

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.09.002

SIRT1 在小鼠肝纤维化中的作用及转录差异基因分析 *

冯文强 张 松 丁美玲 曹海超 聂勇战[△]

(第四军医大学西京消化病医院肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:观察肝脏特异性 SIRT1 敲除(SIRT1-LKO)小鼠在四氯化碳(CCL₄)诱导下的肝纤维化情况,系统地探讨 SIRT1 及转录差异基因在肝纤维化中的作用和机制。**方法:**利用 Cre-LoxP 重组酶系统构建 SIRT1-LKO 小鼠模型,经腹腔注射 CCL₄ 橄榄油溶液来诱导小鼠肝纤维化,通过血清生化检测肝功能,使用天狼星红染色观察肝脏胶原蛋白沉积,检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达来观察肝星状细胞(HSCs)的活化,并进一步利用基因芯片技术和生物信息学分析来筛选转录差异基因。**结果:**在 CCL₄ 诱导下,SIRT1-LKO 小鼠比同窝野生(WT)小鼠的肝损伤更加严重,肝纤维化也更为显著($P < 0.05$);通过对转录差异基因进行 GO 生物过程和 KEGG 通路分析,发现了一组可能与 SIRT1 和肝纤维化都存在相关的关键基因(TNC、TPM1、E2F1、DEFB1、LRTM1)。**结论:**SIRT1 缺失会增加 CCL₄ 诱导的小鼠肝损伤,加重肝纤维化;SIRT1 可能与上述基因协同参与了肝纤维化的发生发展。

关键词:SIRT1;肝纤维化;基因芯片;生物信息学

中图分类号:Q95-3;R575.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)09-1608-05

Role of SIRT1 in Mouse Liver Fibrosis and Transcriptional Differential Genes Analysis*

FENG Wen-qiang, ZHANG Song, DING Mei-ling, CAO Hai-chao, NIE Yong-zhan[△]

(Xijing Hospital of Digestive Disease & State Key of Laboratory of Cancer Biology, Fourth Military Medical University,

Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To observe liver fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCL₄) of liver-specific knockout of SIRT1 (SIRT1-LKO) mice, and explore the role and mechanism of SIRT1 and transcriptional differential genes in the pathologic process of liver fibrosis systematically. **Methods:** SIRT1-LKO mice model was established by using a Cre-loxP approach. Liver fibrosis was induced by repetitive intraperitoneal CCL₄ injection. Liver function was tested by serum biochemistry. Sirius red staining was used to observe the collagen accumulation. The α -smooth muscle actin (α -SMA) immunohistochemistry was performed to show the hepatic stellate cells (HSCs) activation. The cDNA microarray technology and bioinformatics analysis were performed to screen transcriptional differential genes. **Results:** SIRT1-LKO mice had more serious liver injury and fibrosis than littermate WT mice after CCL₄ treatment ($P < 0.05$). Some key differential genes (including TNC, TPM1, E2F1, DEFB1, LRTM1) were discovered through GO (Gene Ontology) biological process and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway analysis, which may be related with SIRT1 and liver fibrosis jointly. **Conclusions:** The deletion of SIRT1 enhanced liver injury and promoted liver fibrosis induced by CCL₄ in mice. SIRT1 may cooperate with these genes and involve in the occurrence and development of liver fibrosis.

Key words: SIRT1; Liver fibrosis; Microarray; Bioinformatics

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R575.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)09-1608-05

前言

肝纤维化是一种肝内结缔组织异常增生的病理过程,其特征是肝损伤后的细胞外基质(ECM)异常增生^[1]。许多因素造成的肝损伤均可引起肝纤维化^[2]。如果肝损伤是急性或自限性的,则肝脏能够恢复到正常状态;如果损伤持续,ECM 异常增生和

过度沉积,肝实质细胞被瘢痕组织取代,最终会导致肝硬化^[3]。

SIRT1 作为酵母 Sir2 在哺乳动物中的直系同源,是一种高度保守的 NAD⁺ 依赖的蛋白去乙酰化酶。作为一种关键的调节分子,SIRT1 在代谢稳态中发挥着至关重要的作用^[4]。研究表明,SIRT1 能在多种细胞和组织中抑制炎症反应^[5-7]。过表达 SIRT1 能抑制高脂饮食诱导的肝脂肪变性和炎症反应^[8],反之,

* 基金项目:科技部重大国际合作项目(81110200);肝脏脂质代谢障碍中 SIRT1 相关分子的组学研究

作者简介:冯文强(1982-),男,硕士研究生,主要研究方向:肝脏代谢,电话:15002911017, E-mail: wqfeng2012@163.com

[△] 通讯作者:聂勇战,电话:029-84771620, E-mail: nieyongzhan@gmail.com

(收稿日期:2014-10-19 接受日期:2014-11-15)

