

肝细胞特异性 *Sirt3* 基因敲除小鼠模型的构建

许雅萍¹,王语涵¹,陈婷婷¹,李 南¹,高萍萍¹,李 玲¹,王 华²,孙妩弋¹

摘要 目的 运用 Cre-loxP 技术构建肝细胞特异性沉默信息调节因子 3 (silence information regulator 3, *Sirt3*) 基因敲除 (*Sirt3*^{Δhep}) 小鼠,为研究肝细胞 *Sirt3* 基因在疾病中的生物学功能提供重要动物模型。**方法** 将 loxP 标记的 *Sirt3*^{lox/lox} 小鼠与 Alb-Cre 纯合子 (Alb-Cre^{+/+}) 小鼠进行交配, F1 代 *Sirt3*^{lox/-}/Alb-Cre^{+/+} 小鼠再与 *Sirt3*^{lox/lox} 小鼠进行交配并鉴定, F2 代基因型为 *Sirt3*^{lox/lox}/Alb-Cre^{+/+} 的小鼠即为本实验所构建的 *Sirt3*^{Δhep} 小鼠, *Sirt3*^{lox/lox}/Alb-Cre^{-/-} 小鼠即为对照小鼠 *Sirt3*^{lox/lox} 小鼠。提取鼠尾 DNA, 通过 PCR 鉴定子代小鼠的基因型; 免疫荧光双染观察 *Sirt3* 在小鼠肝细胞中的表达; 提取 *Sirt3*^{Δhep} 小鼠原代肝细胞及心脏、脾脏、肾脏、肺组织蛋白, Western blot 法验证 *Sirt3* 在小鼠肝细胞及其他组织中的表达水平; HE 染色观察小鼠肝脏及心脏、脾脏、肺等组织结构。**结果** 成功鉴定出 *Sirt3*^{Δhep} 小鼠; 免疫荧光及 Western blot 结果显示, 小鼠肝细胞中 *Sirt3* 蛋白表达水平低于对照组小鼠 ($P < 0.01$), 而 *Sirt3*^{Δhep} 小鼠的心脏、脾脏、肾脏和肺组织中 *Sirt3* 表达与对照组相比无明显变化 ($P > 0.05$); HE 染色结果显示 *Sirt3*^{Δhep} 小鼠肝脏、心脏、脾脏、肺、肾脏的组织学特征与对照组小鼠相比无明显变化。**结论** 成功构建肝细胞特异性 *Sirt3* 基因敲除小鼠, 为进一步研究肝细胞 *Sirt3* 基因在相关疾病中的调控作用机制奠定了基础。

关键词 肝细胞; *Sirt3*; 基因敲除; *Sirt3*^{Δhep} 小鼠; Cre-loxP; 基因型鉴定

中图分类号 R-332

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0384-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.003

沉默信息调节因子 3 (silence information regula-

2024-01-31 接收

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 82370632); 安徽省高校杰出青年科研项目 (编号: 2023AH020033); 安徽省转化医学研究院科研基金项目 (编号: 2022zhyc-C07); 安徽医科大学科研水平提升计划 (编号: 2021xkjT016); 安徽医科大学第三附属医院基础与临床合作研究提升计划培育专项 (编号: 2022sfy014)

作者单位: ¹ 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 合肥 230032

² 安徽医科大学第一附属医院肿瘤科, 合肥 230032

作者简介: 许雅萍, 女, 硕士研究生;

孙妩弋, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: sunwuyi51@aliyun.com

tor 3, *Sirt3*) 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 依赖性的去乙酰化酶, 属于 Sirtuins 蛋白家族^[1]。肝细胞作为肝脏中主要的实质细胞, 其介导碳水化合物、脂质和蛋白质代谢、解毒和免疫细胞激活, 以维持肝脏内稳态^[2]。研究^[3-6]表明, 肝细胞在接受肝脏损伤和炎症信号后会发生凋亡、坏死、自噬等, 并通过释放各种细胞炎性介质, 参与药物性肝损伤、病毒性肝病、肝纤维化等疾病的发生发展。

Sirt3 作为一种重要的去乙酰化酶, 可通过维持肝细胞线粒体完整性和清除胞内活性氧抑制氧化应激, 从而调控肝细胞凋亡、坏死等过程, 在多种肝脏疾病中发挥重要调节作用^[7-8]。研究^[9]表明, 正常小鼠 *Sirt3* 全身敲除后体内出现异常的氧化应激, 但在肠上皮细胞中特异性敲除 *Sirt3* 基因后小鼠表现正常, 而造模后与正常小鼠相比可明显加速肠道癌变, 提示细胞条件性敲除 *Sirt3* 对于研究疾病的病理机制十分必要。因此, 该研究中, 利用 Cre-loxP 重组酶系统的基因敲除技术, 以原代肝细胞为对象, 建立了肝细胞特异性 *Sirt3* 基因敲除小鼠模型, 该模型成功建立后可在转基因小鼠体内稳定遗传, 为进一步在各类肝脏疾病中阐述肝细胞 *Sirt3* 基因发挥的作用提供良好的实验动物模型基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 体质量为 20 ~ 25 g 的雄性 *Sirt3*^{lox/lox} 小鼠、Alb-Cre 转基因小鼠各 8 只均购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 均为 C57BL/6J 遗传背景。本研究获得安徽医科大学临床药理研究所动物实验伦理委员会批准 (编号: PZ-2023-008)。本研究的实验动物均由安徽医科大学临床药理研究所 SPF 级动物房饲养和繁育, 对饲养环境进行了精确的控制, 保持在大约 25 °C 的温度和 70% 左右的湿度。实验动物自由饮食和饮水。实验动物的使用许可证号: SYXK(皖)2020-001。

