

# SIRT1 调控 Nrf2/HO-1 信号通路对脓毒症诱导的急性肺损伤的影响

张怡人<sup>1,2,3</sup> 陈梦晓<sup>1,2,3</sup> 王毅<sup>1,2,3</sup> 李祥<sup>1,2,3</sup> 于湘友<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>新疆医科大学第一附属医院重症医学中心, 乌鲁木齐 830054; <sup>2</sup>新疆医科大学, 乌鲁木齐 830054; <sup>3</sup>新疆医学动物模型研究重点实验室, 乌鲁木齐 830054

通信作者: 于湘友, Email: yu2796@163.com

**【摘要】目的** 探讨沉默信息调节子1(SIRT1)能否调控核因子E2相关因子2/血红素加氧酶-1(Nrf2/HO-1)信号通路,以及在脓毒症大鼠急性肺损伤(ALI)中的作用。**方法** 将24只雄性SD大鼠按随机数字表法分为假手术组(Sham组)、盲肠结扎穿孔术(CLP)致脓毒症模型组(CLP组)、脓毒症+SIRT1特异性激动剂组(CLP+SRT1720组,术前2h腹腔注射SRT1720 10 mg/kg)、脓毒症+SIRT1特异性抑制剂组(CLP+EX527组,术前2h腹腔注射EX527 10 mg/kg),每组6只。制模后24h处死大鼠取肺组织,并进行肺组织病理评分(Smith评分),检测肺组织超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL-6、IL-1 $\beta$ )以及SIRT1、Nrf2、HO-1的mRNA和蛋白表达。**结果** 与Sham组相比,CLP组肺泡结构受损、肺泡间隔增宽、炎症细胞浸润、肺毛细血管充血,Smith评分显著升高;肺组织炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 水平均明显升高,SOD活性及GSH含量降低,MDA及8-OHdG含量升高;肺组织SIRT1、Nrf2和HO-1的mRNA及蛋白表达降低。使用SIRT1特异性激动剂后,CLP+SRT1720组较CLP组肺组织损伤得到明显缓解,Smith评分及肺组织TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 水平明显下降[Smith评分(分): $2.83 \pm 0.75$ 比 $5.67 \pm 0.52$ , TNF- $\alpha$  (ng/L): $36.78 \pm 5.36$ 比 $66.99 \pm 5.44$ , IL-6 (ng/L): $23.97 \pm 3.76$ 比 $45.70 \pm 4.16$ , IL-1 $\beta$  (ng/L): $16.76 \pm 1.39$ 比 $39.64 \pm 2.59$ ,均 $P < 0.05$ ],SOD活性及GSH含量升高[SOD(kU/g): $115.88 \pm 3.31$ 比 $101.65 \pm 1.09$ ,GSH( $\mu$ mol/g): $8.42 \pm 0.81$ 比 $5.74 \pm 0.46$ ,均 $P < 0.05$ ],MDA及8-OHdG含量降低[MDA( $\mu$ mol/g): $5.24 \pm 0.33$ 比 $9.86 \pm 0.66$ ,8-OHdG (ng/L): $405.76 \pm 8.54$ 比 $647.12 \pm 10.64$ ,均 $P < 0.05$ ],肺组织SIRT1、Nrf2和HO-1的mRNA及蛋白表达明显升高[SIRT1 mRNA( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ): $1.49 \pm 0.15$ 比 $0.64 \pm 0.03$ ,Nrf2 mRNA( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ): $1.19 \pm 0.08$ 比 $0.84 \pm 0.02$ ,HO-1 mRNA( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ): $1.80 \pm 0.41$ 比 $0.64 \pm 0.11$ ,SIRT1蛋白(SIRT1/ $\beta$ -actin): $1.03 \pm 0.06$ 比 $0.52 \pm 0.05$ ,Nrf2蛋白(Nrf2/ $\beta$ -actin): $1.14 \pm 0.10$ 比 $0.63 \pm 0.05$ ,HO-1蛋白(HO-1/ $\beta$ -actin): $1.01 \pm 0.11$ 比 $0.73 \pm 0.03$ ,均 $P < 0.05$ ]。而使用SIRT1特异性抑制剂后,CLP+EX527组较CLP组肺组织损伤明显加重,Smith评分及肺组织TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 水平明显升高[Smith评分(分): $8.00 \pm 0.89$ 比 $5.67 \pm 0.52$ ,TNF- $\alpha$  (ng/L): $87.15 \pm 4.23$ 比 $66.99 \pm 5.44$ ,IL-6 (ng/L): $66.79 \pm 2.93$ 比 $45.70 \pm 4.16$ ,IL-1 $\beta$  (ng/L): $58.99 \pm 2.12$ 比 $39.64 \pm 2.59$ ,均 $P < 0.05$ ],SOD活性及GSH含量降低[SOD(kU/g): $72.84 \pm 3.85$ 比 $101.65 \pm 1.09$ ,GSH( $\mu$ mol/g): $3.30 \pm 0.67$ 比 $5.74 \pm 0.46$ ,均 $P < 0.05$ ],MDA及8-OHdG含量升高[MDA( $\mu$ mol/g): $14.14 \pm 0.70$ 比 $9.86 \pm 0.66$ ,8-OHdG (ng/L): $927.66 \pm 11.47$ 比 $647.12 \pm 10.64$ ,均 $P < 0.05$ ],肺组织SIRT1、Nrf2和HO-1的mRNA及蛋白表达明显降低[SIRT1 mRNA( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ): $0.40 \pm 0.07$ 比 $0.64 \pm 0.03$ ,Nrf2 mRNA( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ): $0.48 \pm 0.07$ 比 $0.84 \pm 0.02$ ,HO-1 mRNA( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ): $0.27 \pm 0.14$ 比 $0.64 \pm 0.11$ ,SIRT1蛋白(SIRT1/ $\beta$ -actin): $0.20 \pm 0.05$ 比 $0.52 \pm 0.05$ ,Nrf2蛋白(Nrf2/ $\beta$ -actin): $0.45 \pm 0.01$ 比 $0.63 \pm 0.05$ ,HO-1蛋白(HO-1/ $\beta$ -actin): $0.36 \pm 0.08$ 比 $0.73 \pm 0.03$ ,均 $P < 0.05$ ]。**结论** 在脓毒症ALI大鼠模型中,可通过激活SIRT1调控Nrf2/HO-1信号通路活化,上调下游抗氧化酶的表达,减少氧化应激损伤,进而减轻脓毒症诱导的ALI。

