

COPD 患者外周血 SIRT1 及 NF- κ B、MMP-9 的表达水平分析

梅浩砚¹,牛惠惠^{2*},李任翔³

(荆门市第一人民医院 1. 检验科,2. 妇科,3. 全科医学,湖北 荆门 448000)

摘要: 探讨 COPD 患者外周血沉默信息调节因子相关酶 1 (SIRT1) 及核因子 κ B (NF- κ B)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 的表达水平及作用。比较患者 SIRT1、NF- κ B、MMP-9 等水平情况。结果显示患者血清 SIRT1 水平随病情加重而降低,患者血清 NF- κ B、MMP-9 水平随病情加重而增高。COPD 稳定期组和急性加重组患者 SIRT1 mRNA 和蛋白相对表达量明显低于对照组;NF- κ B、MMP-9 mRNA 和蛋白相对表达量明显高于对照组。实验证明 COPD 患者 SIRT1 表达水平降低与肺功能下降相关,可作为 COPD 潜在标志物;SIRT1 可能通过对 NF- κ B、MMP-9 的调节作用来调控 COPD 的发生与发展。

关键词: COPD; 沉默信息调节因子相关酶 1; NF- κ B; MMP-9

中图分类号:R563

文献标识码:A

Expression of SIRT1 and NF- κ B and MMP-9 in peripheral blood of patients with COPD

MEI Haoyan¹, NIU Huihui^{2*}, LI Renxiang³

(The First People's Hospital of Jingmen 1. Laboratory, 2. Gynecology, 3. General Medicine, Jingmen 448000, Hubei, China)

Abstract: To investigate the expression of SIRT1, NF- κ B and MMP-9 in peripheral blood of patients with COPD. The levels of SIRT1, NF- κ B and MMP-9 in serum were detected. The results showed that the levels of serum SIRT1 decreased as the condition worsened. The levels of serum NF- κ B and MMP-9 increased as the condition worsened. The relative expression of SIRT1 gene and protein in COPD stable group and acute exacerbation group was significantly lower than that in control group, and that in COPD acute exacerbation group was significantly lower than that in stable group ($P < 0.05$); the relative expression of NF- κ B, MMP-9 gene and protein in COPD stable group and acute exacerbation group was significantly higher than that in control group, and that in COPD acute group was significantly higher than that in control group. So the decrease of SIRT1 expression in COPD patients is related to the decrease of pulmonary function, which can be used as a potential marker of COPD. SIRT1 may regulate the occurrence and development of COPD by regulating the effects of NF- κ B and MMP-9.

Key words: COPD; silent information regulator related enzyme 1; NF- κ B; MMP-9

慢性阻塞性肺疾病 (Chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是一种具有气流阻塞特征的慢性支气管炎和肺气肿,可进一步发展为肺心病和呼吸衰竭的常见慢性疾病,多发于中老年人群^[1]。目前已有的治疗方案仍无法完全抑制病情发展,在降低患者死亡率方面效果不佳^[2]。探索 COPD 病情发展中的特异性生物标志物和相关信号通路对阐明发病机制,对开发新的治疗药物,改善