肝细胞敲除 SIRT1 会加重肝脏的炎症反应^[9]。SIRT1 还能通过调节 TGF- β 信号通路来参与纤维化^[10,11]。因此我们推测, SIRT1 与肝纤维化密切相关。

为了阐明 SIRT1 在肝纤维化中的作用, 本研究首先建立了 SIRT1-LKO 小鼠模型, 通过 CCL₄ 橄榄油溶液腹腔注射来诱导肝纤维化, 然后在此基础上探讨 SIRT1 及转录差异基因在肝纤维化中的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 SIRT1-LKO 小鼠模型的建立

SIRT1flox5-6/flox5-6 小鼠, 由美国国立卫生研究院糖尿病消化病及肾病研究所(NIDDK)邓初夏教授惠赠, 该小鼠遗传背景为 129/FVB/Black/Swiss^[12]; Alb-Cre 转基因小鼠, 购买自 Jackson 实验室, 该小鼠遗传背景为 C57BL/6J。通过将 SIRT1flox5-6/flox5-6 和 Alb-Cre 小鼠杂交获得 SIRT1-LKO 小鼠及其同窝 WT 小鼠, 经蛋白质印迹法(Western-Blot)、实时荧光定量聚合酶链反应(QRT-PCR)和免疫组织化学检测证实了是 SIRT1-LKO 小鼠。

1.2 Western-Blot

取 0.05 g 小鼠肝脏组织, 组织研磨器中研磨后, 加入蛋白酶抑制剂和细胞裂解液(1:9, 碧云天生物研究所)500 μ L, 依次进行冰上裂解、超声、离心, 然后取上清, 二奎琳甲酸(BCA)法测定蛋白总浓度, 加入 1/4 体积 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液(碧云天生物研究所), 煮沸后再次离心。8% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 半干法转膜(硝酸纤维素膜), 依次 5% 脱脂牛奶封闭、兔抗鼠 SIRT1 一抗(1:1000, Millipore 公司)封闭、抗兔二抗(1:2000, Sigma 公司)封闭, 采用 ECL 试剂(Thermo 公司)在 Bio-RAD 凝胶成像仪(Bio-Rad)上显影成像。

1.3 QRT-PCR

采用 RNA 提取试剂盒(OMEGA 公司), 严格按照标准操作提取小鼠肝脏组织中的总 RNA, 按照反转录试剂盒(TaKaRa 公司)说明书配置 10 μ L 反应体系, 在 PCR 仪(TE Thermo Cycler)上采用两步法反转录得到 cDNA。采用 QRT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)及 Bio-Rad CFX96 荧光定量系统(Bio-Rad)进行荧光定量检测。

1.4 免疫组织化学

小鼠肝脏组织经福尔马林固定, 石蜡包埋常规切片, 依次进行烤片、脱蜡水化、抗原修复、灭活内源性过氧化物酶、血清封闭, 然后分别进行一抗封闭(兔抗鼠 SIRT1 一抗, 1:200, Millipore 公司; 兔抗鼠 α -SMA 一抗, 1:200, Abcam 公司; 4 $^{\circ}$ C, 16 h)、二抗封闭(羊抗兔二抗, Dako 公司; 室温, 1 h), 最后再 DAB 显色、苏木精复染、脱水、透明、封片、镜检。分别用已知阳性表达的肝组织切片作为阳性对照, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。每张切片随机选取 10 个高倍镜视野($\times 400$), 使用 Image proplus 6.0 图像分析系统半定量测定表达, 计算平均光密度值, 同一标本三张切片测量后取平均值。

1.5 肝纤维化模型的建立和样本采集

选择 6-8 周大小体重相近(约 30 g)的雄性 SIRT1-LKO 小

鼠及其同窝 WT 小鼠, 分成 4 组(WT-OIL 组、LKO-OIL 组、WT-CCL₄ 组、LKO-CCL₄ 组), 每组 5 只, 分别给予 CCL₄ 橄榄油溶液(20% CCL₄)或单纯橄榄油(OIL)腹腔注射, 每次 0.1 mL, 每周 2 次(周二和周五), 连续注射 8 周。

8 周后, 将各组小鼠采用摘眼球法取血, 收集血液于促凝管中, 静置后离心, 取上层血清, 检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)。同时取各组小鼠的肝脏组织, 分别做:(1)福尔马林固定, 石蜡包埋 HE 染色;(2)天狼星红染色;(3)RNA Later -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用;(4)其余肝脏组织液氮中保存备用。