**【关键词】** 脓毒症; 急性肺损伤; 沉默信息调节子1; 核因子E2相关因子2/血红素加氧酶-1信号通路; 氧化应激

**基金项目:** 国家自然科学基金(82160360);新疆维吾尔自治区科技支疆项目(2021E02064)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220815-00745

## Effect of SIRT1 regulating Nrf2/HO-1 signaling pathway on sepsis-induced acute lung injury

Zhang Yiren<sup>1,2,3</sup>, Chen Mengxiao<sup>1,2,3</sup>, Wang Yi<sup>1,2,3</sup>, Li Xiang<sup>1,2,3</sup>, Yu Xiangyou<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Critical Medicine Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; <sup>2</sup>Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; <sup>3</sup>Xinjiang Key Laboratory of Medical Animal Model Research, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China  
Corresponding author: Yu Xiangyou, Email: yu2796@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate whether silence information regulator 1 (SIRT1) could regulate nuclear factor E2-related factor 2/heme oxygenase 1 (Nrf2/HO-1) signaling pathway and its role in acute lung injury (ALI) in sepsis rats. **Methods** Twenty-four male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham operation group

(Sham group), cecal ligation and puncture (CLP) induced sepsis group (CLP group), sepsis+SIRT1 specific agonist group (CLP+SRT1720 group, 10 mg/kg SRT1720 was intraperitoneally injected 2 hours before CLP), sepsis+SIRT1 specific inhibitor group (CLP+EX527 group, 10 mg/kg EX527 was intraperitoneally injected 2 hours before CLP), with 6 rats in each group. The rats were killed 24 hours after modeling and their lung tissues were taken for pathological score (Smith score), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukins (IL-6, IL-1 $\beta$ ), and SIRT1, Nrf2 and HO-1 mRNA and protein expression were detected. **Results** The lung tissue of the CLP group mice was severely damaged, the alveolar interval was widened and a large number of inflammatory cells infiltrated, and there was visible pulmonary capillary hyperemia. The Smith score, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , MDA and 8-OHdG were significantly increased, the levels of SOD, GSH, SIRT1, Nrf2 and HO-1 were significantly decreased in CLP group. After using SIRT1 specific agonist, the lung injury in CLP+SRT1720 group was significantly alleviated compared with that in CLP group, Smith score and lung tissue TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  levels were significantly decreased [Smith score:  $2.83 \pm 0.75$  vs.  $5.67 \pm 0.52$ , TNF- $\alpha$  (ng/L):  $36.78 \pm 5.36$  vs.  $66.99 \pm 5.44$ , IL-6 (ng/L):  $23.97 \pm 3.76$  vs.  $45.70 \pm 4.16$ , IL-1 $\beta$  (ng/L):  $16.76 \pm 1.39$  vs.  $39.64 \pm 2.59$ , all  $P < 0.05$ ], SOD activity and GSH content increased [SOD (kU/g):  $115.88 \pm 3.31$  vs.  $101.65 \pm 1.09$ , GSH ( $\mu\text{mol/g}$ ):  $8.42 \pm 0.81$  vs.  $5.74 \pm 0.46$ , both  $P < 0.05$ ], MDA and 8-OHdG contents decreased [MDA ( $\mu\text{mol/g}$ ):  $5.24 \pm 0.33$  vs.  $9.86 \pm 0.66$ , 8-OHdG (ng/L):  $405.76 \pm 8.54$  vs.  $647.12 \pm 10.64$ , both  $P < 0.05$ ], the mRNA and protein expressions of SIRT1, Nrf2 and HO-1 were increased [SIRT1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ):  $1.49 \pm 0.15$  vs.  $0.64 \pm 0.03$ , Nrf2 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ):  $1.19 \pm 0.08$  vs.  $0.84 \pm 0.02$ , HO-1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ):  $1.80 \pm 0.41$  vs.  $0.64 \pm 0.11$ , SIRT1 protein (SIRT1/ $\beta$ -actin):  $1.03 \pm 0.06$  vs.  $0.52 \pm 0.05$ , Nrf2 protein (Nrf2/ $\beta$ -actin):  $1.14 \pm 0.10$  vs.  $0.63 \pm 0.05$ , HO-1 protein (HO-1/ $\beta$ -actin):  $1.01 \pm 0.11$  vs.  $0.73 \pm 0.03$ , all  $P < 0.05$ ]. The lung injury in CLP+EX527 group was more severe than that in CLP group, Smith score and lung tissue TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  levels were significantly increased [Smith score:  $8.00 \pm 0.89$  vs.  $5.67 \pm 0.52$ , TNF- $\alpha$  (ng/L):  $87.15 \pm 4.23$  vs.  $66.99 \pm 5.44$ , IL-6 (ng/L):  $66.79 \pm 2.93$  vs.  $45.70 \pm 4.16$ , IL-1 $\beta$  (ng/L):  $58.99 \pm 2.12$  vs.  $39.64 \pm 2.59$ , all  $P < 0.05$ ], SOD activity and GSH content decreased [SOD (kU/g):  $72.84 \pm 3.85$  vs.  $101.65 \pm 1.09$ , GSH ( $\mu\text{mol/g}$ ):  $3.30 \pm 0.67$  vs.  $5.74 \pm 0.46$ , both  $P < 0.05$ ], the contents of MDA and 8-OHdG were increased [MDA ( $\mu\text{mol/g}$ ):  $14.14 \pm 0.70$  vs.  $9.86 \pm 0.66$ , 8-OHdG (ng/L):  $927.66 \pm 11.47$  vs.  $647.12 \pm 10.64$ , both  $P < 0.05$ ], the mRNA and protein expressions of SIRT1, Nrf2 and HO-1 were decreased [SIRT1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ):  $0.40 \pm 0.07$  vs.  $0.64 \pm 0.03$ , Nrf2 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ):  $0.48 \pm 0.07$  vs.  $0.84 \pm 0.02$ , HO-1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ ):  $0.27 \pm 0.14$  vs.  $0.64 \pm 0.11$ , SIRT1 protein (SIRT1/ $\beta$ -actin):  $0.20 \pm 0.05$  vs.  $0.52 \pm 0.05$ , Nrf2 protein (Nrf2/ $\beta$ -actin):  $0.45 \pm 0.01$  vs.  $0.63 \pm 0.05$ , HO-1 protein (HO-1/ $\beta$ -actin):  $0.36 \pm 0.08$  vs.  $0.73 \pm 0.03$ , all  $P < 0.05$ ]. **Conclusions** In the rat model of ALI induced by sepsis, SIRT1 can regulate the activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway, upregulate the expression of downstream antioxidant enzymes, reduce oxidative stress injury, and then alleviate the ALI induced by sepsis in rats.