1.1.2 主要试剂 2 × Taq PCR Master Mix (货号: MT201)、50 × TAE (货号: EL102-01)、DNA marker

(货号:MD112)均购自北京博迈德基因技术有限公司;蛋白酶 K(货号:V900887-100MG)购自美国 Sigma Aldrich 公司;基因鉴定引物购自上海生工生物工程股份有限公司;Super Red 核酸染料(货号:BS354B)购自北京兰杰柯科技有限公司;RIPA 蛋白裂解液(货号:P0013C)、苯甲基磺酰氯(phenylmethyl sulfonyl fluoride, PMSF)(货号:ST506-2)、5 × 电泳加样缓冲液(货号:P0015L)均购自上海碧云天生物技术公司;抗 β -actin 抗体(货号:T0022)、抗 Sirt3 抗体(货号:AF5135)均购自美国 Affinity 公司;抗 Albumin 抗体(货号:66051-1-Ig)、辣根过氧化物酶山羊抗兔二抗(货号:SA00001-2)和鼠二抗(货号:SA00001-1)均购自美国 Proteintech 公司;ECL 化学发光试剂盒(货号:BL520B)购自北京 Biosharp 公司;Alexa Fluor 488 标记的山羊抗鼠 IgG 荧光二抗(货号:711-546-152)、Alexa Fluor 647 标记的山羊抗兔 IgG 荧光二抗(货号:715-606-150)均购自美国 Jackson ImmunoResearch 公司。

1.1.3 主要仪器 化学发光凝胶成像分析系统(上海天能科技有限公司,型号:Tanon-5200);冰冻切片机(德国 LEICA 公司,型号:CM 1950);通用型电泳仪(北京六一生物技术有限公司,型号:DYY-7C);石蜡切片机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,

型号:MICROM HM 325);玻片扫描仪(山东济南丹吉尔电子有限公司,型号:Pannoramic MIDI);激光共聚焦显微镜(德国 LEICA 公司,型号:TCS SP8);Thermal Cycler PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司,型号:T100)。

1.2 方法

1.2.1 肝细胞特异性 Sirt3 敲除小鼠模型的构建策略与流程 Sirt3 基因位于 Chr7 染色体上,有 10 个转录子,根据 Sirt3 基因的结构,将 Sirt3-201 转录本的外显子 2 ~ 3 作为敲除区域,该区域含有起始密码子 ATG 编码序列,敲除该区域会导致蛋白质功能的缺失。本研究使用 Cre-loxP 系统进行实验,以 Sirt3^{fllox/fllox} 小鼠和 Alb-Cre 小鼠进行配繁。Sirt3^{fllox/fllox} 小鼠是在 Sirt3 基因的 2 号和 3 号外显子插入了 loxP 位点的实验鼠,而 Alb-Cre 小鼠则是具有肝细胞特异性表达 Cre 重组酶的实验鼠。通过同源重组,Alb-Cre 重组酶可以特异性敲除 Sirt3 基因,因为它具有识别 loxP 位点的能力(图 1A)。在构建过程中,首先将 Sirt3^{fllox/fllox} 小鼠与 Alb-Cre^{+/+} 小鼠交配,产生了基因型为 Sirt3^{fllox/-}/Alb-Cre^{+/+} 的小鼠,然后,这些小鼠与 Sirt3^{fllox/fllox} 小鼠再次交配,生成了子代,其基因型为 Sirt3^{fllox/fllox}/Alb-Cre^{+/+} 小鼠(Sirt3^{Δhep} 小鼠)和 Sirt3^{fllox/fllox}/Alb-Cre^{-/-} 小鼠(Sirt3^{fllox/fllox} 小鼠)。见图 1B。

