

Sestrin1 参与调控小鼠肝脏细胞糖异生

郭艳芳, 耿超, 解相宏, 陈恩惠, 郭泽宇, 张明龙, 刘晓军*

中国医学科学院基础医学研究所 北京协和医学院基础学院 重大疾病共性机制研究全国重点实验室, 北京 100005

摘要:目的 研究应激诱导蛋白1 (SESN1) 在小鼠肝脏糖异生途径中的作用及调节机制。方法 RT-qPCR 检测 *SESN1* 在 C57BL/6J 小鼠禁食条件下肝脏组织以及用佛司可林 (Fsk) 与地塞米松 (Dex) 处理的原代肝细胞中的 mRNA 表达水平。通过质粒转染 HepG2 细胞, RT-qPCR 检测 *SESN1* 过表达对糖异生相关基因 *PGC-1 α* , *PEPCK*, *G6Pase* 的 mRNA 表达水平的影响。利用双荧光素酶报告系统研究 *SESN1* 在 HepG2 细胞中对 *PGC-1 α* 的启动子活性的影响。在 HepG2 细胞中, 通过过表达 *SESN1* 同时抑制 *SIRT1* 表达检测 *SESN1* 对 *PGC-1 α* 去乙酰化状态的影响; 通过敲低 *SIRT1* 表达检测其是否介导了 *SESN1* 诱导糖异生相关基因 mRNA 水平的变化。结果 *SESN1* 在饥饿的 C57BL/6J 小鼠肝脏组织和佛司可林 (Fsk) 和地塞米松 (Dex) 处理的原代肝细胞中的 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$)。在 HepG2 细胞中过表达 *SESN1* 促进了 *PGC-1 α* , *PEPCK*, *G6Pase* 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.001$) 并促进 *PGC-1 α* 的启动子活性 ($P < 0.001$)。SESN1 的过表达降低了原代肝细胞中 *PGC-1 α* 的乙酰化水平, 利用 Sirt 家族抑制剂 NAM 和 shRNA 腺病毒分别干扰 *SIRT1* 表达, 均拮抗了 *SESN1* 对 *PGC-1 α* 的去乙酰化作用, 同时 *SIRT1* 诱导的 *PGC-1 α* , *PEPCK* 和 *G6Pase* 的表达也明显受损 ($P < 0.0001$)。结论 *SESN1* 参与调控小鼠肝脏细胞糖异生, 可能依赖于 *SIRT1*。

关键词: 肝脏糖异生; 应激诱导蛋白1 (SESN1); 沉默信息调节蛋白1 (SIRT1); 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α)

中图分类号: R587.1 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2024.02.0141

Sestrin1 is involved in the regulation of gluconeogenesis in mouse liver cells

GUO Yanfang, GENG Chao, XIE Xianghong, CHEN Enhui, GUO Zeyu, ZHANG Minglong, LIU Xiaojun*

State Key Laboratory of Common Mechanism Research for Major Diseases, Institute of Basic Medical Sciences CAMS,

School of Basic Medicine PUMC, Beijing 100005, China

Abstract: Objective To investigate the role and regulatory mechanism of stress-inducing protein 1 (SESN1) in liver gluconeogenesis of fasting mice. **Methods** RT-qPCR was used to detect mRNA expression of *SESN1* in liver tissues of C57BL/6J mice and primary mouse hepatocytes treated with forskolin (Fsk) and dexamethasone (Dex). HepG2 cells were transfected with plasmids and the effects of *SESN1* overexpression on mRNA expression of gluconeogenesis related genes *PGC-1 α* , *PEPCK* and *G6Pase* was detected by RT-qPCR. The effect of *SESN1* on the promoter activity of *PGC-1 α* in HepG2 cells was studied using a dual luciferase reporter system. The effect

收稿日期: 2023-09-23 修回日期: 2023-11-27

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFC2504002, 2022YFC2504003); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (CIFMS2021-I2M-1-016)