**【Key words】** Sepsis; Acute lung injury; Silence information regulator 1; Nuclear factor E2-related factor 2/ heme oxygenase 1 signaling pathway; Oxidative stress

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (82160360); Xinjiang Uygur Autonomous Region Science and Technology Support Project of China (2021E02064)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220815-00745

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是指机体在严重感染、创伤等情况下,肺毛细血管内皮细胞及肺泡上皮细胞损伤而造成的非心源性肺水肿<sup>[1]</sup>。研究表明,脓毒症诱导的ALI的病理生理机制包含促炎/抗炎反应失调、过度的炎症反应、氧化应激损伤、细胞因子形成及异常细胞凋亡等一系列复杂的相互作用<sup>[2]</sup>,其中早期的氧化应激是脓毒症ALI的主要诱因<sup>[3]</sup>。核因子E2相关因子2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)是CNC转录因子的家族成员,在调节细胞的抗氧化防御和抑制氧化应激等方面发挥重要作用<sup>[4]</sup>。沉默信息调节子1(silent information regulator 1, SIRT1)是一种去乙酰化酶,表达于多种组织细胞,主要通过去乙酰化作用调节靶蛋白活性,具有抵抗氧化应激及减轻细胞的炎症刺激、衰老和凋亡等作用<sup>[5]</sup>。有研究表明,Nrf2是SIRT1信号转导的重要下游靶点<sup>[6]</sup>,SIRT1可以促

进Nrf2的活化,增加其转录活性<sup>[7]</sup>,并上调血红素加氧酶-1(heme oxygenase 1, HO-1)的表达<sup>[8]</sup>。基于此,本研究通过建立脓毒症ALI大鼠模型,探讨能否通过激活或抑制SIRT1调控Nrf2/HO-1信号通路,减少氧化应激损伤,进而改善脓毒症诱导的ALI。

## 1 材料与方法

**1.1 主要实验材料:** 8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(interleukins, IL-6, IL-1 $\beta$ )、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)检测试剂盒(上海江莱生物科技有限公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutas, SOD)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所);SIRT1抗体(美国Cell Signaling Technology公司);Nrf2、HO-1和 $\beta$ -肌动蛋白

( $\beta$ -actin) 抗体(武汉 Proteintech 公司); BCA 蛋白定量分析试剂盒(中国 Thermo Fisher Scientificals 公司); SIRT1 激动剂、SIRT1 抑制剂(美国 Med Chem Express 公司); SIRT1、Nrf2、HO-1 和  $\beta$ -actin 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR) 上下游引物(上海生工生物工程有限公司)。

**1.2 实验动物:** 选择 24 只 7~8 周龄健康成年雄性 SD 大鼠, 体质量 180~220 g, 由新疆医科大学动物实验中心提供, 动物许可证号: SCXK(新)2018-0001。大鼠在恒温(22~24 °C)、12 h 光照/黑暗周期环境的动物房标准饲料喂养 3 d 后开始实验, 实验前禁食 8 h。研究方案符合动物伦理学规定, 并得到新疆医科大学实验动物伦理委员会的审批(审批号: IACUC-20220728-09)。