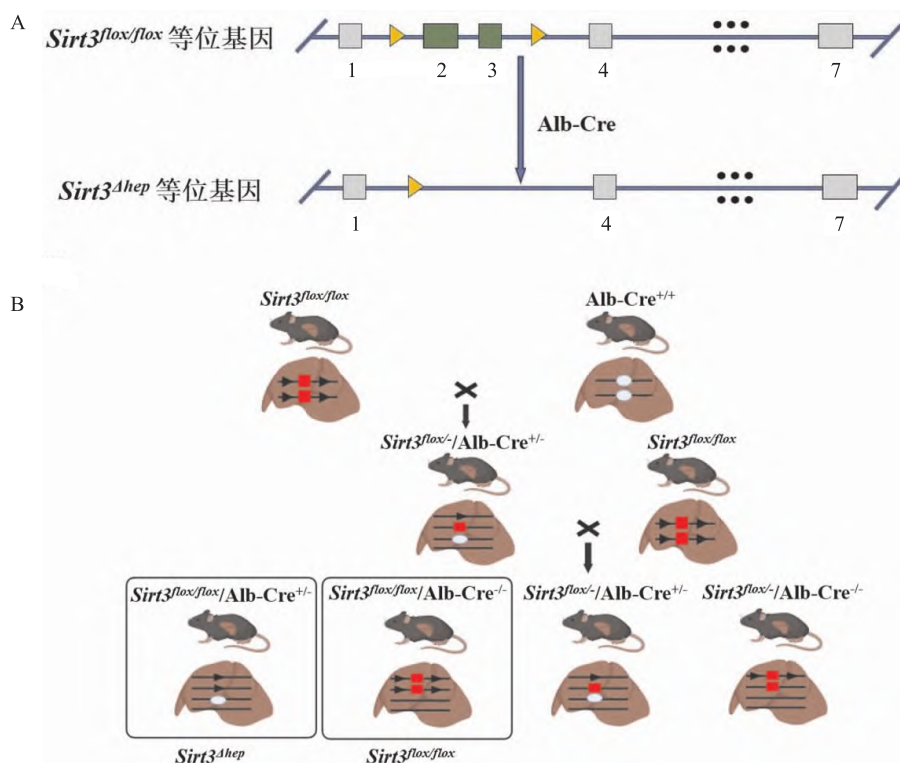


图1 肝细胞特异性 Sirt3 基因敲除小鼠模型的构建策略(A)与流程图(B)

1.2.2 PCR 鉴定小鼠基因型 在小鼠 4 周时,将鼠尾剪下,加入鼠尾裂解液 300 μl ,蛋白酶 K 20 μl ,在 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中过夜,第 2 天,12 000 r/min 离心 1 min,取出上清液,加入 400 μl 预冷的无水乙醇,轻轻吹打混合,使其在管内沉淀出白色絮状 DNA 后,12 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液。将 70 % 预先冷却的乙醇 400 μl 混合,12 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,仔细吸干残余乙醇,再打开离心管盖,室温静置 2 h,使其完全挥发。加入 30 μl 复温的 TE 溶液使 DNA 溶解,混合均匀后放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱,备用。

PCR 反应体系:12.5 μl 2 $\times$ Taq Mix、9.5 μl 去离子水、*Sirt3* 或 Alb-Cre 基因鉴定引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μl 和提取的小鼠 DNA(100 ng/ μl)1 μl 。loxP 和 Alb-Cre 的 PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min;98 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,65 $^{\circ}\text{C}$ (−0.5 $^{\circ}\text{C}/\text{循环}$)、30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s,20 个循环;98 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s,20 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min。基因鉴定引物序列见表 1。在 PCR 扩增后,将产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,并将凝胶置于化学发光凝胶成像分析系统中进行拍照观察。

表 1 肝细胞特异性 *Sirt3* 基因敲除小鼠的基因型鉴定引物列表

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增产物(bp)
Sirt3-F	GGAAACACAGACTCGGGTTACACGA	WT: 342
Sirt3-R	TGGCCAGATGGAACCTTAGAGTTGG	Targeted: 423
Alb-F	GGCAGTCTGGTACTTCCAAGCT	WT: 0
Alb-R	TAGCTACCTATGCGATCCAAACAAC	Targeted: 340

1.2.3 免疫荧光双染检测小鼠肝细胞中 *Sirt3* 表达

取 6 周龄的 *Sirt3* ^{Δhep} 小鼠和 *Sirt3* ^{fllox/fllox} 小鼠肝组织,多聚甲醛固定过夜。OCT 包埋后,进行冰冻切片。PBS 洗 3 次,使用 PBS 稀释的 Triton X-100 室温通透 30 min,PBS 洗 3 次,5% BSA/PBS 封闭液室温封闭 1 h。加入抗 Albumin(1 : 150)、抗 *Sirt3* 抗体(1 : 100),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS 洗 3 次,加入荧光二抗(1 : 400)在室温下孵育 30 min,PBS 洗 3 次,并用激光共聚焦显微镜拍照观察。

1.2.4 小鼠原代肝细胞的分离提取 利用改良版两步灌注法提取原代肝细胞,将 6 周龄的两组小鼠麻醉后消毒,打开腹腔。暴露肝门静脉,平行插入留置针,用 37 $^{\circ}\text{C}$ 、0.5 mmol/L 的 EGTA 灌洗液 I 按 5 ml/min 流速进行肝灌注约 25 ml,灌入的同时剪开下腔静脉,随后用灌洗液 II(含胶原酶 IV 的 DMEM 高糖培养基)匀速灌注约 25 ml 至肝软塌至出现破裂。剪下肝放置培养皿中,加入 15 ml 完全培养基,撕裂肝包膜,形成肝细胞混悬液,用 70 μm 细胞网滤过,收集滤液。400 r/min 离心 5 min,弃上清液,重复多

次,即得小鼠原代肝细胞。

1.2.5 Western blot 检测 *Sirt3* 的表达 在上述分离获得的 *Sirt3* ^{Δhep} 小鼠和对照组 *Sirt3* ^{fllox/fllox} 小鼠的原代肝细胞中,加入裂解液,提取总蛋白,同时提取小鼠的心、脾、肺和肾组织总蛋白。制备 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶,上样电泳,将其置于 PVDF 薄膜上,然后用牛奶封闭,孵育抗 *Sirt3* 抗体(1 : 1 000)、 β -actin 抗体(1 : 1 000),置于冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,在进行 TPBS 洗脱之后,将二抗(1 : 2 000)在室温下孵育 2 h,并且使用化学发光成像系统进行显影。通过使用 ImageJ 软件分析结果,测量了条带的灰度值,并计算出各组目的条带与内参 β -actin 的比值,以反映目的蛋白的相对表达水平,并对各组之间的差异进行了比较。