1.6 基因芯片检测

采用 mirVanaTM miRNA Isolation Kit 试剂盒(Cat#AM1561, Ambion, Austin, TX, US), 根据生产厂商提供的标准操作流程进行小鼠肝脏组织的总 RNA 抽提。由上海伯豪生物技术有限公司进行基因芯片检测, 所用芯片为 Agilent Mouse lncRNA 4 $\times$ 180K 芯片(design ID: 046161)。数据采用 Gene Spring Software 11.0 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, US)进行归一化处理, 所用的算法为 Quantile。

1.7 基因芯片数据筛选和生物信息学分析

基因芯片数据主要分析以下 3 种情况:(1)WT-CCL₄ 组与 WT-OIL 组比较;(2)LKO-OIL 组与 WT-OIL 组比较;(3)LKO-CCL₄ 组与 WT-CCL₄ 组比较。然后分别对差异基因(差异倍数 >2 或 <0.5)进行生物信息学分析(DAVID Bioinformatics Resources 6.7), 主要是 GO 生物过程分析和 KEGG 通路分析。

1.8 数据分析

所有数据资料采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料以 mean $\pm$ SD 表示, 比较两组数据组间差异采用独立样本 t 检验; 计数资料以百分率表示, 均采用 χ^2 检验, P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功建立 SIRT1-LKO 小鼠模型

通过 Western-Blot 检测发现 SIRT1-LKO 小鼠的 SIRT1 蛋白表达水平明显下降, 但是仍然存在, 分析原因为该小鼠只是 SIRT1 在肝细胞中特异性敲除, 而在肝脏其他细胞中仍然存在(图 1A)。通过 QRT-PCR 验证了 SIRT1-LKO 小鼠 SIRT1 基因表达水平明显下降(P < 0.01)(图 1B)。通过免疫组化观察 SIRT1 在肝脏中的表达水平及分布情况, 发现 SIRT1-LKO 小鼠的 SIRT1 蛋白表达水平在肝细胞中明显下降, 而在非肝细胞中未见明显改变(图 1C)。这些结果证实了我们成功建立了 SIRT1-LKO 小鼠模型。

2.2 SIRT1-LKO 小鼠肝损伤加重

造模 8 周后, 分别取血清检测各组小鼠的 ALT 和 AST 水平, 发现在单纯注射橄榄油的情况下, WT 小鼠与 LKO 小鼠无明显差异; 而在 CCL₄ 诱导下, ALT 和 AST 水平明显升高(P < 0.01), LKO-CCL₄ 组升高更为显著(图 2A, B)。这些结果表明, 在 CCL₄ 诱导下, WT 和 SIRT1-LKO 小鼠都会出现肝损伤, 而 SIRT1-LKO 小鼠的肝损伤更加严重(P < 0.05)。

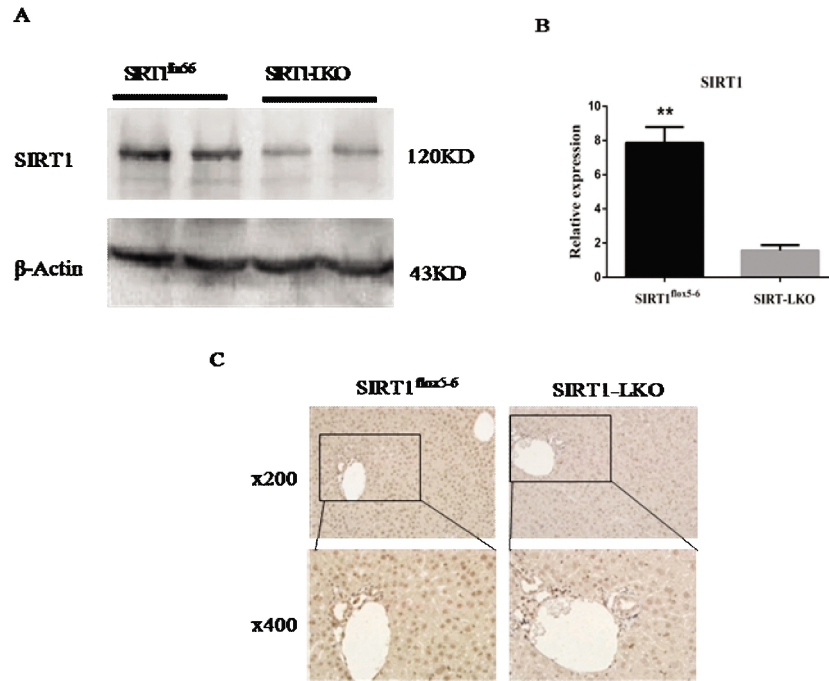
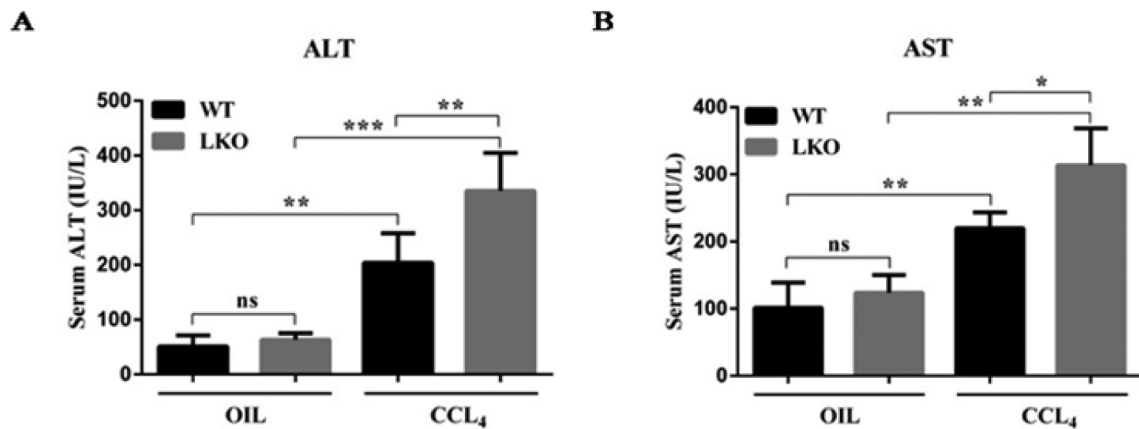