**1.3 实验分组及模型制备:** 按随机数字表法将动物分为假手术组(Sham 组)、盲肠结扎穿孔术(cecal ligation and puncture, CLP) 致脓毒症组(CLP 组)、脓毒症+SIRT1 特异性激动剂组(CLP+SRT1720 组)、脓毒症+SIRT1 特异性抑制剂组(CLP+EX527 组) 4 组, 每组 6 只。CLP 法制备大鼠脓毒症模型: 大鼠麻醉后开腹, 寻找盲肠末端, 用无菌 4 号线进行结扎, 14 G 针头贯穿盲肠, 挤出粪便及肠内容物后回纳腹腔, 关腹。Sham 组仅进行开腹和关腹操作。CLP+SRT1720 组、CLP+EX527 组于制模前 2 h 分别腹腔注射 10 mg/kg SRT1720 和 10 mg/kg EX527(均以 1.25 g/L 溶于 10% 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)+90% 生理盐水中), 同时 Sham 组和 CLP 组腹腔注射 10% DMSO+90% 生理盐水。术毕所有大鼠立即皮下给予等量生理盐水进行复苏。

**1.4 检测指标和方法:** 制模后 24 h, 取大鼠右肺组织于 -80 °C 保存, 用于实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)、蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)、ELISA 检测; 取左肺组织于 4% 多聚甲醛中浸泡, 用于苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE) 染色。  
**1.4.1 病理学观察:** 取左肺组织进行石蜡包埋和切片, HE 染色后, 光镜下观察肺组织病理改变并进行病理评分(Smith 评分)。

**1.4.2 氧化应激因子水平测定:** 取右肺组织, 称重后按 1:9 的比例加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS), 剪碎、离心, 制备成 10% 匀浆上清液; 按试剂盒说明书步骤测定 SOD、GSH、MDA、8-OHdG 吸光度(A) 值, 然后计算其含量。

**1.4.3 ELISA 测定炎症因子水平:** 取肺组织匀浆上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书步骤测定 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  含量。

**1.4.4 RT-qPCR:** 取右肺组织, 提取总 RNA, 反转录合成 cDNA 后扩增并进行 qPCR。qPCR 反应程序: 95 °C 2 min, 95 °C 5 s, 60 °C 10 s, 循环 40 次。用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 SIRT1、Nrf2 和 HO-1 的 mRNA 表达量。

**1.4.5 Western blotting:** 取右肺组织 50  $\mu$ g, 加入 RIPA 裂解液研磨后置于离心管中, 冰上裂解后测定蛋白浓度, 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移到聚偏二氟乙烯膜上; 经 5% 脱脂牛奶在室温下封闭 2 h, 与  $\beta$ -actin(1:5000)、SIRT1(1:1000)、Nrf2(1:2000)、HO-1(1:3000) 特异性一抗在 4 °C 孵育过夜; 次日用 TBST 缓冲液洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5000), 室温孵育 2 h, 洗膜后加入免疫荧光发光液显影, 用 Image J 软件分析图像, 目标蛋白相对表达量以目标蛋白条带灰度值与内参  $\beta$ -actin 蛋白条带灰度值的比值表示。

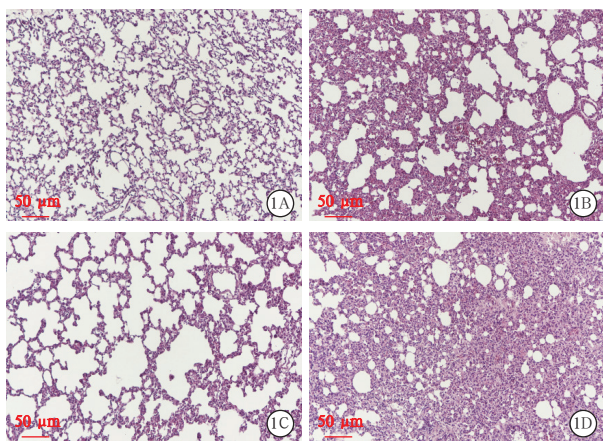
**1.5 统计学分析:** 用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 9.0 软件分析处理数据。计量资料呈正态分布, 数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

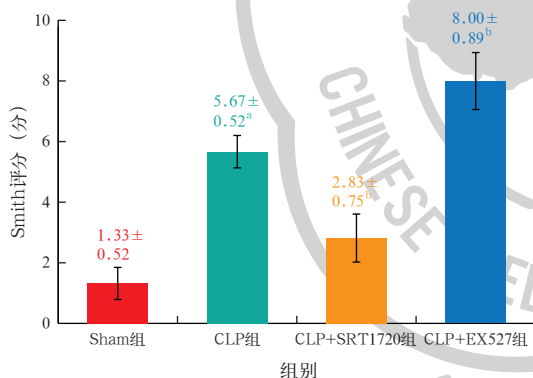
**2.1 肺组织病理学观察(图 1~2):** 制模后 24 h, CLP 组肺泡结构受损, 肺不张, 可见炎症细胞浸润; Smith 评分显著高于 Sham 组( $P < 0.05$ )。CLP+SRT1720 组肺组织损伤程度较 CLP 组减轻; Smith 评分显著低于 CLP 组( $P < 0.05$ )。CLP+EX527 组肺组织损伤程度较 CLP 组严重; Smith 评分显著高于 CLP 组( $P < 0.05$ )。

**2.2 肺组织炎症因子水平(表 1):** 与 Sham 组相比, CLP 组肺组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平均明显升高(均  $P < 0.05$ )。与 CLP 组相比, CLP+SRT1720 组肺组织 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平均明显降低(均  $P < 0.05$ ), 而 CLP+EX527 组肺组织 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平均明显升高(均  $P < 0.05$ )。

