与 LPS 组和 LPS+si-NC 组相比, LPS+si-SIRT1 组 NF- $\kappa$ B p65 的蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而 I $\kappa$ B $\alpha$  的表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。说明 pcDNA-SIRT1 可以抑制大鼠小胶质 NF- $\kappa$ B 通路活性。加入 NF- $\kappa$ B 通路激活剂 Aconine 后, 与 LPS+pcDNA-SIRT1 组比较, LPS+pcDNA-SIRT1+Aconine 组 NF- $\kappa$ B p65 的蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而 I $\kappa$ B $\alpha$  的表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。

5. SIRT1 通过抑制 NF- $\kappa$ B 通路活性抑制小胶质细胞活化及炎症反应: 结果显示, 与 LPS+pcDNA-SIRT1 组比较, LPS+pcDNA-SIRT1+Aconine 组大鼠中 Iba1 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ , 图 4A, 4B); LPS+pcDNA-SIRT1+Aconine 组大鼠中 IL-1  $\beta$  [(72.2  $\pm$  4.3)ng/L]、IL-6

[(80.1  $\pm$  4.0)ng/L] 和 TNF- $\alpha$  [(87.2  $\pm$  4.5)ng/L] 表达水平显著高于 LPS+pcDNA-SIRT1 组的 IL-1  $\beta$  [(50.1  $\pm$  2.3)ng/L]、IL-6 [(55.0  $\pm$  3.4)ng/L] 和 TNF- $\alpha$  [(56.3  $\pm$  4.9)ng/L] 表达水平 (均  $P < 0.05$ , 图 4C ~ 4E)。

## 讨 论

癫痫是一种常见的神经系统疾病。癫痫的发病机制复杂, 研究表明, 免疫因素与癫痫的发生发展关系密切, 在手术切除的难治性癫痫病人海马组织中, 可检测到大量的小胶质细胞增生和多种炎症因子<sup>[13-14]</sup>。小胶质细胞属于巨噬细胞。小胶质细胞按照其分泌细胞因子主要分为致炎型经典激活 M1 型和抑炎型替代激活的 M2 型。而 M1 型小胶质细胞主要的功能为引发炎症反应, 分泌大量促炎性因子<sup>[15]</sup>。在癫痫状态下, 病灶周围的小胶质细胞迅速被激活, 随后释放一系列的细胞因子, 并可吞噬病原体或细胞碎片、调节突触功能。癫痫发生与小胶质细胞有很强的相关性, 过度活化的小胶质细胞及其分泌的炎症因子在癫痫发生过程中起着重要作用<sup>[16]</sup>。因此, 控制小胶质细胞活化有望成为抗癫痫治疗的切入点。在本研究中, 采用匹罗卡品诱导大鼠 SE 模型, 从中培养小胶质细胞作为炎症模型, 从体内和体外两个层面探讨了 SIRT1 对小胶质细胞介导的炎症反应的影响, 从而阐明 SIRT1 通过抑制小胶质细胞活化及其介导的免疫炎症反应, 从而发挥抗癫痫的作用。