1.2.6 HE 染色 取小鼠肝、心、脾、肺和肾组织进行包埋、切片,将石蜡切片放入二甲苯溶液中去石蜡后,依次用 100%、95%、85%、70% 的乙醇水化,苏木精染色 5 min,用流动水冲洗,0.1% 的盐酸乙醇进行分化,然后用流动水冲洗,在伊红染液中 2 s 后,再用流动水冲洗,最后依次经 70%、85%、95%、100% 乙醇进行脱水,二甲苯透明,中性树脂封片后在玻片扫描仪下观察。

1.3 统计学处理 将实验数据输入 SPSS 26.0 软件中并进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 *t* 检验对两组进行组间比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝细胞特异性 *Sirt3* 基因敲除小鼠的基因型鉴定结果 *Sirt3* ^{fllox/fllox} /Alb-Cre 小鼠与 *Sirt3* ^{fllox/fllox} 小鼠交配产生子代基因型鉴定结果见图 2。在 DNA 样本中,若存在 *Sirt3* ^{fllox/fllox} ,则只扩增出 423 bp 长度的片段;若存在 *Sirt3* ^{$\text{fllox}/-$} ,则同时扩增出 342 bp 的片段;若样本含有 *Cre* 基因,那么会扩增出 340 bp 的片段。正如图 2A 所示,小鼠编号 1、3、4、5、7、8 和 9 都携带着 423 bp 长度的 *Sirt3* ^{fllox/fllox} 基因;而在图 2B 中,小鼠编号 1、2、3、5、7、8 和 9 都有携带 340 bp 长度的 *Cre* 基因的特征。在这些实验中,编号为 1、3、5、7、8 和 9 的是 *Sirt3* ^{fllox/fllox} /Alb-Cre 小鼠,即 *Sirt3* ^{Δhep} 小鼠,而编号 4 的是 *Sirt3* ^{fllox/fllox} 小鼠。

2.2 *Sirt3* ^{Δhep} 小鼠肝细胞中 *Sirt3* 的表达情况 由于白蛋白是肝细胞特异性标记蛋白,为了验证 *Sirt3* 在 *Sirt3* ^{Δhep} 小鼠肝细胞中被敲除,首先使用免疫荧光双染法检测 *Sirt3* 和白蛋白在小鼠肝组织中的共定

位情况,其中红色荧光蛋白标记为白蛋白,绿色荧光蛋白标记为 Sirt3。图 3 结果显示,*Sirt3^{flax/flax}* 小鼠肝细胞中 Sirt3 荧光强度较强,有明显表达,而 *Sirt3^{Δhep}* 组小鼠肝细胞中 Sirt3 蛋白基本不表达,提示肝细胞 *Sirt3* 基因敲除成功。

2.3 Western blot 检测小鼠肝细胞中 Sirt3 蛋白的

表达情况 为进一步确证 *Sirt3* 在 *Sirt3^{Δhep}* 小鼠肝细胞中被敲除,通过 Western blot 检测 Sirt3 蛋白在小鼠原代肝细胞中的表达。结果如图 4 所示,与 *Sirt3^{flax/flax}* 小鼠相比,*Sirt3^{Δhep}* 组的小鼠肝细胞中 Sirt3 蛋白表达减少,下降约 90% ($t = 32.861, P < 0.01$),提示肝细胞特异性 *Sirt3* 敲除小鼠模型成功构建。

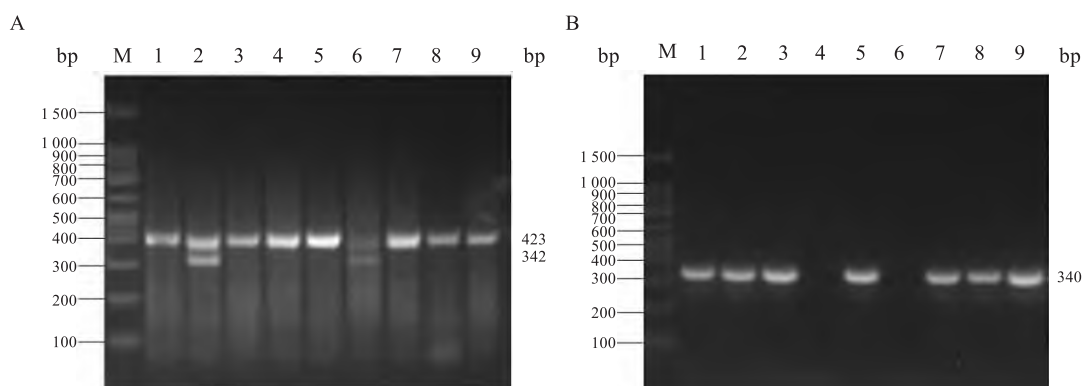


图 2 *Sirt3^{flax/flax}/Alb-Cre* 小鼠基因型 PCR 鉴定结果

A: *Sirt3^{flax/flax}* 基因型 PCR 鉴定结果; B: Alb-Cre 基因型 PCR 鉴定结果; M: Marker; 1~9: 实验小鼠编号