**2.3 肺组织氧化应激因子水平(表 2):** 与 Sham 组相比, CLP 组肺组织 SOD、GSH 明显降低, MDA、8-OHdG 明显升高(均  $P < 0.05$ )。与 CLP 组相比, CLP+SRT1720 组肺组织 SOD、GSH 明显升高, MDA、8-OHdG 明显降低(均  $P < 0.05$ ); 而 CLP+EX527 组肺组织 SOD、GSH 明显降低, MDA、8-OHdG 明显升高(均  $P < 0.05$ )。

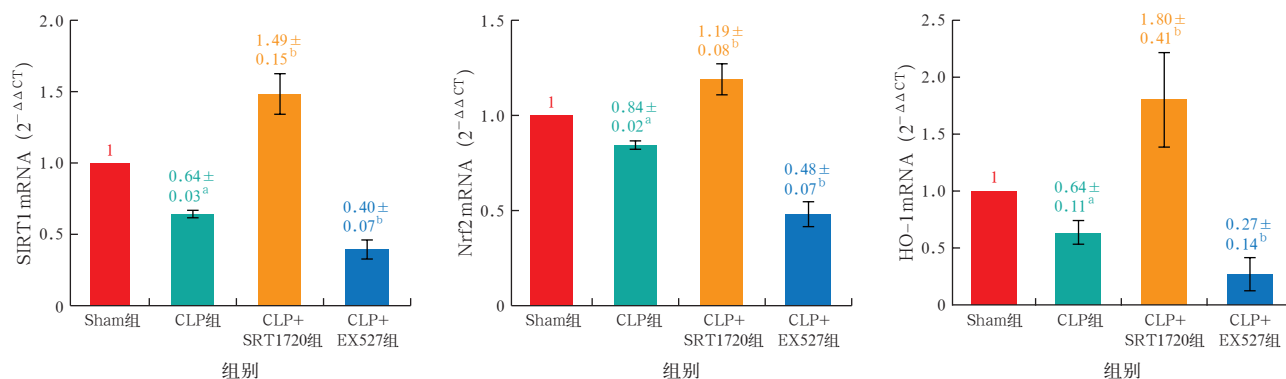


**图1** 光镜下观察各组大鼠肺组织病理学改变 假手术组(Sham组, A)肺泡结构完整且间隔正常,肺泡腔及间质未见明显炎症细胞渗出和水肿;盲肠结扎穿孔术致脓毒症组(CLP组, B)肺泡结构受损,可见肺泡壁增厚、肺泡腔塌缩,肺毛细血管充血,间质可见炎症细胞浸润伴肺水肿;脓毒症+沉默信息调节因子1(SIRT1)特异性激动剂组(CLP+SRT1720组, C)肺泡结构相对完整,肺间质红细胞和炎症细胞渗出较CLP组明显减轻,肺泡间隔增厚和肺间质水肿有所改善;脓毒症+SIRT1特异性抑制剂组(CLP+EX527组, D)肺泡结构基本消失,肺泡腔塌缩明显,肺泡壁增厚伴有透明膜形成,肺泡腔内少量出血,间质可见大量炎症细胞浸润并伴有肺水肿 苏木素-伊红(HE)染色 低倍放大



注: Sham为假手术, CLP为盲肠结扎穿孔术, SRT1720为沉默信息调节因子1(SIRT1)特异性激动剂, EX527为SIRT1特异性抑制剂;与Sham组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05; 与CLP组比较, <sup>b</sup>*P*<0.05

**图2 各组大鼠肺组织病理评分比较**



注: Sham为假手术, CLP为盲肠结扎穿孔术, SRT1720为沉默信息调节因子1(SIRT1)特异性激动剂, EX527为SIRT1特异性抑制剂; Nrf2为核因子E2相关因子2, HO-1为血红素加氧酶-1; 与Sham组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05; 与CLP组比较, <sup>b</sup>*P*<0.05

**图3 各组大鼠肺组织中SIRT1、Nrf2和HO-1的mRNA表达比较**

**表1 各组大鼠肺组织炎症因子水平比较(̄x ± s)**

组别	动物数(只)	TNF-α (ng/L)	IL-6 (ng/L)	IL-1β (ng/L)
Sham组	6	12.18 ± 2.41	10.84 ± 1.24	8.18 ± 0.40
CLP组	6	66.99 ± 5.44 <sup>a</sup>	45.70 ± 4.16 <sup>a</sup>	39.64 ± 2.59 <sup>a</sup>
CLP+SRT1720组	6	36.78 ± 5.36 <sup>b</sup>	23.97 ± 3.76 <sup>b</sup>	16.76 ± 1.39 <sup>b</sup>
CLP+EX527组	6	87.15 ± 4.23 <sup>b</sup>	66.79 ± 2.93 <sup>b</sup>	58.99 ± 2.12 <sup>b</sup>

注: Sham为假手术, CLP为盲肠结扎穿孔术, SRT1720为沉默信息调节因子1(SIRT1)特异性激动剂, EX527为SIRT1特异性抑制剂; TNF-α为肿瘤坏死因子-α, IL-6为白细胞介素-6, IL-1β为白细胞介素-1β; 与Sham组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05; 与CLP组比较, <sup>b</sup>*P*<0.05