图1 成功建立了 SIRT1-LKO 小鼠模型

Fig. 1 SIRT1-LKO mouse models were established successfully

Note: A: The protein level of SIRT1 by Western-Blot; B: The expression of SIRT1 by QRT-PCR; C: The protein level of SIRT1 by immunohistochemistry. ** $P < 0.01$, compared with SIRT1^{flx5-6} mice.

图2 CCL₄ 诱导下 SIRT-LKO 小鼠肝损伤加重Fig. 2 Liver injury was enhanced in SIRT-LKO mice after CCL₄ treatment

Note: A: The level of serum ALT. B: The level of serum AST. Data represent means $\pm$ standard error of the mean (n=5).

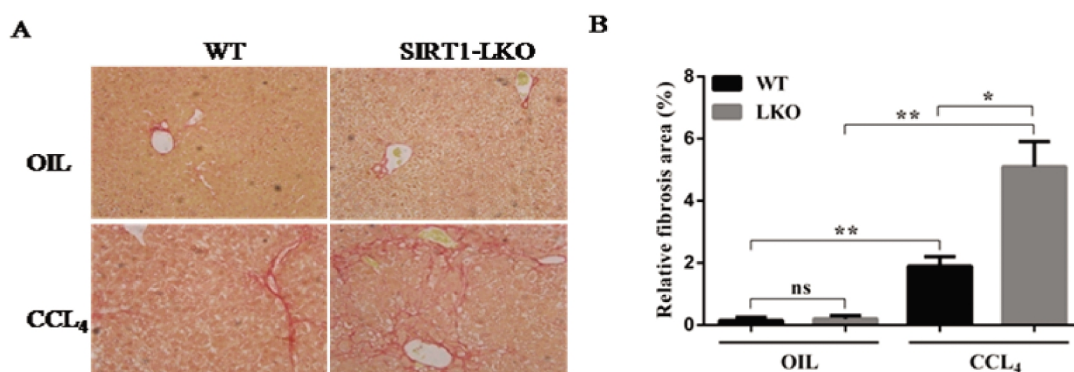
ns: Non significant differences, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