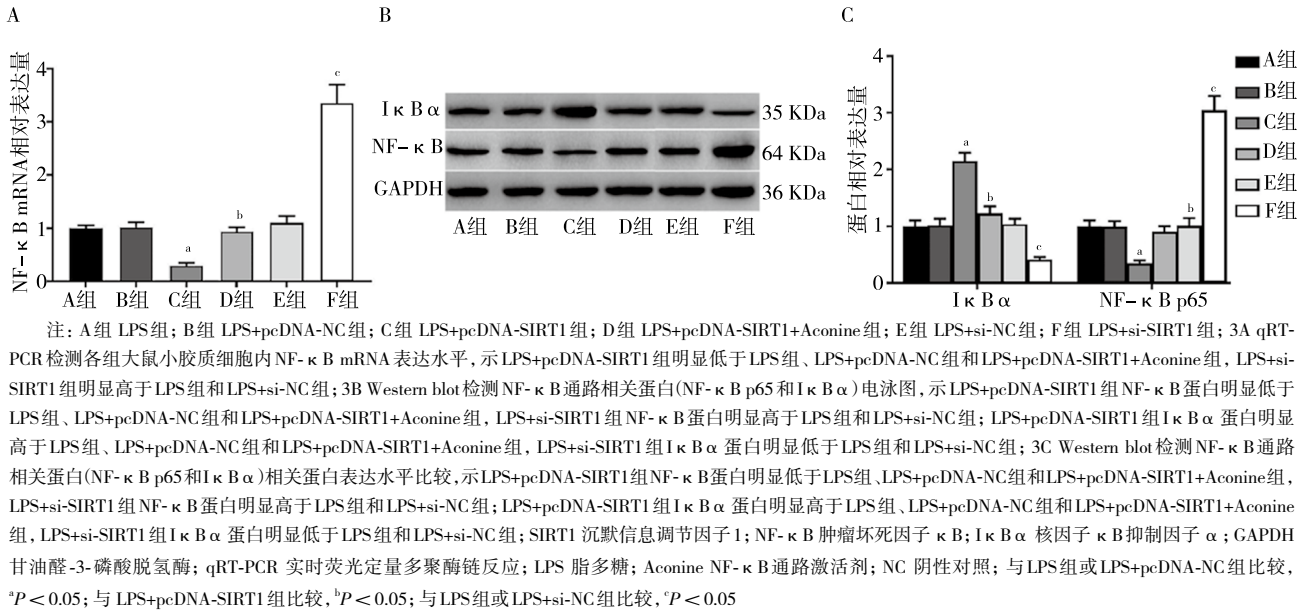


图3 SIRT1抑制大鼠小胶质细胞NF-κB通路活性

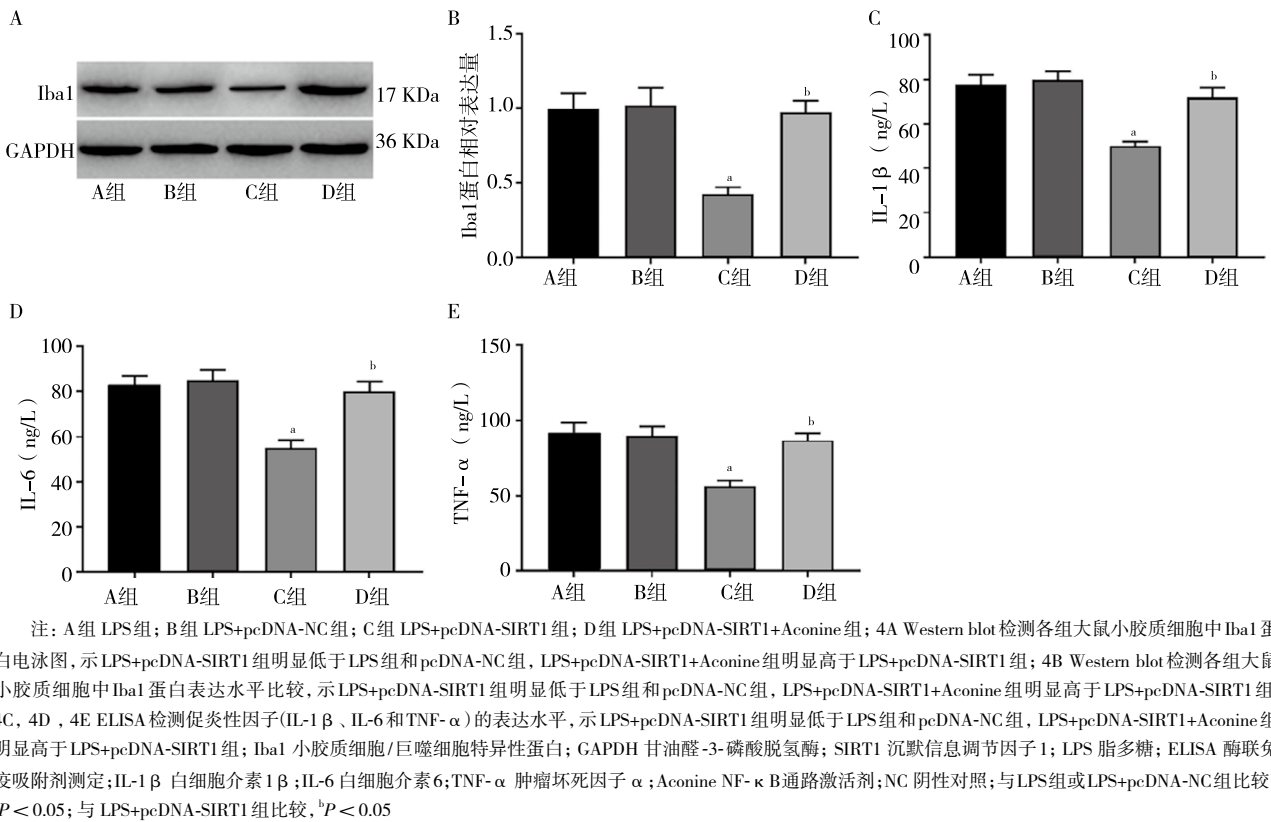


图4 SIRT1通过抑制NF-κB通路活性抑制小胶质细胞活化及炎症反应

癫痫动物模型诱导主要分为电刺激点燃法和药物点燃法, 以匹罗卡品、海人酸、马桑内酯和青霉素等药品诱导更常用, 而匹罗卡品癫痫模型是目前国际上比较公认的一种造模方法, 与人类慢性癫痫发作较为相似<sup>[17]</sup>。本研究中, 构建匹罗卡品诱导大鼠癫痫模型, 检测发现癫痫组大鼠Racine分级高于IV

级, 癫痫发作频率为(13.5 ± 1.12)次/d, 发作潜伏期为(16.7 ± 1.5)min; 小胶质细胞的活化标志物(Iba1)蛋白高表达; Iba1表达量及阳性细胞数显著增加, 免疫组化观察到大鼠海马区小胶质细胞阳性细胞数目增加, 说明氯化锂-匹罗卡品致癫痫并且使大鼠小胶质细胞活化。

研究表明,癫痫发作后脑区出现明显的炎症反应, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-6等多种细胞因子迅速上调; IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 在癫痫小胶质细胞和星形胶质细胞中增加<sup>[18]</sup>。本研究中,通过qRT-PCR检测,证实了SIRT1在SE大鼠海马组织中的表达下调。进一步采用脑室注射pcDNA-SIRT1和si-SIRT1后发现, si-SIRT1注射后使得小胶质细胞特异性标志物Iba1的蛋白表达增加,炎症因子IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 的表达升高; SIRT1过表达使得小胶质细胞特异性标志物Iba1的蛋白表达水平和炎症因子IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 的水平降低。IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 是促炎因子,以上两者的研究说明, si-SIRT1注射后小胶质细胞活化,即SIRT1有助于抑制小胶质细胞活化。

NF- $\kappa$ B是调控多个炎症相关基因的重要核转录因子,在调节炎症反应的过程中发挥了核心作用。有研究表明, NF- $\kappa$ B通路存在于神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞等多种类型的细胞中<sup>[19]</sup>。在慢性颞叶癫痫患者的脑组织标本中,观察到小胶质细胞及活化NF- $\kappa$ B的过度表达<sup>[20]</sup>。而后在癫痫实验动物模型中又发现小胶质细胞NF- $\kappa$ B信号通路的激活,并伴有炎症因子IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及其受体的高表达<sup>[21]</sup>,这些研究证实癫痫发病过程中存在NF- $\kappa$ B通路的激活。

SIRT1是去乙酰化酶家族中的一员,与酵母染色质沉默因子Sir2是同源体,在哺乳动物组织中广泛表达。有研究显示, SIRT1激活能使NF- $\kappa$ B的RelA/p65亚单位去乙酰化,抑制NF- $\kappa$ B的转录活性,在炎症损伤中起保护作用<sup>[8, 22]</sup>。SIRT1在心脏、肾脏和阿尔茨海默病模型中的保护作用的研究已经非常广泛<sup>[23-24]</sup>。而Wang等<sup>[25]</sup>研究发现, miR-199a-5p的沉默对大鼠具有抑制癫痫发作的作用, SIRT1是miR-199a-5p在大鼠海马中的直接靶点,并通过上调SIRT1来保护神经元免受损伤。然而,在癫痫中SIRT1和小胶质细胞活化及NF- $\kappa$ B信号通路之间的连接尚未得到探索。