**表2 各组大鼠肺组织氧化应激因子水平比较(̄x ± s)**

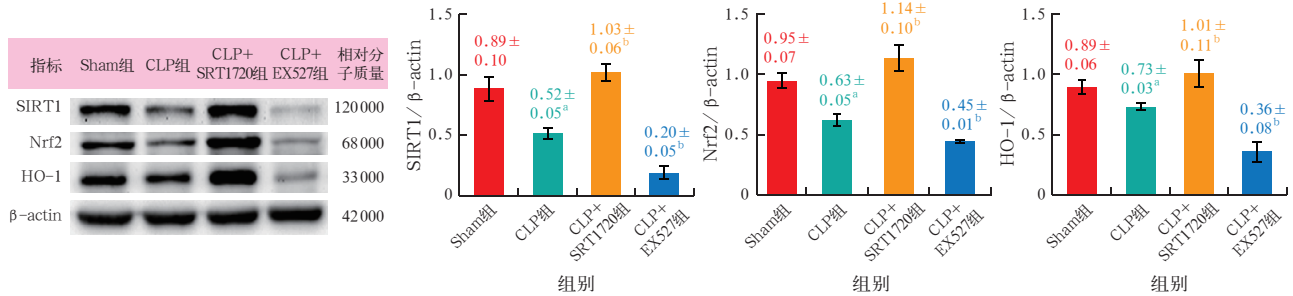
组别	动物数(只)	SOD (kU/g)	GSH (μmol/g)
Sham组	6	133.31 ± 3.19	12.99 ± 0.99
CLP组	6	101.65 ± 1.09 <sup>a</sup>	5.74 ± 0.46 <sup>a</sup>
CLP+SRT1720组	6	115.88 ± 3.31 <sup>b</sup>	8.42 ± 0.81 <sup>b</sup>
CLP+EX527组	6	72.84 ± 3.85 <sup>b</sup>	3.30 ± 0.67 <sup>b</sup>

组别	动物数(只)	MDA (μmol/g)	8-OHdG (ng/L)
Sham组	6	2.00 ± 0.09	213.80 ± 10.91
CLP组	6	9.86 ± 0.66 <sup>a</sup>	647.12 ± 10.64 <sup>a</sup>
CLP+SRT1720组	6	5.24 ± 0.33 <sup>b</sup>	405.76 ± 8.54 <sup>b</sup>
CLP+EX527组	6	14.14 ± 0.70 <sup>b</sup>	927.66 ± 11.47 <sup>b</sup>

注: Sham为假手术, CLP为盲肠结扎穿孔术, SRT1720为沉默信息调节因子1(SIRT1)特异性激动剂, EX527为SIRT1特异性抑制剂; SOD为超氧化物歧化酶, GSH为还原型谷胱甘肽, MDA为丙二醛, 8-OHdG为8-羟基脱氧鸟苷; 与Sham组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05; 与CLP组比较, <sup>b</sup>*P*<0.05

**2.4 肺组织中SIRT1、Nrf2和HO-1的mRNA表达(图3):**与Sham组相比, CLP组肺组织中SIRT1、Nrf2和HO-1的mRNA表达均明显降低(均*P*<0.05)。与CLP组相比较, CLP+SRT1720组SIRT1、Nrf2和HO-1的mRNA表达均显著增高(均*P*<0.05); 而在CLP+EX527组均明显降低(均*P*<0.05)。



Sham 为假手术, CLP 为盲肠结扎穿孔术, SRT1720 为沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 特异性激动剂, EX527 为 SIRT1 特异性抑制剂; Nrf2 为核因子 E2 相关因子 2, HO-1 为血红素加氧酶-1, β-actin 为 β-肌动蛋白; 与 Sham 组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05; 与 CLP 组比较, <sup>b</sup>*P*<0.05

图 4 各组大鼠肺组织中 SIRT1、Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达比较

**2.5 肺组织中 SIRT1、Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达(图 4):** 与 Sham 组相比, CLP 组肺组织中 SIRT1、Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达均明显降低(均 *P*<0.05)。与 CLP 组相比, CLP+SRT1720 组 SIRT1、Nrf2 和 HO-1 的蛋白表达均明显增高(均 *P*<0.05); 而在 CLP+EX527 组均明显降低(均 *P*<0.05)。

### 3 讨论

脓毒症是宿主对感染反应失调而导致危及生命的器官功能障碍综合征<sup>[9]</sup>。全世界脓毒症患者的数量每年达数百万<sup>[9]</sup>。据调查显示,我国脓毒症相关病死率为 67/10 万<sup>[10]</sup>。众所周知,当脓毒症伴多器官功能障碍时,病死率会大大增加<sup>[11]</sup>。肺脏是脓毒症发生时最易受累的靶器官,且脓毒症 ALI 是脓毒症并发器官损伤的常见并发症<sup>[12]</sup>。本研究中采用 CLP 法建立脓毒症大鼠模型,模拟了人体脓毒症发病的病理生理机制,是脓毒症制模的“金标准”<sup>[13]</sup>。本研究显示,制模后 24 h,大鼠出现心率和呼吸频率加快、活动度减少、毛发竖立等表现,同时肺组织内 TNF-α、IL-6、IL-1β 等炎症因子水平升高,提示脓毒症大鼠模型成功建立并伴有 ALI。

正常情况下,肺内氧化/抗氧化反应基本处于动态平衡,而在脓毒症状态下,机体通过氧化应激反应产生了大量的氧化产物,如 MDA、8-OHdG 等。当过量的氧化产物超过肺内抗氧化系统的清除能力后,易破坏细胞的结构与功能、打破肺内的氧化/抗氧化平衡并形成恶性循环,最终损伤肺组织<sup>[14]</sup>。