2.3 SIRT1-LKO 小鼠肝纤维化加重

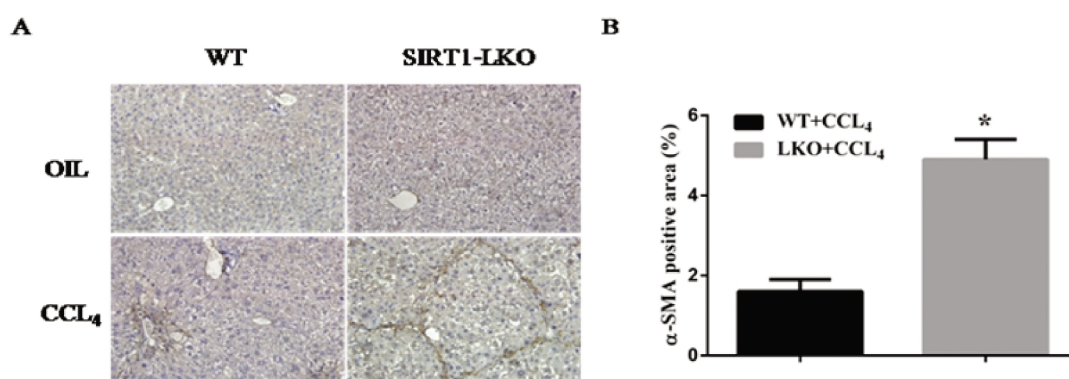
造模 8 周后, 用天狼星红染色观察胶原蛋白在肝内的沉积, 从而反映肝纤维化的情况。WT-OIL 组和 LKO-OIL 组染色的肝脏胶原蛋白较少; 而 WT-CCL₄ 组和 LKO-CCL₄ 组染色的肝脏胶原蛋白明显增加, 在 LKO-CCL₄ 组则更为显著 (图 3A)。通过数字图像定量分析, 证实了 LKO-CCL₄ 组比 WT-CCL₄ 组染色的肝脏胶原蛋白积聚更多, 纤维化区域更为广泛 ($P < 0.05$) (图 3B)。这些结果证实了在 CCL₄ 诱导下, SIRT1-LKO 小鼠的肝纤维化程度更加严重。

2.4 SIRT1-LKO 小鼠 HSCs 活化增多

HSCs 活化是肝纤维化的一个重要的机制, α -SMA 则是 HSCs 活化的一种主要标志物^[13]。我们通过免疫组化的方法检测 α -SMA 在肝脏中的表达, 从而反映 HSCs 的活化程度。WT-OIL 组和 LKO-OIL 组 α -SMA 表达较少, 主要分布于血管壁周围; 而给予 CCL₄ 诱导后, α -SMA 表达明显增加, 主要分布在门静脉、汇管区及纤维间隔区域内; LKO-CCL₄ 组 α -SMA 的表达水平更高 (图 4A)。通过数字图像定量分析, 证实了 LKO-CCL₄ 组比 WT-CCL₄ 组 α -SMA 染色阳性区域更为广泛 ($P < 0.05$) (图 4B)。这些结果表明, 在 CCL₄ 诱导下 SIRT1-LKO 小鼠比 WT 小鼠肝脏中有着更多活化的 HSCs。

图3 CCL₄诱导下 SIRT1-LKO 小鼠肝纤维化加重Fig. 3 Liver fibrosis was increased in SIRT1-LKO mice after CCL₄ treatment

Note: A: Sirius red staining was performed to show collagen deposition of the livers. B: The quantitative image analysis of collagen fibers. Data represent means $\pm$ standard error of the mean (n=5). Original magnification $\times$ 100. ns: Non significant differences; *P<0.05; **P<0.01.

图4 CCL₄诱导下 SIRT1-LKO 小鼠 HSCs 活化增多Fig. 4 More HSCs were activated in SIRT1-LKO mice after CCL₄ treatment

Note: A: α -SMA immunohistochemistry was performed to show activated HSCs in the livers. B: The quantitative image analysis of α -SMA positive area. Data represent means $\pm$ standard error of the mean (n=5). Original magnification $\times$ 100. *P<0.05, compared with WT+CCL₄ group.

2.5 基因芯片数据统计及生物信息学分析

选择差异倍数 2 倍以上(差异倍数 >2 或 <0.5)的基因进行统计发现:(1)WT-CCL₄ 组与 WT-OIL 组比较,发现 2220 个差异基因,其中上调 1540 个,下调 680 个;(2)LKO-OIL 组与 WT-OIL 组比较,发现 1330 个差异基因,其中上调 602 个,下调 728 个;(3)LKO-CCL₄ 组与 WT-CCL₄ 组比较,发现 1298 个差异基因,其中上调 823 个,下调 475 个。

分别对上述三组差异基因进行 GO 生物过程和 KEGG 通路分析发现:(1)WT-CCL₄ 组与 WT-OIL 组比较,上调的 1540 个基因主要参与了细胞周期、胶原原纤维构建、细胞增殖、炎症反应、ECM 及其受体相互作用、细胞因子及其受体相互作用、P53 信号通路、酶联受体蛋白信号通路、趋化因子信号通路以及 TGF- β 信号通路等;下调的 680 个基因主要参与了趋化作用、氧化还原作用、脂肪酸代谢、通过细胞色素 P450 的外源性物质代谢、PPAR 信号通路等;(2)LKO-OIL 组与 WT-OIL 组比较,上调的 602 个基因主要参与了细胞周期、免疫应答、通过细胞色素 P450 的外源性物质代谢、ECM 及其受体相互作用以及趋化因子信号通路等;下调的 728 个基因主要参与了细胞凋亡、昼夜节律、细胞因子及其受体相互作用、胰岛素信号通路、