* 通信作者 (corresponding author): xiaojunliu@ibms.pumc.edu.cn

of SESN1 on PGC-1 α deacetylation was detected by overexpression of SESN1 and inhibition of SIRT1 expression. By knocking down SIRT1 expression, we detected whether it mediated the changes in mRNA levels of SESN1 induced gluconeogenesis related genes. **Results** The mRNA expression of SESN1 was significantly increased in liver tissues of starved C57BL/6J mice and in primary hepatocytes treated with Fsk and Dex ($P < 0.001$). Overexpression of *SESN1* in HepG2 cells promoted mRNA expression of *PGC-1 α* , *PEPCK* and *G6Pase* ($P < 0.001$) and promoter activity of *PGC-1 α* ($P < 0.001$). Over-expression of SESN1 decreased the acetylation level of PGC-1 α in primary hepatocytes. Sirt family inhibitors NAM and shRNA adenovirus interfered with SIRT1 expression respectively, and antagonized the deacetylation effect of SESN1 on PGC-1 α . The expression of *PGC-1 α* , *PEPCK* and *G6Pase* induced by SIRT1 was also significantly impaired ($P < 0.0001$). **Conclusions** *SESN1* regulates liver gluconeogenesis in mice with a *SIRT1*-dependent mechanism.

Key words: hepatic gluconeogenesis; stress-inducing protein 1 (SESN1); Sirtuin 1 (SIRT1); peroxisome proliferators-activated receptors gamma co-activator 1 α (PGC-1 α)

糖尿病作为一类严重威胁人类身体健康的慢性代谢性疾病,一直受到人们的广泛关注。近年来,糖尿病患者不断增加,深入研究糖尿病的发病机制和治疗药物迫在眉睫。糖尿病的主要特征为血糖升高,主要由胰岛素分泌缺乏和/或胰岛素抵抗引起^[1]。身体的主要糖异生部位就是肝脏,它是代谢过程的核心部分。沉默信息调节蛋白 1 (Sirtuin 1, SIRT1) 是一种去乙酰化酶以及酵母 SIR2 蛋白的一种直系同源物,可直接将细胞代谢状态(通过 NAD⁺)与染色质结构与基因的表达调控密切连接起来^[2]。肝葡萄糖的产生主要是由肝糖异生和糖原分解所决定的,磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(phosphoenolpyruvate carboxy-lase, PEPCK)和葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G6Pase)的激活影响着糖异生的发生,抑制 G6Pase 和 PEPCK 的表达,可以有效减少体内肝葡萄糖的产生^[3]。有研究发现,过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (peroxisome proliferators-activated receptors gamma co-activator 1 α , PGC-1 α) 有效调控了肝糖异生的关键酶的功能及表达。应激诱导蛋白 (Sestrin, SESN) 家族包括 SESN1、SESN2 和 SESN3,它们是一类进化高度保守的蛋白质,在体外,SESN 表现出氧化还原酶的活性。有研究发现 SESN2 的缺失能加重葡萄糖耐受不良、脂肪肝变性和胰岛素抵抗,表明应激诱导的 SESN 蛋白家族,可能在调控以及维持葡萄糖和脂质代谢的稳态方面具有不可或缺的作用^[4]。但 SESN1 在小鼠肝脏糖异生中的作用及调节机制还有待研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: SPF 级 8 周龄的雄性 C57BL/6J (中国医学科学院基础医学研究所实验动物中心)。

1.1.2 细胞: 人肝癌细胞系 HepG2 (本实验室保存)。

1.1.3 质粒和腺病毒: SESN1-Flag 表达质粒、PGC-1 α -Flag 表达质粒、pcDNA3.1 质粒、pRL-TK 质粒、报告基因质粒 pGL3-Basic-PGC-1 α 启动子,带 GFP 标签的腺病毒 (Ad-GFP),对照干扰腺病毒 (Ad-shCON), *SIRT1* 干扰腺病毒 (Ad-shSIRT1) (本实验室保存)。