患者治疗预后具有重要意义。近年来研究发现,沉默信息调节因子相关酶 1 (Silence Information Regulator Related Enzyme 1, SIRT1) 在细胞应激反应调控中发挥关键作用^[3],且与神经性病变、糖尿病等多种年龄相关疾病的发生、发展密切相关^[4]。但 SIRT1 在 COPD 病情发展中的研究仍鲜有报道。本文通过分析 COPD 患者外周血中 SIRT1 和炎症因子:核因子 κ B (Nuclear factor-kappa B, NF- κ B)、基质金属蛋白酶-9 (Matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 的表达水平,探讨 SIRT1 在 COPD 病情发生、发展中的可能调控机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年6月至2017年12月间本院收治的COPD急性加重期患者80例,其中男性45例、女性35例,年龄51~79岁,平均年龄 (65.30 ± 7.62) 岁。另取同期稳定期COPD患者60例,其中男性36例、女性24例,年龄50~76岁,平均年龄 (64.15 ± 6.95) 岁。纳入标准:符合中华医学会制定的慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013修订版)中的诊断标准;COPD急性加重期判断标准: $PCO_2 > 50$ mmHg,合并 $PO_2 < 60$ mmHg、呼吸频率 > 30 次/分,呼吸困难、咳嗽等临床症状明显加重。排除标准:①合并肺炎、哮喘、肺栓塞、肺结核的患者;②合并肝肾功能严重障碍,恶性肿瘤,自身免疫性疾病的患者。选取同期在本院体检的健康中老年人60例为对照组,其中男性34例、女性26例,年龄50~75岁,平均年龄 (64.90 ± 6.31) 岁。三组性别、年龄方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经本院伦理委员会审核批准,患者及健康体检者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂

SIRT1、NF- κ B、MMP-9 Elisa试剂盒购于上海联迈生物工程有限公司;DMEM培养基、胎牛血清购于北京索莱宝科技有限公司;Trizol试剂、BCA试剂盒均购于上海康朗生物科技有限公司;兔抗人SIRT1、NF- κ B、MMP-9、 β -actin多克隆抗体、兔抗人IgG(HRP标记)购于上海北诺生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 肺功能检测 分别于COPD急性加重期患者治疗前、稳定期COPD患者和对照组受试者入院时,使用GERATHERM肺功能测试仪测定用力肺活量(FVC)、第一秒用力呼气容积(FEV1)及占预估值的百分比(FEV1%)。检测前24h COPD患者未使用支气管扩张剂。

1.3.2 样品采集与血清 SIRT1、NF- κ B、MMP-9检测 COPD急性加重期患者治疗前、稳定期和对照组受试者入院时采集清晨空腹肘静脉血5 mL,取其中2 mL室温下2 000 r/min离心20 min,分离上层血清,Elisa法检测SIRT1、NF- κ B、MMP-9水平,严格按试剂盒说明书进行操作。

1.3.3 外周血单核细胞分离 取外周血3 mL,2 000 r/min离心10 min,收集血细胞,加入人外周血淋巴细胞分离液,收集单核细胞,磷酸缓冲液洗

涤3次,加入含10%胎牛血清的DMEM培养基中,以 1×10^6 /L细胞浓度接种于6孔板中,放入37℃ 5% CO₂细胞培养箱中培养24 h,收集贴壁的单核细胞。

1.3.4 RT-PCR检测 SIRT1、NF- κ B、MMP-9 mRNA表达 Trizol法提取外周血单核细胞总RNA,逆转录得到cDNA。SIRT1、NF- κ B、MMP-9及内参 β -actin引物合成由上海斯信生物科技有限公司完成,SIRT1引物序列:上游5'-TTAAGCGTGAATATCAGAACT-3',下游5'-GTGGGAAGAGGTC ATCAGGAG-3'; NF- κ B引物序列:上游5'-CTCATGGTCAACGCCAAGTG-3',下游5'-CCTGTAGCGATGCGTCGAG-3'; MMP-9引物序列:上游5'-GTATTGTC GTCTCCGTAAGGC-3',下游5'-CTGCTCCGTTCTCAAAGTGGAA-3';内参 β -actin引物序列:上游5'-CAAGAGTCGG AACTGCCAC G-3',下游5'-AGGTGA CCGCAGAAGTGCT-3'。反应条件:94℃ 30 s,94℃ 5 s,72℃ 30 s,共35个循环,延伸72℃ 10 min。扩增产物行2%琼脂糖凝胶电泳,计算SIRT1、NF- κ B、MMP-9 mRNA的相对表达量。