跨膜受体蛋白丝氨酸 / 苏氨酸激酶信号通路以及 TGF- β 信号通路等;(3)LKO-CCL₄ 组与 WT-CCL₄ 组比较,上调的 823 个基因主要参与了细胞周期、ECM 及其受体相互作用、跨膜受体蛋白丝氨酸 / 苏氨酸激酶信号通路、BMP 信号通路以及 TGF- β 信号通路等;下调 475 个基因主要参与了药物代谢、通过细胞色素 P450 的外源性物质代谢、氧化还原作用、急性炎症反应、防御反应以及细胞因子产生等生物过程。

在此基础上我们通过进一步分析,发现了一组可能与 SIRT1 和肝纤维化都存在相关的基因(TNC、TPM1、E2F1、DEFB1、LRTM1)。

3 讨论

肝细胞是病毒、酒精代谢产物和胆汁酸等许多肝毒性物质的靶细胞。受损的肝细胞释放活性氧(ROS)和纤维化介质,诱导 HSCs 活化,刺激成肌纤维细胞纤维化活性^[14]。此外,肝细胞受损后还会释放白介素-33(IL-33)等炎性细胞因子^[15]和损伤相关分子模式(DAMPs)分子^[16],从而直接或间接地促进纤维生成。这都表明肝细胞在肝纤维化和肝硬化的发生发展中扮演着极其重要的角色。

近年来 SIRT1 与非酒精性脂肪肝病 (NAFLD) 发病机制的研究表明, 适当上调 SIRT1 的表达能显著改善 NAFLD 动物模型的疾病程度, 而 SIRT1 肝脏敲除会引起明显的肝脏脂肪变性^[9]和肝糖异生障碍^[17], 提示 SIRT1 在肝脏代谢障碍中发挥着重要作用。除了参与糖脂代谢等诸多功能外, SIRT1 还参与免疫反应, 通过去乙酰化作用抑制 NF- κ B 的活性, 从而减低炎症反应^[18]。最近有研究报道, 在成纤维细胞中活化 SIRT1 能增强 TGF- β 的纤维化作用; 下调 SIRT1 能抑制 TGF- β /SMAD 信号通路^[19]。而另一项研究结果却截然相反, 在 5/6 肾切除小鼠的残留肾脏中, SIRT1 缺失会加重肾纤维化; 而活化 SIRT1 能抑制 TGF- β /SMAD3 信号通路, 从而在肾脏纤维化中发挥保护作用^[11]。之所以出现看似矛盾的结果, 一方面是因为研究是在不同的组织细胞中进行, 另一方面则可能是由于离体和活体两种完全不同的状态所致, 这也表明了 SIRT1 功能的多样性和复杂性。

为了研究 SIRT1 在肝纤维化中的作用, 我们首次在 SIRT1 肝脏特异性敲除小鼠上建立了 CCL₄ 诱导的肝纤维化模型。研究结果表明, 通过连续 8 周腹腔注射, WT-CCL₄ 组小鼠出现肝损伤, ALT 和 AST 升高, α -SMA 增加, 并且出现肝纤维化, 而 WT-OIL 组小鼠这些指标都无明显改变, 证实了我们建造小鼠肝纤维化模型成功。该研究初次发现, LKO-CCL₄ 组与 WT-CCL₄ 组比较, ALT 和 AST 升高更加明显, α -SMA 增加更为显著, 肝纤维化的程度也更为严重。这些结果证实了 SIRT1 缺失会加重肝功能损伤, 显著增加肝纤维化。这与之前提到的 SIRT1 在 5/6 肾切除小鼠肾脏纤维化中的报道一致^[11], 间接证实了 SIRT1 对肝纤维化是起保护作用的。

在基因敲除模式动物肝纤维化造模的基础上, 该研究还运用了基因组学的研究策略, 采用高灵敏的基因芯片技术来挖掘参与肝纤维化的新的关键分子。通过对各组间转录差异基因的统计和生物信息学分析, 我们发现这些差异基因主要参与了细胞周期、细胞增殖与凋亡、细胞应激反应、炎症反应、趋化作用、氧化还原作用、ECM 及其受体相互作用、细胞因子及其受体相互作用等诸多生物学过程, 并且涉及 P53 信号通路、酶联受体蛋白信号通路、趋化因子信号通路、BMP 信号通路以及 TGF- β 信号通路等多条信号通路。这些生物学过程和通路大部分都参与了肝脏纤维化的发生发展。