1.1.4 主要试剂: SDS, Tris, 甘氨酸 (AMRESCO 公司); 蛋白酶抑制剂, Trizol (Invitrogen 公司); DMEM 基础培养基, 常规 RPMI-1640 细胞培养基以及胎牛血清 (Gibco 公司); PierceTM BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 公司); PEI; 佛司可林 (forskolin, Fsk) 与地塞米松 (dexamethasone, Dex); Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System 和 SYBR Green I Q-PCR kit (Promega 公司); 抗 SIRT1 抗体 (Cell Signal Technologies); 抗 FLAG 抗体 (Sigma 公司); 抗乙酰赖氨酸抗体 (Millipore 公司), 抗 GAPDH 抗体 (Abmart 公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠原代肝细胞的分离和培养: 于 6 孔板接种 C57BL/6J 小鼠的原代肝细胞, 培养至贴壁后分别感染对照干扰腺病毒 (Ad-shCON), *SIRT1* 干扰腺病毒 (Ad-shSIRT1), 感染 24~48 h 后收集细胞。具

体实验方法见参考文献[5]。在6孔板中以 $(2\sim4)\times 10^4$ 个/孔的数量接种HepG2细胞,培养至细胞汇合度为60%~70%后进行转染,对照组转染pcDNA3.1质粒,实验组同时转染SESN1-FLAG和PGC-1 α -FLAG质粒,每组各设3个复孔,转染方式参照转染试剂说明书。针对Sirt1的shRNA(ShSIRT1)序列是GATGAAGTTGACCTCCTCA,对照shRNA(ShCON)序列是CTTACGCTGAGTACTTCGA。

1.2.2 双荧光素酶报告基因检测启动子活性:用荧光素酶报告质粒(200 ng)和pRL-TK(10~20 ng)将一定数量的表达载体共转染入HepG2细胞。培养24~48 h后,用Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System商品化试剂盒检测荧光素酶的活性,根据对照组进行均一化处理。

1.2.3 RT-qPCR检测mRNA相对表达量:采用Trizol法从人肝癌细胞株或原代肝细胞中提取总RNA。用Super Script[™]反转录酶将约2 μ g的总RNA逆转录为cDNA。在Bio-Rad CFX系统上使用SYBR Green I Q-PCR试剂盒进行实时定量反转录聚合酶链式反应。所有基因表达数据均归一化为 β -actin表达水平,最终得到mRNA的相对表达量。具体的引物序列见表1。

1.2.4 蛋白质乙酰化的测定:用真核转染试剂将所构建的表达载体导入HepG2细胞。细胞用含有蛋白酶抑制的RIPA裂解液(强)进行裂解,通过离心收集上清。Protein G琼脂糖珠用RIPA裂解液(强)预清洗,然后用抗FLAG一抗将蛋白旋转孵育2 h(4 $^{\circ}$ C)。接着将细胞裂解液加入Protein G琼脂糖珠旋转孵育过夜(4 $^{\circ}$ C)。第二天早上将琼脂糖珠洗涤6次,在缓冲液A(1% NP-40和0.1 mmol/L Na₃VO₄)中洗涤3次,在缓冲液B(0.01 mol/L Tris、pH 7.5、1 mmol/L EDTA、

0.1 mol/L氯化钠和0.1 mmol/L Na₃VO₄)中洗涤3次。用1 \times SDS缓冲液洗脱磁珠中的抗原,100 $^{\circ}$ C金属浴10 min后用常规的Western blot测定蛋白质表达量。

1.3 统计学分析

运用Adobe Illustrator CC 2019和GraphPad Prism 8.0软件进行作图和统计学分析。组间比较采用 t 检验,所有实验数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果

2.1 肝组织中SESN1的表达受营养状态的控制。

禁食24 h和48 h都诱导了小鼠肝脏SESN1的mRNA表达水平增加($P<0.001$),而重新喂养12 h则逆转了这一诱导效果($P<0.001$) (图1A)。用Fsk和Dex共同处理模拟细胞中胰高血糖素和其他糖皮质激素的禁食作用可以诱导SESN1 mRNA表达水平的上调($P<0.001$) (图1B)。

2.2 SESN1提高原代肝细胞糖异生基因PGC-1 α 、PEPCK和G6Pase的表达水平

在小鼠原代肝细胞中,SESN1的过表达增加了PGC-1 α 及其靶基因,糖异生基因PEPCK和G6Pase的基因表达水平($P<0.001$) (图2A)。过表达SESN1增强了PGC-1 α 的启动子活性($P<0.001$),PGC-1 α 对其自身的启动子活性有作用($P<0.01$) (图2B)。