1.3.5 Western blot检测 SIRT1、NF- κ B、MMP-9蛋白表达 外周血单核细胞中加入RIPA蛋白提取剂,4℃ 12 000 r/min离心10 min后取上清,BCA法蛋白定量,定量后的总蛋白加入适量缓冲液,行SDS-PAGE凝胶电泳,湿法电转移将蛋白转膜到PVDF,5%脱脂奶粉封闭1 h,分别滴加兔抗人Sirt1多克隆抗体(1:200)、兔抗人NF- κ B多克隆抗体(1:200)、兔抗人MMP-9多克隆抗体(1:200)、兔抗人 β -actin多克隆抗体(1:500),4℃过夜,滴加HRP标记的兔抗人IgG(1:1 000),室温孵育1 h,ECL显色,暗室中显影,分析各条带灰度值。

1.4 统计学分析

研究数据使用SPSS21.0分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行 t 检验,相关性进行Pearson分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组肺功能检测指标比较

COPD稳定期组和急性加重组患者FEV1、FEV1/FVC、FEV1%明显低于对照组($P < 0.05$);COPD急性加重组患者FEV1、FEV1/FVC、FEV1%明显低于COPD稳定期组($P < 0.05$)。见表1。

表 1 三组肺功能检测指标比较

组别	n	FEV ₁ (L)	FEV ₁ /FVC (%)	FEV ₁ % (%)
对照组	60	73.36±13.42	86.20±15.42	93.94±18.20
COPD 稳定期组	60	58.51±12.70 ^a	67.48±11.94 ^a	80.31±15.53 ^a
COPD 急性加重组	80	42.48±10.31 ^{ab}	54.83±12.75 ^{ab}	63.47±5.71 ^{ab}

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 COPD 稳定期组相比,^b $P<0.05$

2.2 三组血清 SIRT1、NF-κB、MMP-9 水平比较

COPD 稳定期组和急性加重组患者血清 SIRT1 水平明显低于对照组,COPD 急性加重组明显低于稳定期组,差异有统计学意义($P<0.05$);COPD 稳定期组和急性加重组患者血清 NF-κB、MMP-9 水平明显高于对照组,COPD 急性加重组明显高于稳定期组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 三组血清 SIRT1、NF-κB、MMP-9 水平比较

组别	n	SIRT1	NF-κB	MMP-9
对照组	60	1.15±0.04	0.31±0.02	0.33±0.02
COPD 稳定期组	60	0.81±0.06 ^a	0.46±0.02 ^a	0.50±0.04 ^a
COPD 急性加重组	80	0.64±0.03 ^{ab}	0.68±0.04 ^{ab}	0.61±0.04 ^{ab}

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 COPD 稳定期组相比,^b $P<0.05$

2.3 三组 SIRT1、NF-κB、MMP-9 mRNA 表达水平比较

COPD 稳定期组和急性加重组患者 SIRT1 mRNA 相对表达量明显低于对照组,COPD 急性加重组明显低于稳定期组,差异有统计学意义($P<0.05$);COPD 稳定期组和急性加重组患者 NF-κB、MMP-9 mRNA 相对表达量明显高于对照组,COPD 急性加重组明显高于稳定期组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 三组 SIRT1、NF-κB、MMP-9 mRNA 相对表达量比较

组别	n	SIRT1	NF-κB	MMP-9
对照组	60	3.19±0.85	0.95±0.11	1.04±0.08
COPD 稳定期组	60	2.26±0.61 ^a	1.47±0.25 ^a	1.36±0.14 ^a
COPD 急性加重组	80	1.30±0.53 ^{ab}	2.53±0.49 ^{ab}	2.13±0.27 ^{ab}

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 COPD 稳定期组相比,^b $P<0.05$

2.4 三组 SIRT1、NF-κB、MMP-9 蛋白水平比较

COPD 稳定期组和急性加重组患者 SIRT1 蛋白

相对表达量明显低于对照组,COPD 急性加重组明显低于稳定期组,差异有统计学意义($P<0.05$);COPD 稳定期组和急性加重组患者 NF-κB、MMP-9 蛋白相对表达量明显高于对照组,COPD 急性加重组明显高于稳定期组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 1,表 4。