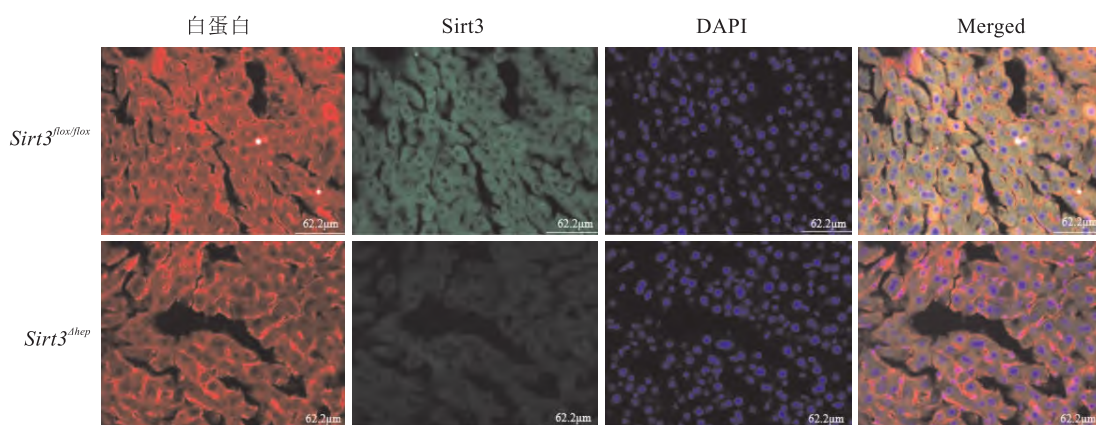


图 3 免疫荧光双染检测小鼠肝细胞中 Sirt3 和白蛋白表达情况

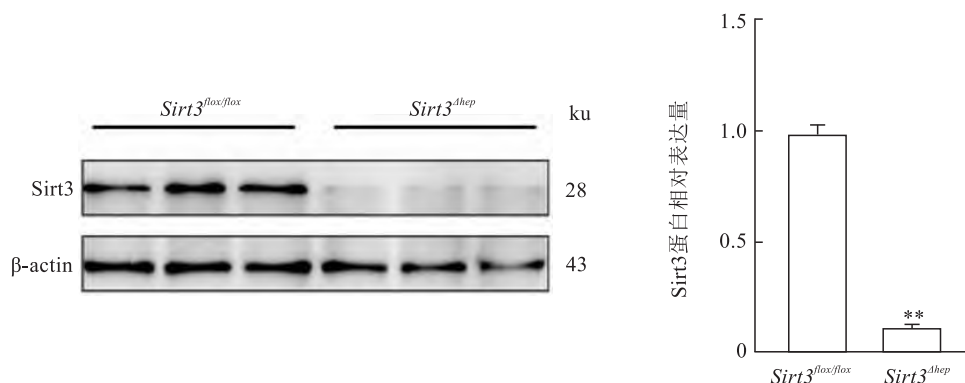


图 4 Sirt3 在两组小鼠原代肝细胞中蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

与 *Sirt3^{flax/flax}* 比较: ** $P < 0.01$

2.4 Western blot 检测小鼠心、脾、肺、肾组织中 Sirt3 蛋白的表达情况 为了观察 *Sirt3*^{Δhep} 小鼠其他主要脏器组织中 Sirt3 表达有无变化,分别提取心脏、脾、肺、肾组织蛋白,Western blot 检测 Sirt3 蛋白表达。如图 5 所示,*Sirt3*^{flax/flax} 组与 *Sirt3*^{Δhep} 组小鼠的心、脾、肺及肾脏中均有 Sirt3 蛋白表达;与 *Sirt3*^{flax/flax} 小鼠相比,*Sirt3*^{Δhep} 组小鼠的心、脾、肺及肾脏中 Sirt3 蛋白表达量无明显差异($t = 0.000, 0.211, 1.234, 0.353$, 均 $P > 0.05$),提示构建的 *Sirt3*^{Δhep} 小鼠 Sirt3 蛋白的表达在其他脏器中不受影响。

2.5 *Sirt3*^{Δhep} 小鼠组织的 HE 染色结果 肝组织 HE 染色显示,两组小鼠肝脏细胞形态正常、排列规则且结构完整(图 6A),肝细胞的核呈现为圆形并位于中央,肝窦保持正常状态。肝细胞索以放射性方式排列,其细胞质着色一致,且没有发现炎症细胞的渗透。提示肝细胞特异性敲除 *Sirt3* 基因对肝组织的形态结构及病理特征并无明显影响。

进一步观察肝细胞特异性敲除 *Sirt3* 基因对其其他主要组织器官的影响,HE 染色结果如图 6B 所示,两组小鼠的心肌纤维结构特征完整、形态清楚、排列整齐;脾脏组织结构清晰,边缘区清晰结构完

整;肺部的组织构造显示正常,肺泡之间的间隔分布比较均匀,没有出现渗出或其他炎症迹象;而肾脏形态完整,结构清晰可见,肾小球和肾小囊的囊腔大小正常,提示各组织形态学无明显改变。以上结果提示肝细胞特异性敲除 *Sirt3* 基因对肝脏及主要器官的形态结构无明显影响。