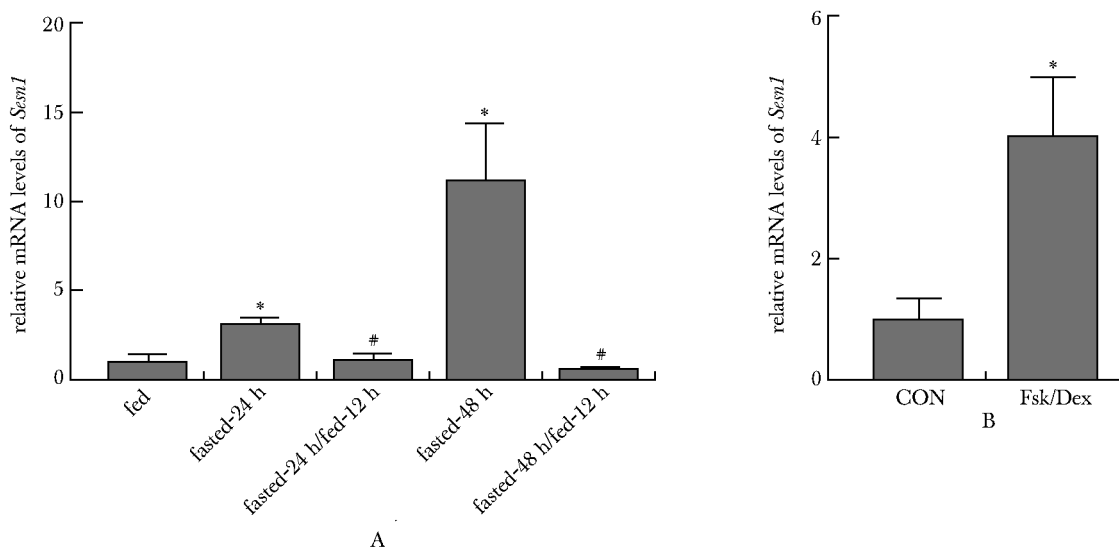
2.3 SESN1依赖SIRT1促进PGC-1 α 去乙酰化

SESN1的过表达降低了原代肝细胞中PGC-1 α 的乙酰化(图3A)。分别利用SIRT1家族抑制剂NAM和shRNA腺病毒干扰SIRT1表达,结果显示均拮抗了SESN1对PGC-1 α 的去乙酰化作用(图3B)。综上,SESN1促进PGC-1 α 的去乙酰化依赖于SIRT1。

表1 RT-qPCR引物序列

Table 1 Primer sequence of RT-qPCR

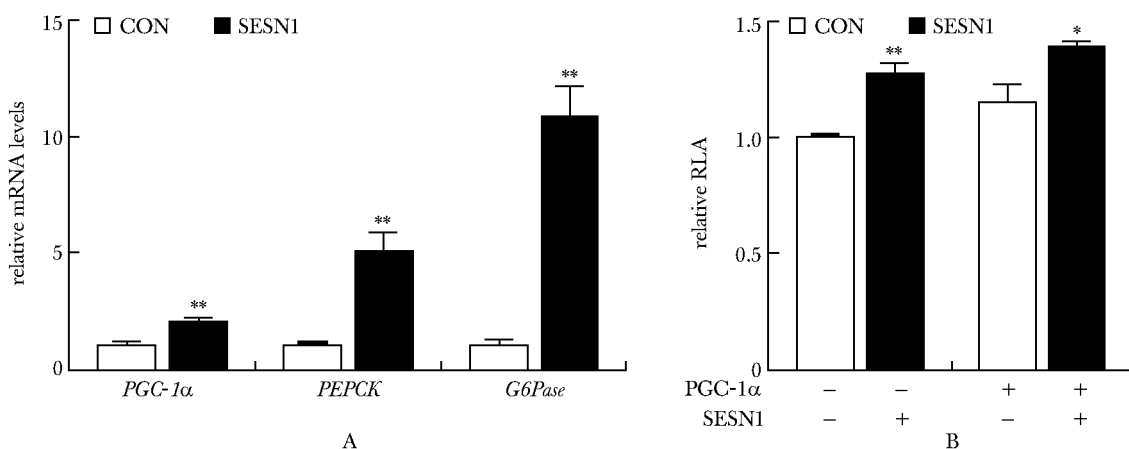
primer	forward primer(5'-3')	reverse primer(5'-3')
β -actin	CCAGCCTTCCTTCTTGGGTAT	TGCTGGAAGGTGGACAGTGAG
SESN1	AGGGCCTTCTGAAAGCAGAG	GAAGCGCGTC TGAAGGTGTG
PGC-1 α	GACATAGAGTGTGCTGCTCTG	CATTGTGTACTGGTTGGATATG
PEPCK	GTGTCATCCG CAAGCTGAAG	ATGGGCACTG TGTCTCTCTG
G6Pase	AGACTGGTTC AACCTCGTCT	TTCTTGGTCC GGTCTCACAG