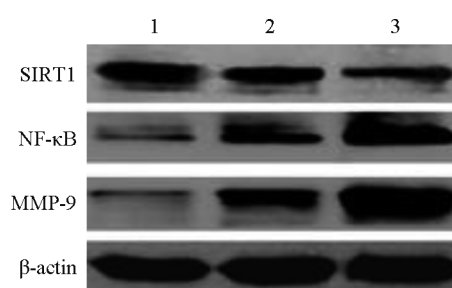


图 1 Western blot 检测 SIRT1、NF-κB、MMP-9 蛋白水平

1:对照组;2:COPD 稳定期组;3:COPD 急性加重组

表 4 三组血清 SIRT1、NF-κB、MMP-9 蛋白表达水平比较

组别	n	SIRT1	NF-κB	MMP-9
对照组	60	2.83±0.39	0.49±0.13	0.36±0.07
COPD 稳定期组	60	1.35±0.13 ^a	1.17±0.35 ^a	1.36±0.14 ^a
COPD 急性加重组	80	0.82±0.53 ^{ab}	3.10±0.64 ^{ab}	2.13±0.27 ^{ab}

与对照组比较,^a $P<0.05$;与 COPD 稳定期组比较,^b $P<0.05$

2.5 相关性分析

Pearson 相关性分析显示,SIRT1 mRNA 和蛋白表达水平与 COPD 患者 FEV₁、FEV₁/FVC、FEV₁% 呈明显正相关($r=0.581, 0.643, 0.610, P<0.01$);SIRT1 mRNA 和蛋白表达水平与 NF-κB、MMP-9 水平呈明显负相关($r=-0.442, 0.395, P<0.01$)。

3 讨 论

COPD 是小气道堵塞性病变,因病情发展缓慢,患者主要为中老年人;研究认为 COPD 可反映肺部加速老化^[5]。COPD 发生、发展中体内多种炎性介质和细胞因子发挥关键作用,已成为该领域研究的热点^[6]。SIRT1 为沉默信息调节因子蛋白家族成员,作为高度保守的基因亚家族,可编码 NAD⁺ 依赖的蛋白脱乙酰酶^[7]。SIRT1 通过调控多重底物蛋白间的平衡而调节细胞衰老、葡萄糖代谢等多种细胞反应^[8]。研究者发现,随年龄增长血清 SIRT1 水平

持续下降,在老年痴呆等神经系统疾病患者中血清 SIRT1 水平下降速度明显增加^[9];提示 SIRT1 可能为多种老年性疾病的潜在标志物。本研究显示, COPD 稳定期和急性加重期患者血清 SIRT1 浓度以及外周血单核细胞 SIRT1 mRNA 和蛋白表达水平较对照组明显下降,且急性加重期患者下降更明显;相关性分析显示, SIRT1 mRNA 和蛋白表达水平与气道阻塞指标 FEV1/FVC 和气道阻塞严重程度指标 FEV1% 均呈正相关,提示 SIRT1 表达水平随 COPD 进展逐渐下降,在病情发展中可能发挥调控作用,可作为评估病情严重程度的生物学指标。

炎症细胞因子和介质引发的慢性炎症反应是 COPD 发病的主要机制。研究者发现, SIRT1 能够通过与不同类型的靶蛋白结合来响应胞外刺激,参与 COPD 的发生、发展,但具体分子机制仍未完全阐明^[10]。相关研究显示,不同时期 COPD 患者中均存在 NF- κ B 激活,且与病情发展密切相关^[11]。本研究中 COPD 稳定期和急性加重期患者血清 NF- κ B 浓度以及外周血单核细胞 NF- κ B mRNA 和蛋白表达水平明显高于对照组,且急性加重期患者明显高于稳定期患者;且 NF- κ B 与 SIRT1 mRNA 和蛋白表达水平呈负相关,提示 SIRT1 可能对 NF- κ B 具有调控作用, SIRT1 表达下调与 NF- κ B 活性增加明显相关。