3 讨论

由于 C57BL/6 小鼠遗传背景清晰,且其应用范围广泛,除了被应用于各类模型的造模,也被用于制备不同的基因工程小鼠,以更深入地进行相应基因功能性及药理学、药效学研究。研究人员通过 Cre-loxP 系统建立不同的基因敲除 C57BL/6 小鼠模型^[10-11],可以为不同类型疾病的研究提供良好的模型基础。

已有研究^[12]结果显示,全身敲除 *Sirt3* (*Sirt3* KO)小鼠在高脂饮食中表现出更严重的高脂血症和脂肪性肝炎,提示 *Sirt3* 在肝脏疾病中可能具有十分重要的作用,然而也有研究^[13]显示,全身敲除 *Sirt3* 的小鼠也出现了胰岛、心脏功能的损害,因此,全身敲除 *Sirt3* 的小鼠对于研究肝细胞 *Sirt3* 在肝脏疾病中

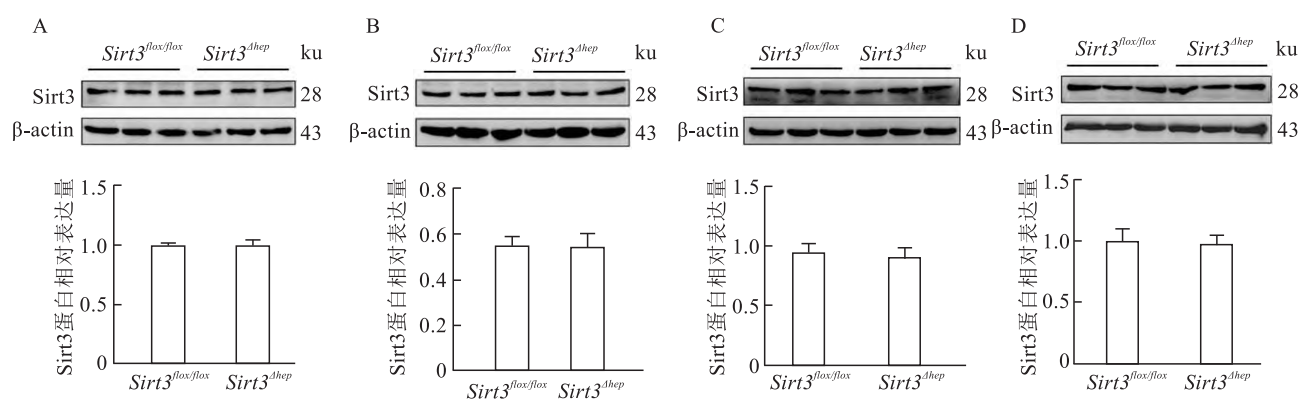


图 5 *Sirt3* 在其他组织器官中蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

A: 心脏组织 *Sirt3* 蛋白的比较; B: 脾脏组织 *Sirt3* 蛋白的比较; C: 肺组织 *Sirt3* 蛋白的比较; D: 肾脏组织 *Sirt3* 蛋白的比较

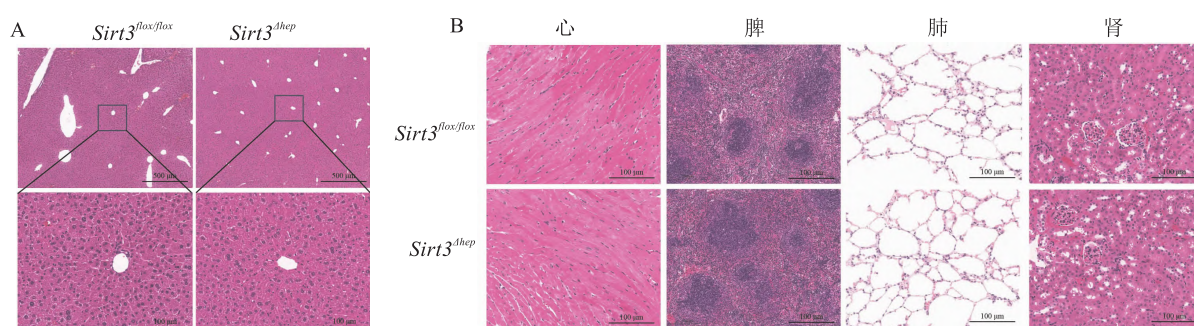


图 6 小鼠各脏器组织 HE 染色图

A: 小鼠肝组织 HE 染色图; B: 小鼠心脏、脾脏、肺、肾脏组织 HE 染色图

的作用可能会受到其他疾病的影响,故全身敲除 *Sirt3* 小鼠在该研究领域中的应用受到限制^[14]。因此,建立肝细胞特异性 *Sirt3* 敲除小鼠模型十分必要。