* $P < 0.001$ compared with fed group; # $P < 0.001$ compared with fasted-24 h.

图1 禁食和 Fsk/Dex 处理诱导肝细胞中 *SESN1* mRNA 水平升高

Fig 1 Fasting and Fsk/Dex treatment induced increased *SESN1* mRNA levels in hepatocytes ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ compared with CON group.

图2 *SESN1* 促进 *PGC1-α*, *PEPCK*, *G6Pase* mRNA 水平的表达并激活 *PGC1-α* 的启动子活性

Fig 2 *SESN1* promoted the mRNA expression of *PGC1-α*, *PEPCK*, *G6Pase* and activated the promoter activity of *PGC1-α* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.4 *SESN1* 能诱导 *PGC1-α* 及依赖 *SIRT1* 的糖异生相关基因的表达

当利用 shRNA 腺病毒下调 *SIRT1* 的表达时, *SIRT1* 诱导的 *PGC1-α* ($P < 0.05$)、*PEPCK* ($P < 0.0001$) 和 *G6Pase* ($P < 0.0001$) 表达也明显降低(图4)。

3 讨论

糖异生是生物体将多种非糖物质转变成葡萄糖或糖原的过程,对维持空腹状态下血糖正常水平具有重要意义^[6]。在哺乳动物中,肝脏是机体糖脂代

谢重要器官,是通过糖原分解或糖异生途径产生内源性葡萄糖主要场所。在某些应激情况下,肝脏糖异生过度激活可导致多种代谢性疾病的发生。

SESN1 被认为是一种氧化应激中的关键抑制因子,越来越多的证据表明 *SESN1* 与许多肝脏疾病有关。过往的研究表明,营养过剩造成哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体(mammalian target of rapamycin complex, mTORC)和 p70S6 激酶(p70S6 kinase, p70S6K)的慢性激活,导致肥胖相关的代谢疾病,*SESN1* 作为一种应激诱导蛋白,能激活腺苷酸活化蛋