研究者发现, MMP-9 在胞外基质破坏中发挥作用,与支气管哮喘、肺癌等多种疾病的发生、发展密切相关^[12]。本研究显示, COPD 稳定期和急性加重期患者血清 MMP-9 浓度以及外周血单核细胞 MMP-9 mRNA 和蛋白表达水平明显高于对照组,且急性加重期患者明显高于稳定期患者。动物实验显示,经氧化应激诱导的大鼠体内 SIRT1 表达下降可提升 MMP-9 表达水平^[13]。本研究中 COPD 患者中 MMP-9 与 SIRT1 mRNA 和蛋白表达水平呈负相关,结合既往研究结论推测, SIRT1 可能通过对 NF- κ B、MMP-9 的调节作用来调控 COPD 的发生与发

展,其中具体的分子机制仍需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 倪荣. 阶段性干预对慢性阻塞性肺疾病患者病情控制效果[J]. 中国卫生工程学, 2018, 17(5): 768-70.
- [2] 鲁平海, 李晓作. COPD 合并肺部感染患者接受盐酸氨溴索支气管肺泡灌洗后全身炎症及应激反应的评估[J]. 海南医学院学报, 2017, 23(21): 2937-40.
- [3] 郑成功. Sirt1 在呼吸系统疾病中的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(4): 825-30.
- [4] 刘元顺, 应希旺, 李亚清, 等. SIRT1 调控细胞衰老在慢性阻塞性肺疾病中的研究进展[J]. 浙江临床医学, 2017, 19(4): 776-7, 87.
- [5] 满鑫, 高燕鲁, 俞晓滢, 等. COPD 气道重塑非炎症机制的研究进展[J]. 山东医药, 2017, 57(13): 110-2.
- [6] PUIG-VILANOVA E, MARTINEZ-LLORENS J, AUSIN P, et al. Quadriceps muscle weakness and atrophy are associated with a differential epigenetic profile in advanced COPD[J]. Clin Sci, 2015, 128(11/12): 905-21.
- [7] 严琮, 黄忠辉, 朱卫华, 等. 慢性阻塞性肺疾病的早期诊断生物标志物初筛[J]. 中南医学科学杂志, 2018, 46(6): 616-20.
- [8] 李耕谊, 殷少军, 柳毅, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者血清分泌型卷曲相关蛋白 5 与气道炎症和胰岛素抵抗的相关分析[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2017, 40(12): 903-8.
- [9] KWIATKOWSKA S, NOWETA K, ZIEBA M, et al. Enhanced exhalation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with COPD exacerbation: a prospective study[J]. Respiration: International Review of Thoracic Diseases, 2012, 84(3): 231-41.
- [10] 崔雯雯, 金鑫, 王宏涛, 等. NF- κ B 信号通路和肺部炎症疾病[J]. 中国急救医学, 2015, (3): 283-6, 287.
- [11] 夏文娟, 王学中, 梅晓冬, 等. D-二聚体和 C 反应蛋白在慢性阻塞性肺病进展中的变化及对肺动脉高压严重程度的预测作用[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(9): 687-90.
- [12] 段敏超, 韩伟. Th17 细胞与 Th1 细胞在慢性阻塞性肺疾病炎症发病机制中的调控作用[J]. 国际免疫学杂志, 2016, 39(6): 569-73.
- [13] 李世敏, 梁虹芳, 孔英君, 等. CCL20 和 MMP-9 在 COPD 大鼠中的表达及多西环素对其表达的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2016, 50(4): 279-83.

(本文编辑: 蒋湘莲)