已有研究通过采用基因编辑技术^[15]成功创建了仅在肝细胞中敲除 *Sirt3* 基因的小鼠模型。使用的 Cre 重组酶能够识别并定位 *Sirt3* 基因两端的两个 loxP 位点,并能够切除这两个位点之间的 *Sirt3* 基因序列,从而敲除 *Sirt3* 基因。本研究对 4 周左右的小鼠进行鉴定,成功筛选出 *Sirt3*^{Δhep} 和 *Sirt3*^{lox/lox} 小鼠。免疫荧光双染法和 Western blot 法检测显示 *Sirt3*^{lox/lox} 小鼠肝细胞中 *Sirt3* 蛋白表达正常,而 *Sirt3*^{Δhep} 小鼠肝细胞中 *Sirt3* 蛋白明显降低,提示肝细胞特异性 *Sirt3* 敲除小鼠模型构建成功。HE 染色结果显示,两组小鼠的肝脏组织形态学及病理特征并无明显差异,心脏、脾脏、肺及肾脏等组织形态学也均无明显差异,提示肝细胞特异性敲除 *Sirt3* 对心、脾、肺和肾的器官的形态结构无明显影响。本研究成功建立了肝细胞特异性 *Sirt3* 基因敲除鼠模型,实现了 *Sirt3* 在肝细胞中的特异性敲除,可以为未来关于 *Sirt3* 在肝脏疾病和其他各种疾病中作用的研究,以及相关的分子调控机制提供可靠的实验动物模型,这将有助于将来对 *Sirt3* 的功能和机制更深入地研究,并为疾病的治疗和预防提供理论基础。

参考文献

- [1] Jin L, Galonek H, Israelian K, et al. Biochemical characterization, localization, and tissue distribution of the longer form of mouse SIRT3[J]. Protein Sci, 2009, 18(3): 514–25.
- [2] Gong J, Tu W, Liu J, et al. Hepatocytes: a key role in liver inflammation[J]. Front Immunol, 2023, 13: 1083780.
- [3] Zhao P, Sun X, Chagga C, et al. An AMPK-caspase-6 axis controls liver damage in nonalcoholic steatohepatitis[J]. Science, 2020, 367(6478): 652–60.
- [4] Jin K, Shi Y, Zhang H, et al. A TNFα/Miz1-positive feedback

- loop inhibits mitophagy in hepatocytes and propagates non-alcoholic steatohepatitis[J]. J Hepatol, 2023, 79(2): 403–16.
- [5] Stravitz R T, Lee W M. Acute liver failure[J]. Lancet, 2019, 394(10201): 869–81.
- [6] Widjaja A A, Singh B K, Adami E, et al. Inhibiting interleukin 11 signaling reduces hepatocyte death and liver fibrosis, inflammation, and steatosis in mouse models of nonalcoholic steatohepatitis[J]. Gastroenterology, 2019, 157(3): 777–92. e14.
- [7] Liu J, Li D, Zhang T, et al. SIRT3 protects hepatocytes from oxidative injury by enhancing ROS scavenging and mitochondrial integrity[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3158.
- [8] Li S, Dou X, Ning H, et al. Sirtuin 3 acts as a negative regulator of autophagy dictating hepatocyte susceptibility to lipotoxicity[J]. Hepatology, 2017, 66(3): 936–52.
- [9] Wu L, Yan X, Sun R, et al. Sirt3 restricts tumor initiation via promoting LONP1 deacetylation and K63 ubiquitination[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 81.
- [10] 魏琦, 朱学敏, 刘潇一, 等. 诱导型巨噬细胞特异性敲除 GRK2 基因小鼠模型的构建及应用[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(4): 534–40.
- [11] 黄紫薇, 赵殿元, 徐龙, 等. 利用 Cre-Loxp 技术构建标记肝星状细胞的小鼠模型[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(7): 1065–70.
- [12] Hirschey M D, Shimazu T, Jing E, et al. SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome[J]. Mol Cell, 2011, 44(2): 177–90.
- [13] Liu X, Xie X, Li D, et al. Sirt3-dependent regulation of mitochondrial oxidative stress and apoptosis contributes to the dysfunction of pancreatic islets after severe burns[J]. Free Radical Bio Med, 2023, 198: 59–67.
- [14] Niu T, Zhi Y, Wei L, et al. Sirtuin 3 controls cardiac energetics and protects against oxidative stress in electromagnetic radiation-induced cardiomyopathy[J]. Free Radic Biol Med, 2023, 205: 1–12.
- [15] Loesch R, Caruso S, Paradis V, et al. Deleting the β-catenin degradation domain in mouse hepatocytes drives hepatocellular carcinoma or hepatoblastoma-like tumor growth[J]. J Hepatol, 2022, 77(2): 424–35.

Construction of hepatocyte-specific *Sirt3* gene knockout mouse model

Xu Yaping¹, Wang Yuhang¹, Chen Tingting¹, Li Nan¹, Gao Pingping¹, Li Ling¹, Wang Hua², Sun Wuyi¹

(¹Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Drugs, Ministry of Education, Hefei 230032; ²Dept of Oncology, First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct hepatocyte-specific silence information regulator 3 (*Sirt3*) gene knockout (*Sirt3*^{Δhep}) mice by Cre-loxP technique, and to provide an important animal model for further studying the biological function of the hepatocyte *Sirt3* gene in diseases. **Methods** LoxP-labeled *Sirt3*^{lox/lox} mice were mated with Alb-Cre homozygous (Alb-Cre^{+/+}) mice, and the F1 generation *Sirt3*^{lox/-}/Alb-Cre^{+/+} mice were then mated with