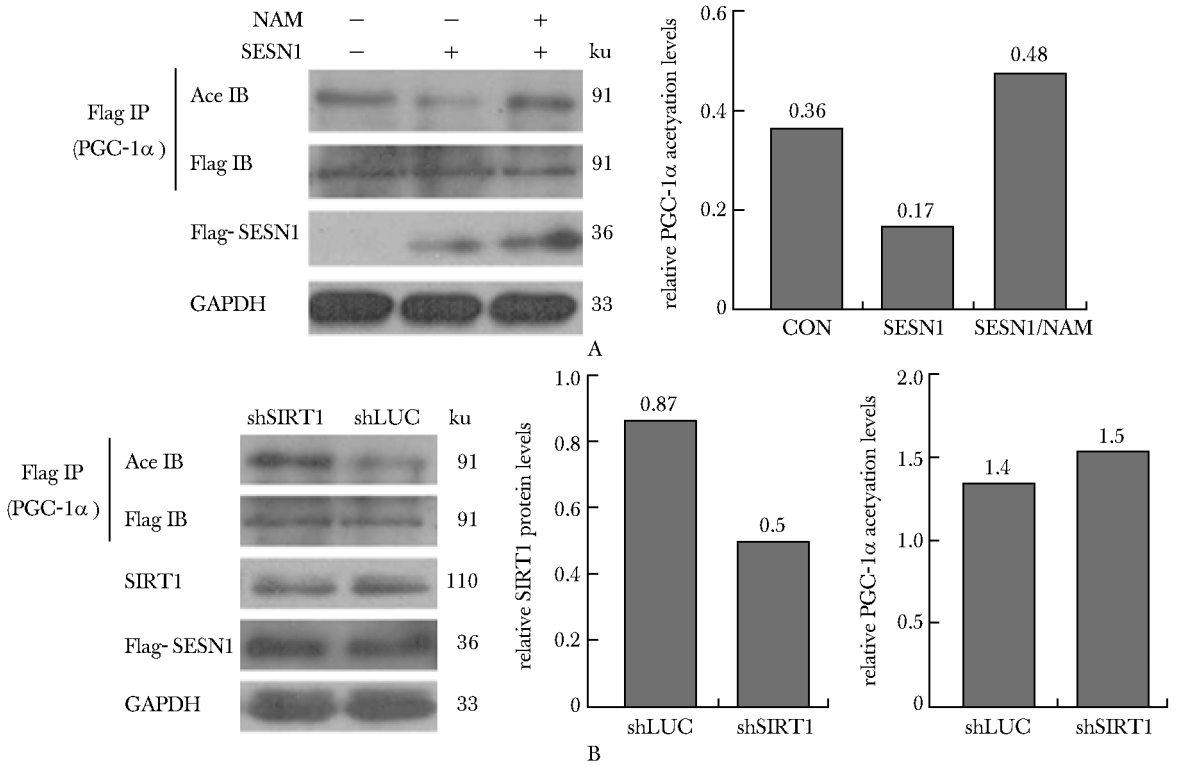
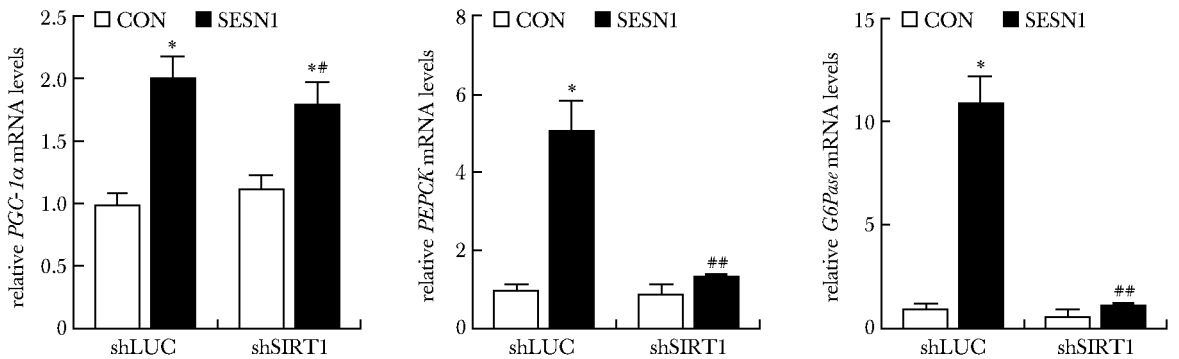


图3 SESN1 依赖于 SIRT1 促进 PGC-1α 的去乙酰化

Fig 3 SESN1 triggered the deacetylation of PGC-1α



* $P < 0.001$ compared with CON group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.0001$ compared with shLUC.

图4 RT-qPCR 检测 PGC-1α, PEPCK, G6Pase mRNA 水平的表达

Fig 4 RT-qPCR was used to detect the expression levels of PGC-1α, PEPCK and G6Pase mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 并抑制 mTORC1-S6K 的活性, SESN2 下调可加重肥胖诱导的 mTORC1-S6K 激活、糖耐量异常、胰岛素抵抗和肝病, 所有这些都可通过 AMPK 激活逆转^[7]。此外, 即使在没有营养过剩和肥胖的情况下, 同时去除 SESN2 和 SESN3 也会引起肝脏 mTORC1-S6K 的激活和胰岛素抵抗, 这些结果表明, 应激诱导的 SESN 蛋白家族在控制哺乳动物的脂肪