Nrf2 是机体抗氧化防御系统的主要调节因子,具有高度保守的碱性亮氨酸拉链(leucine zipper bZIP)结构。当机体受到刺激发生氧化应激时,存在于细胞质中的 Nrf2 与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)解耦联并转移至细胞核, bZIP 与小 Maf 蛋白结合形成异源二聚体<sup>[4]</sup>,从而与抗氧化反应元件(antioxidant

response element, ARE)相互作用,启动 ARE 下游的抗氧化酶或促氧化蛋白合成酶等基因的转录与表达,进一步增强细胞对氧化应激的抵抗,并维持机体氧化还原稳态<sup>[15]</sup>。受 Nrf2 调控的靶基因众多,包括 HO-1、SOD 和 GSH 等。SOD 和 GSH 可以反映氧化还原的清除能力,并且减少细胞氧化损伤<sup>[16]</sup>。HO-1 是 Nrf2 调控的下游抗氧化酶之一,是一种主要维持氧化还原稳态的细胞保护酶,可催化血红素分解为铁离子、胆绿素和一氧化碳等<sup>[17]</sup>。有研究表明,激活 Nrf2/HO-1 信号通路可以降低 CLP 致脓毒症大鼠的死亡率,并减轻器官损伤<sup>[18]</sup>。因此,当细胞损伤后, Nrf2 移位至细胞核并促进 HO-1 的表达,介导 HO-1 及其产物协同发挥抗氧化、抗炎等作用并进行防御<sup>[19]</sup>,从而抵抗外界的有害刺激<sup>[20]</sup>。本研究结果支持以上相关结论,证实在脓毒症 ALI 模型中,当 Nrf2/HO-1 信号通路被激活后,氧化应激产物 MDA、8-OHdG 水平降低,抗氧化酶 SOD、GSH 水平增高,炎症因子释放减少,肺组织损伤减轻。

SIRT1 是近年来发现的依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide-adenine dinucleotide, NAD<sup>+</sup>)的去乙酰化酶类,位于细胞核,参与生物过程的各个方面,包括衰老、代谢、氧化还原和炎症反应,并能通过去乙酰化修饰发挥作用<sup>[5]</sup>,进而改变下游转录因子的活性。有研究表明,在 CLP 致脓毒症脑病模型中,脑水肿和神经元凋亡的减轻与 SIRT1 的上调相关<sup>[21]</sup>;当细胞受到刺激时, SIRT1 可以通过去乙酰化作用活化过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助激活因子 1α(peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1α, PGC-1α)<sup>[22]</sup>,进而激活转录因子过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(peroxisome proliferator-activated receptor γ, PPARγ),活化的 PPARγ 通过结合 Nrf2 的启动子区域促进其转录和活化<sup>[23]</sup>,调节氧化产物的清除以及抗氧

化酶的生成,从而增加细胞对氧化应激损伤的抵抗<sup>[24]</sup>。已有研究证实,SIRT1通过调节Nrf2抗氧化途径可以保护百草枯诱导的ALI<sup>[5]</sup>。由此可见,通过增强细胞的抗氧化能力来减少氧化应激损伤可能是减轻脓毒症ALI的有效方法,而Nrf2/HO-1信号通路作为调节氧化应激的关键环节,与CLP诱导的ALI密切相关,且可能是SIRT1发挥作用的重要靶点。本研究显示,在脓毒症ALI状态下,肺组织中SIRT1、Nrf2和HO-1表达减少,氧化应激产物水平升高,炎症因子释放增加;而将SIRT1720和EX527分别作为激动剂和抑制剂在脓毒症ALI模型中进行干预,结果显示,激动SIRT1会促进Nrf2/HO-1信号通路活化,上调Nrf2和HO-1的表达;而抑制SIRT1表达则结果相反,提示调控SIRT1的表达可以激动或抑制Nrf2/HO-1信号通路。且相比CLP组,给予SIRT1激动剂组MDA、8-OHdG,炎症因子水平明显下降,SOD、GSH水平明显升高;而给予SIRT1抑制剂反而会促进MDA、8-OHdG和炎症因子的表达,并抑制SOD、GSH的表达,说明激活SIRT1可以活化Nrf2/HO-1信号通路及其下游的抗氧化酶,减轻氧化应激反应,并有效改善炎症反应。病理结果显示,CLP术后24h会引起肺组织结构与功能损伤;而激活SIRT1可以缓解肺组织结构与功能损伤;抑制SIRT1反而会加重脓毒症所致ALI。