萝卜硫素通过调节 ALOX5/NF- κ B 信号通路调控巨噬细胞糖酵解抑制糖尿病肾病进展

乌日娜,丁海东,常宏,孙娜娜,张磊

摘要 **目的** 探讨萝卜硫素(SFN)调节花生四烯酸 5-脂氧合酶基因(arachidonic acid 5-lipoxygenase, ALOX5)/核因子 kappa B(NF- κ B)信号通路调节巨噬细胞糖酵解对糖尿病肾病(DN)进展的影响。**方法** 生物信息学分析 SFN 治疗 DN 的靶基因。使用 30 mmol/L 高葡萄糖(HG)处理人近端肾小管上皮细胞系(HK-2 细胞)诱导体外 DN 模型。将 HK-2 细胞分为如下组:正常糖(NG)组、HG 组、HG + SFN(3 mmol/L)组、HG + ALOX5 组、HG + SFN(3 mmol/L) + ALOX5 组、HG 处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组、HG + SFN(3 mmol/L)处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组、HG + ALOX5 转染处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组、HG + SFN(3 mmol/L) + ALOX5 转染处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组。CCK-8 检测细胞活力,原位末端脱氧核苷酸转移酶标记(TUNEL)法检测细胞凋亡;葡萄糖和乳酸试剂盒检测各组细胞中葡萄糖和乳酸水平;Western blot 检测各组细胞中 ALOX5、NF- κ B 以及糖酵解相关蛋白己糖激酶-2(HK2)、丙酮酸激酶 M2(PKM2)、葡萄糖转运蛋白 1(GLUT1)的表达;使用链脲佐菌素(STZ)构建 DN

小鼠模型,DN 小鼠给与 SFN(0.5 mg/kg)治疗;检测小鼠各项生化指标,HE 染色检测肾组织病理变化;Western blot 检测小鼠肾脏巨噬细胞中糖酵解相关蛋白己糖激酶-2(HK2)、丙酮酸激酶 M2(PKM2)、葡萄糖转运蛋白 1(GLUT1)的表达。**结果** 生物信息学分析结果显示 ALOX5 是 SFN 治疗 DN 的靶基因。与 HG 组相比,SFN 处理增强 HK-2 细胞活力并抑制细胞凋亡($P < 0.05$);同时,SFN 处理抑制 HG 诱导的巨噬细胞糖酵解相关蛋白的表达,减弱巨噬细胞介导的 HK-2 细胞损伤($P < 0.05$);Western blot 结果表明 SFN 抑制 ALOX5 和 NF- κ B 的表达($P < 0.05$);小鼠实验结果显示,SFN 治疗改善 DN 小鼠肾功能和肾组织病理学改变,抑制肾组织中巨噬细胞糖酵解相关蛋白的表达($P < 0.05$)。**结论**

SFN 通过抑制 ALOX5/NF- κ B 信号通路抑制巨噬细胞糖酵解从而改善 DN 进展。

关键词 萝卜硫素;糖尿病肾病;巨噬细胞;糖酵解;花生四烯酸 5-脂氧合酶;NF- κ B 信号通路

中图分类号 R 587.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0390-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.004

2024-01-15 接收

基金项目:2023 年度内蒙古自治区高校科研项目(编号:NJZY23104)

作者单位:内蒙古民族大学附属医院内分泌科,通辽 028000

作者简介:乌日娜,女,副主任医师,责任作者,E-mail:wurina223@

126.com

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是 2 型糖尿病最常见的微血管并发症^[1]。有文献^[2]报道,

Sirt3^{flox/flox} mice, and the F2 genotype of *Sirt3*^{flox/flox}/Alb-Cre^{+/+} mice were the *Sirt3*^{Δhep} mice constructed in this experiment. *Sirt3*^{flox/flox}/Alb-Cre^{-/-} (*Sirt3*^{flox/flox}) mice were the control mice. Mouse tail genome DNA was extracted and PCR was used to identify the genotypes of the offspring mice. Immunofluorescence was used to detect Sirt3 expression in mouse hepatocytes. Primary hepatocytes and tissue proteins of *Sirt3*^{Δhep} mice were extracted, and the expression of Sirt3 in mouse hepatocytes and other tissues was verified by Western blot. HE staining was used to observe mice's liver, heart, spleen, and lung tissue structure. **Results** *Sirt3*^{Δhep} mice were successfully identified. Immunofluorescence and Western blot results demonstrated a significant decrease in the expression of Sirt3 in the hepatocytes of these mice compared to the control group ($P < 0.01$). At the same time, there was no significant difference in the expression of Sirt3 in the heart, spleen, kidney, and lung tissues of *Sirt3*^{Δhep} mice compared with the control group ($P > 0.05$). The results of HE staining showed that the histological characteristics of the liver, heart, spleen, lungs, kidneys, and other major organs of *Sirt3*^{Δhep} mice were not significantly different from those of the control group mice. **Conclusion** Hepatocyte-specific *Sirt3* gene knockout mice are successfully constructed, which provides an animal model to explore further the role and molecular mechanism of the hepatocyte *Sirt3* gene in diseases.

Key words hepatocyte; Sirt3; gene knockout; *Sirt3*^{Δhep} mice; Cre-loxP; identification of genotype