和葡萄糖代谢方面具有重要的动态平衡功能^[8]。在本研究中, 禁食不同时间的小鼠的肝脏和用 FSK 和 Dex 处理 6 h 的肝原代细胞中 SESN1 的 mRNA 表达水平均升高, 说明 SESN1 在肝脏中的表达与糖异生潜能之间存在相关性。此外, 有研究表明, PGC-1α 在正常的肝细胞中能激活 cAMP-PKA-CREB 信号通路, 可与肝细胞核因子-4α (HNF-4α) 和叉头盒转录因子 O1 (FOXO1) 相互作用, 从而诱

导 *G6Pase* 和 *PEPCK1* 的表达,小鼠禁食和再喂养也诱导肝脏 *PGC-1 α* 基因表达水平变化^[9]。本研究中,过表达 *SESN1* 促进 *PGC-1 α* 、*PEPCK* 和 *G6Pase* 的基因表达水平并增强了 *PGC-1 α* 的启动子活性,表明 *SESN1* 可能通过调控 *PGC-1 α* 、*PEPCK* 和 *G6Pase* 的表达影响肝脏糖异生。也有研究证实,在去乙酰化激活 *SIRT1* 后,其可以通过上调 *PGC-1 α* 的表达水平来保护肝组织^[10]。在本研究中,*SESN1* 的过表达降低了原代肝细胞中 *PGC-1 α* 的乙酰化。

分别利用 *Sirt* 家族抑制剂 *NAM* 和 *shRNA* 腺病毒干扰 *Sirt1* 表达,均拮抗了 *SESN1* 对 *PGC-1 α* 的去乙酰化作用,说明 *SESN1* 依赖于 *Sirt1* 促进 *PGC-1 α* 的去乙酰化。

综上所述,*SESN1* 能通过诱导 *PGC-1 α* 及糖异生相关基因 *PEPCK* 和 *G6Pase* 的表达来调控小鼠肝脏糖异生,可能与 *Sirt1* 的去乙酰化作用有关。本研究表明 *SESN1* 可能是糖代谢异常的重要新靶点,为未来糖尿病预防和临床诊疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes [J]. *Cell*, 2001, 104: 517-529.
- [2] Liang W, Li X, Li G, *et al.* *Sirt1/Foxo* axis plays a crucial role in the mechanisms of therapeutic effects of Erzhi Pill in ovariectomized rats [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 9210490. doi: 10.1155/2018/9210490.
- [3] 杨珣,苏东明.HRD1 在肝脏糖异生中的作用[J].*江苏医药*,2017,43:908-911.
- [4] Geng C, Xue Y, Yang JH, *et al.* *SIRT1* mediates sestrin1-induced improvement in hepatic insulin resistance [J]. *Biomed Environ Sci*, 2022, 35: 79-83.
- [5] Matsumoto M, Ogawa W, Teshigawara K, *et al.* Role of the insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in insulin-induced expression of sterol regulatory element binding protein 1c and glucokinase genes in rat hepatocytes [J]. *Diabetes*, 2002, 51: 1672-1680.
- [6] Wang Z, Dong C. Gluconeogenesis in cancer: function and regulation of *PEPCK*, *FBPase*, and *G6Pase* [J]. *Trends Cancer*, 2019, 5: 30-45.
- [7] Kim JS, Ro SH, Kim M, *et al.* *Sestrin2* inhibits *mTORC1* through modulation of *GATOR* complexes [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9502. doi:10.1038/srep09502.
- [8] Lee JH, Budanov AV, Talukdar S, *et al.* Maintenance of metabolic homeostasis by *Sestrin2* and *Sestrin3* [J]. *Cell Metab*, 2012, 16: 311-321.
- [9] Piccinin E, Villani G, Moschetta A. Metabolic aspects in NAFLD, NASH and hepatocellular carcinoma: the role of *PGC1* coactivators [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16: 160-174.
- [10] Rada P, Pardo V, Mobasher MA, *et al.* *SIRT1* controls acetaminophen hepatotoxicity by modulating inflammation and oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018; 28:1187-1208.