综上所述,本研究提示在脓毒症诱导的ALI状态下,激动SIRT1可以上调Nrf2/HO-1信号通路的表达,降低大鼠肺组织氧化应激水平,抑制炎症反应,减轻肺组织损伤和肺功能障碍,为临床防治脓毒症诱导的ALI提供了理论依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 胡伦阳, 王宝丽, 蒋勇, 等. 脂联素在急性肺损伤中的研究进展[J/CD]. 中华危重症医学杂志(电子版), 2020, 13(1): 66-69. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-6880.2020.01.014.
- [2] Fanelli V, Ranieri VM. Mechanisms and clinical consequences of acute lung injury [J]. Ann Am Thorac Soc, 2015, 12 Suppl 1: S3-S8. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201407-340MG.
- [3] Gill SE, Yamashita CM, Veldhuizen RA. Lung remodeling associated with recovery from acute lung injury [J]. Cell Tissue Res, 2017, 367(3): 495-509. DOI: 10.1007/s00441-016-2521-8.
- [4] Tkachev VO, Menshchikova EB, Zenkov NK. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system [J]. Biochemistry (Mosc), 2011, 76(4): 407-422. DOI: 10.1134/s0006297911040031.
- [5] Ding YW, Zhao GJ, Li XL, et al. SIRT1 exerts protective effects against paraquat-induced injury in mouse type II alveolar epithelial cells by deacetylating NRF2 *in vitro* [J]. Int J Mol Med, 2016, 37(4): 1049-1058. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2503.
- [6] Do MT, Kim HG, Choi JH, et al. Metformin induces microRNA-34a to downregulate the Sirt1/Pgc-1 $\alpha$ /Nrf2 pathway, leading to increased susceptibility of wild-type p53 cancer cells to oxidative stress and therapeutic agents [J]. Free Radic Biol Med, 2014, 74: 21-34. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.010.
- [7] Huang KP, Gao X, Wei WT. The crosstalk between Sirt1 and Keap1/Nrf2/ARE anti-oxidative pathway forms a positive feedback loop to inhibit FN and TGF- $\beta$ 1 expressions in rat glomerular mesangial cells [J]. Exp Cell Res, 2017, 361(1): 63-72. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.09.042.
- [8] Huang KP, Li RM, Wei WT. Sirt1 activation prevents anti-Thy 1.1 mesangial proliferative glomerulonephritis in the rat through the Nrf2/ARE pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 832: 138-144. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.05.017.
- [9] 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. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [10] Weng L, Zeng XY, Yin P, et al. Sepsis-related mortality in China: a descriptive analysis [J]. Intensive Care Med, 2018, 44(7): 1071-1080. DOI: 10.1007/s00134-018-5203-z.
- [11] Kushimoto S, Abe T, Ogura H, et al. Impact of body temperature abnormalities on the implementation of sepsis bundles and outcomes in patients with severe sepsis: a retrospective sub-analysis of the focused outcome research on emergency care for acute respiratory distress syndrome, sepsis and trauma study [J]. Crit Care Med, 2019, 47(5): 691-699. DOI: 10.1097/CCM.0000000000003688.
- [12] Dong AL, Yu Y, Wang YY, et al. Protective effects of hydrogen gas against sepsis-induced acute lung injury via regulation of mitochondrial function and dynamics [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 65: 366-372. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.10.012.
- [13] 何招辉, 朱政, 杨小刚, 等. 雷公藤红素通过抑制Toll样受体4/核转录因子- $\kappa$ B炎症通路减轻脓毒症诱导的大鼠急性肺损伤[J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33(5): 541-545. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210122-00099.
- [14] Liu QM, Ci XX, Wen ZM, et al. Diosmetin alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through activating the Nrf2 pathway and inhibiting the NLRP3 inflammasome [J]. Biomol Ther (Seoul), 2018, 26(2): 157-166. DOI: 10.4062/biomolther.2016.234.
- [15] Baird L, Dinkova-Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway [J]. Arch Toxicol, 2011, 85(4): 241-272. DOI: 10.1007/s00204-011-0674-5.
- [16] Zhang YM, Tao XF, Yin LH, et al. Protective effects of dioscin against cisplatin-induced nephrotoxicity via the microRNA-34a/sirtuin 1 signalling pathway [J]. Br J Pharmacol, 2017, 174(15): 2512-2527. DOI: 10.1111/bph.13862.
- [17] Dai CS, Li B, Zhou Y, et al. Curcumin attenuates quinocetone induced apoptosis and inflammation via the opposite modulation of Nrf2/HO-1 and NF- $\kappa$ B pathway in human hepatocyte L02 cells [J]. Food Chem Toxicol, 2016, 95: 52-63. DOI: 10.1016/j.fct.2016.06.025.
- [18] Wang Y, Wang XF, Zhang LC, et al. Alleviation of acute lung injury in rats with sepsis by resveratrol via the phosphatidylinositol 3-kinase/nuclear factor-erythroid 2 related factor 2/heme oxygenase-1 (PI3K/Nrf2/HO-1) pathway [J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 3604-3611. DOI: 10.12659/MSM.910245.
- [19] Zhang XS, Wu Q, Lu Y, et al. Cerebroprotection by salvianolic acid B after experimental subarachnoid hemorrhage occurs via Nrf2- and SIRT1-dependent pathways [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 124: 504-516. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.035.
- [20] Shi S, Lei SQ, Tang CL, et al. Melatonin attenuates acute kidney ischemia/reperfusion injury in diabetic rats by activation of the SIRT1/Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. Biosci Rep, 2019, 39(1): BSR20181614. DOI: 10.1042/BSR20181614.
- [21] Zhao L, An R, Yang Y, et al. Melatonin alleviates brain injury in mice subjected to cecal ligation and puncture via attenuating inflammation, apoptosis, and oxidative stress: the role of SIRT1 signaling [J]. J Pineal Res, 2015, 59(2): 230-239. DOI: 10.1111/jpi.12254.
- [22] Jia YH, Zheng Z, Wang YC, et al. SIRT1 is a regulator in high glucose-induced inflammatory response in RAW264.7 cells [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120849. DOI: 10.1371/journal.pone.0120849.
- [23] Lin QQ, Geng YW, Jiang ZW, et al. SIRT1 regulates lipopolysaccharide-induced CD40 expression in renal medullary collecting duct cells by suppressing the TLR4-NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Life Sci, 2017, 170: 100-107. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.11.026.
- [24] Yue L, Zhao L, Liu HX, et al. Adiponectin protects against glutamate-induced excitotoxicity via activating SIRT1-dependent PGC-1 $\alpha$  expression in HT22 hippocampal neurons [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 2957354. DOI: 10.1155/2016/2957354.

(收稿日期: 2022-08-15)