在此基础上我们发现了一组可能与 SIRT1 和肝纤维化都存在相关的基因 (TNC、TPM1、E2F1、DEFB1、LRTM1)。已有研究报道, 在肝炎到肝纤维化的过程中, TNC (生腱蛋白 C) 能通过增强炎症反应来促进肝纤维化发生, 伴随细胞因子活化、HSCs 募集和 TGF- β 的表达^[20]。还有研究发现, TPM1 (原肌球蛋白 1) 可能在肝纤维化发生发展中扮演着重要角色^[20]。最近一项研究表明, E2F1 作为代谢性疾病的一种重要调节分子, 能通过 Egr-1/FHP/EID1 网路来调节胆汁性肝纤维化, 因此被认为是一种新的纤维化基因^[21]。之前的研究也证实了 SIRT1 和 E2F1 存在相关: SIRT1 能与 E2F1 结合, 抑制 E2F1 的活性; 下调 SIRT1 能增加 E2F1 的转录和凋亡功能^[22]。以上这些研究结果和我们的基因芯片数据一致, 也进一步证实了基因芯片数据

的可靠性。目前关于防御素 β 1 (DEFB1) 以及富含亮氨酸重复序列和跨膜结构域 1 (LRTM1) 与肝纤维化的关系尚无研究报道。

总之, SIRT1 可能在肝纤维化中发挥着重要的作用, 同时其他相关基因也参与了肝纤维化的发生发展。但 SIRT1 在肝纤维化中的具体作用机制以及 SIRT1 与其他相关基因的相互作用尚不明确, 这些都需要进一步大量的研究。开展这方面的研究对于我们阐明肝纤维化的发生发展机制以及探寻新的诊疗靶标具有重大意义。

参考文献 (References)

- [1] Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches [J]. *Chemico-biological interactions*, 2011, 193(3): 225-231
- [2] Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury [J]. *The Journal of biological chemistry*, 2000, 275(4): 2247-2250
- [3] Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis [J]. *Lancet*, 2014, 383(9930): 1749-1761
- [4] Schug TT, Li X. Sirtuin 1 in lipid metabolism and obesity [J]. *Annals of medicine*, 2011, 43(3): 198-211
- [5] Yoshizaki T, Milne JC, Imamura T, et al. SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes [J]. *Molecular and cellular biology*, 2009, 29(5): 1363-1374
- [6] Yoshizaki T, Schenk S, Imamura T, et al. SIRT1 inhibits inflammatory pathways in macrophages and modulates insulin sensitivity [J]. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*, 2010, 298(3): E419-428
- [7] Schug TT, Xu Q, Gao H, et al. Myeloid deletion of SIRT1 induces inflammatory signaling in response to environmental stress [J]. *Molecular and cellular biology*, 2010, 30(19): 4712-4721
- [8] Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, et al. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(28): 9793-9798
- [9] Purushotham A, Schug TT, Xu Q, et al. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation [J]. *Cell metabolism*, 2009, 9(4): 327-338
- [10] Zerr P, Palumbo-Zerr K, Huang J, et al. Sirt1 regulates canonical TGF-beta signalling to control fibroblast activation and tissue fibrosis [J]. *Annals of the rheumatic diseases*, 2014[Epub ahead of print]
- [11] Huang XZ, Wen D, Zhang M, et al. Sirt1 activation ameliorates renal fibrosis by inhibiting the TGF-beta/Smad3 pathway [J]. *Journal of cellular biochemistry*, 2014, 115(5): 996-1005
- [12] Wang RH, Li C, Deng CX. Liver steatosis and increased ChREBP expression in mice carrying a liver specific SIRT1 null mutation under a normal feeding condition [J]. *International journal of biological sciences*, 2010, 6(7): 682-690
- [13] Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis [J]. *Comprehensive Physiology*, 2013, 3(4): 1473-1492

号通路有关。

已有研究表明,obestatin 可与 CRF 受体结合,进而改变胃和十二指肠动力^[16]。因此,本研究观察了脑室内注射 CRF 为胃排空的影响。结果显示,侧脑室注射 CRF 可显著抑制胃的排空率,这与已有的相关研究结果相吻合^[17]。尽管在人类脑脊液中 CRF 的半衰期不到 10 分钟^[18],但是我们研究结果表明,脑室内注射 1nmol 的 CRF 能有效抑制大鼠胃的排空。

总之,侧脑室注射 obestatin 2 小时后,血浆酰基化 ghrelin、去酰基化 ghrelin 以及 nesfatin-1 水平无显著改变;大鼠摄食量与胃排空率呈负相关;侧脑室注射 obestatin 可使大鼠胃排空率增加;但侧脑室注射 CRF,大鼠胃排空率明显延迟。