本研究中对于SIRT1对NF- $\kappa$ B信号通路的影响,研究表明, si-SIRT1有助于促进小胶质细胞NF- $\kappa$ B的入核,促进NF- $\kappa$ B p65的蛋白表达,抑制I $\kappa$ B $\alpha$ 的蛋白表达; SIRT1过表达可以抑制小胶质细胞NF- $\kappa$ B的入核,抑制NF- $\kappa$ B p65的蛋白表达,促进I $\kappa$ B $\alpha$ 的蛋白表达。结果证实了SIRT1抑制NF- $\kappa$ B的转录活性。此外, Aconine具有抑制NF- $\kappa$ B通路活性的作用<sup>[26]</sup>,本研究中通过Aconine

与pcDNA-SIRT1的共同作用,发现SIRT1通过NF- $\kappa$ B通路活性来调控癫痫大鼠小胶质细胞活化及炎症因子的作用。总之,本研究结果证实SIRT1在癫痫中发挥作用, SIRT1可以通过抑制NF- $\kappa$ B通路活性来调控癫痫小胶质细胞的活化及炎症因子的分泌。SIRT1可作为预防和治疗癫痫发作和癫痫损伤的潜在靶点,而具体的调节机制有待于继续深入研究。

**利益冲突** 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

**作者贡献声明** 试验设计为叶子、马宝君、张毅; 研究实施、资料收集为叶子、王学建、陈振华、蔡骥; 论文撰写为叶子, 论文修订为叶子、马宝君审校

## 参 考 文 献

- [1] 杨华俊, 郭安臣, 王群. 癫痫的发病机制研究进展[J]. 科技导报, 2017, 35(4): 54-59. DOI: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.04.009. Yang HJ, Guo AC, Wang Q. Advances in pathogenesis of epilepsy[J]. Sci Technol Rev, 2017, 35(4): 54-59.
- [2] 张赞, 郑辑英, 李光来, 等. 癫痫发病机制研究的进展与脑损伤机制[J/OL]. 中华临床医师杂志(电子版), 2016, 10(8): 1168-1171. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2016.08.027. Zhang B, Zheng JY, Li GL, et al. Research progress on the mechanism of epilepsy and brain damage mechanism[J/OL]. Chin J Clinicians(Electronic Edition), 2016, 10(8): 1168-1171.
- [3] Zheng W, Qi X, Lei Z, et al. Protective effect of resveratrol against kainate-induced temporal lobe epilepsy in rats[J]. Neurochem Res, 2009, 34(8): 1393-1400. DOI: 10.1007/s11064-009-9920-0.
- [4] Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain[J]. Neuroscience, 1992, 48(2): 405-415. DOI: 10.1016/0306-4522(92)90500-2.
- [5] Huizinga R, van der Star BJ, Kipp M, et al. Phagocytosis of neuronal debris by microglia is associated with neuronal damage in multiple sclerosis[J]. Glia, 2012, 60(3): 422-431. DOI: 10.1002/glia.22276.
- [6] Hughes V. Microglia: the constant gardeners[J]. Nature, 2012, 485(7400): 570-572. DOI: 10.1038/485570a.
- [7] Xing XK, Rui W, Xiao JL, et al. Function of SIRT1 in physiology[J]. Biochemistry (Mosc), 2009, 74(7): 703-708. DOI: 10.1134/S0006297909070013.
- [8] Yu JJ, Jung EL, Ae SL, et al. SIRT1 overexpression decreases cisplatin-induced acetylation of NF- $\kappa$ B p65 subunit and cytotoxicity in renal proximal tubule cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 419(2): 206-210. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.148.
- [9] Chen J, Zhou YG, Mueller-Steiner S, et al. SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappa B signaling[J]. J Biol Chem, 2005, 280(48): 40364-40374. DOI: 10.1074/jbc.M509329200.
- [10] Wang SJ, Zhao XH, Chen W, et al. Sirtuin 1 activation enhances the PGC-1 $\alpha$ /mitochondrial antioxidant system pathway in status epilepticus[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(1): 521-526. DOI: 10.3892/mmr.2014.2724.
- [11] Han CL, Ge M, Liu YP, et al. LncRNA H19 contributes to

- hippocampal glial cell activation via JAK/STAT signaling in a rat model of temporal lobe epilepsy[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 103. DOI: 10.1186/s12974-018-1139-z.
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [13] Freeman LC, Ting JP. The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases[J]. *J Neurochem*, 2016, 136(1): 29-38. DOI: 10.1111/jnc.13217.
- [14] Terrone G, Salamone A, Vezzani A. Inflammation and epilepsy: preclinical findings and potential clinical translation[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(37): 5569-5576. DOI: 10.2174/1381612823666170926113754.
- [15] Zhou T, Huang Z, Sun XW, et al. Microglia polarization with M1/M2 phenotype changes in rd1 mouse model of retinal degeneration[J]. *Front Neuroanat*, 2017, 9(11): 77. DOI: 10.3389/fnana.2017.00077.
- [16] 宋维强, 林志国. 小胶质细胞与癫痫的关系研究进展[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2019, 24(5): 314-316. DOI: 10.13798/j.issn.1009-153X.2019.05.021.
- Song WQ, Lin ZG. Research progress on relationship between microglia and epilepsy[J]. *Chin J Clin Neurosurg*, 2019, 24(5): 314-316.
- [17] Curia G, Longo D, Biagini G, et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy[J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 172(2): 143-157. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2008.04.019.
- [18] Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarker candidates in epilepsy[J]. *Nat Rev Neurol*, 2018, 44(1): 91-111. DOI: 10.1111/nan.12444.
- [19] 张金波, 张春斌, 王淑秋, 等. 灵芝多糖对戊四氮活化海马神经细胞NF- $\kappa$ B变化的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(2): 379-381. DOI: 10.3321/j.issn: 1000-4718.2008.02.037.
- Zhang JB, Zhang CB, Wang SQ, et al. The effect of ganoderma lucidum polysaccharides on the activation of NF- $\kappa$ B in hippocampal neuron by pentyleneferazol[J]. *Chin J Pathophys*, 2008, 24(2): 379-381.
- [20] Vitaliti G, Pavone P, Mahmood F, et al. Targeting inflammation as a therapeutic strategy for drug-resistant epilepsies: an update of new immune-modulating approaches[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2014, 10(4): 868-875. DOI: 10.4161/hv.28400.
- [21] Cho IH, Hong J, Suh EC, et al. Role of microglial IKKbeta in kainic acid-induced hippocampal neuronal cell death[J]. *Brain*, 2008, 131(11): 3019-3033. DOI: 10.1093/brain/awn230.
- [22] 杜月光, 柴科夫, 章科娜, 等. SIRT1通过降低NF- $\kappa$ Bp65乙酰化减轻高糖应激引起的大鼠肾小球系膜细胞损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(4): 664-669. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2014.04.016.
- Du YG, Chai KF, Zhang KN, et al. Protective effect of SIRT1 on rat mesangial cells by decreasing high glucose-induced acetylation of NF- $\kappa$ B p65 [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2014, 30(4): 664-669.
- [23] Pillai VB, Sundaresan NR, Gupta MP. Regulation of Akt signaling by sirtuins: its implication in cardiac hypertrophy and aging[J]. *Circ Res*, 2014, 114(2): 368-378. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300536.
- [24] Bonda DJ, Hyoung-gon L, Antoni C, et al. The sirtuin pathway in ageing and Alzheimer disease: mechanistic and therapeutic considerations[J]. *Lancet Neurol*, 2011, 10(3): 275-279. DOI: 10.1016/S1474-4422(11)70013-8.
- [25] Wang D, Li Z, Zhang Y, et al. Targeting of microRNA-199a-5p protects against pilocarpine-induced status epilepticus and seizure damage via SIRT1-p53 cascade[J]. *Epilepsia*, 2016, 57(5): 706-716. DOI: 10.1111/epi.13348.
- [26] Zeng XZ. Aconine inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation in RAW264.7 cells by suppressing NF-kappaB and NFATc1 activation and DC-STAMP expression[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(2): 255-263. DOI: 10.1038/aps.2015.85.

(收稿日期: 2019-11-11)

(本文编辑: 赵金鑫)

· 消息 ·

## 《神经疾病与精神卫生》杂志在线采编系统启用公告

为了更好地服务于广大读者、作者及审稿专家,方便查询论文信息、投稿、询稿及审稿,提高杂志工作效率,《神经疾病与精神卫生》编辑部已开通期刊采编系统。系统入口位于我刊官方网站(www.ndmh.com)首页。作者投稿,请首先在本刊网站在线注册账号,以该账号登录稿件采编系统投稿,并可随时了解稿件编审进度。如您在操作中碰到任何问题,请与编辑部联系(010-83191160)。

本刊编辑部