参考文献(References)

- [1] Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, et al. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake [J]. *Science*, 2005, 310(5750): 996-999
- [2] Samson WK, White MM, Price C, et al. Obestatin acts in brain to inhibit thirst [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007, 292(1): R637-R643
- [3] Carlini VP, Schiöth HB, Debarioglio SR. Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 352(4): 907-912
- [4] Trovato L, Gallo D, Settanni F, et al. Obestatin: is it really doing something?[J]. *Front Horm Res*, 2014, 42(9):175-185
- [5] Zhang N, Yuan C, Li Z, et al. Meta-analysis of the relationship between obestatin and ghrelin levels and the ghrelin/obestatin ratio with respect to obesity[J]. *Am J Med Sci*, 2011, 341(1): 48-55
- [6] Mafra D, Guebre-Egziabher F, Cleaud C, et al. Obestatin and ghrelin interplay in hemodialysis patients [J]. *Nutrition*, 2010, 26(11-12): 1100-1104
- [7] Li JB, Asakawa A, Cheng K, et al. Biological effects of obestatin[J]. *Endocrine*, 2011, 39(3): 205-211
- [8] Chen CY, Asakawa A, Fujimiya M, et al. Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility [J]. *Pharmacol Rev*, 2009, 61(4): 430-481
- [9] Gullett NP, Mazurak VC, Hebbar G, et al. Nutritional interventions for cancer-induced cachexia[J]. *Curr Probl Cancer*, 2011, 35(2): 58-90
- [10] Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, et al. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(17): 6320-6325
- [11] Stengel A, Goebel M, Wang L, et al. Ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 in gastric X/A-like cells: role as regulators of food intake and body weight[J]. *Peptides*, 2010, 31(2): 357-369
- [12] Ogiso K, Asakawa A, Amitani H, et al. Plasma nesfatin-1 concentrations in restricting-type anorexia nervosa[J]. *Peptides*, 2011, 32(1): 150-153
- [13] Chen CY, Tsai CY. Ghrelin and motilin in the gastrointestinal system [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(31):4755-4765
- [14] Asakawa A, Ataka K, Fujino K, et al. Ghrelin family of peptides and gut motility[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 3(1): 73-74
- [15] Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, et al. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin[J]. *Gut*, 2005, 54(1): 18-24
- [16] Fujimiya M, Asakawa A, Ataka K, et al. Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: regulatory roles on the gastrointestinal motility [J]. *Int J Pept*, 2010, 29(2): 227-234
- [17] Coin I, Katritch V, Sun T, et al. Genetically encoded chemical probes in cells reveal the binding path of urocortin-I to CRF class B GPCR [J]. *Cell*, 2013, 155(6):1258-1269
- [18] Kellner M, Salzwedel C, Wortmann V, et al. No acute suppression of cerebrospinal fluid corticotropin-releasing hormone in man by cortisol administration[J]. *Psychiatry Res*, 2013, 210(2): 662-664
- [14] Elpek GO. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update[J]. *World journal of gastroenterology : WJG*, 2014, 20(23): 7260-7276
- [15] McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, et al. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis[J]. *Immunity*, 2013, 39(2): 357-371
- [16] Luedde T, Kaplowitz N, Schwabe RF. Cell death and cell death responses in liver disease: mechanisms and clinical relevance [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(4): 765-783
- [17] Nie Y, Erion DM, Yuan Z, et al. STAT3 inhibition of gluconeogenesis is downregulated by SirT1 [J]. *Nature cell biology*, 2009, 11(4): 492-500
- [18] Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase [J]. *The EMBO journal*, 2004, 23(12): 2369-2380
- [19] El-Karef A, Yoshida T, Gabazza EC, et al. Deficiency of tenascin-C attenuates liver fibrosis in immune-mediated chronic hepatitis in mice [J]. *The Journal of pathology*, 2007, 211(1): 86-94
- [20] Liu J, Wang CY, Chen YP, et al. Dynamic expression of tropomyosin 1 in rat model of hepatic fibrosis and hepatic stellate cells[J]. *Chinese journal of hepatology*, 2011, 19(11): 848-852
- [21] Zhang Y, Xu N, Xu J, et al. E2F1 is a novel fibrogenic gene that regulates cholestatic liver fibrosis through the Egr-1/SHP/EID1 network [J]. *Hepatology*, 2014, 60(3): 919-930
- [22] Wang C, Chen L, Hou X, et al. Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage [J]. *Nature cell biology*, 2006, 8(9): 1025-1031

(上接第 1612 页)