

王利红, 张伟, 陈章言. 苏姜猪组织中 *SIRT2* 基因表达分布研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(13): 55–58.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2019.13.015

苏姜猪组织中 *SIRT2* 基因表达分布研究

王利红¹, 张伟^{1,2}, 陈章言^{1,2}

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 江苏现代畜牧科技园, 江苏泰州 225300)

摘要: *SIRT2* 作为第三类去乙酰化酶 Sirtuins 家族一员, 通过催化不同的底物去乙酰化参与细胞周期调控、细胞代谢、细胞凋亡、基因沉默等许多生物学过程。在苏姜猪 14 个组织样中均检测到 *SIRT2* mRNA 的表达, 其中在心脏、肌肉、肝脏和脂肪组织中的表达较丰富; *SIRT2* 免疫阳性细胞主要分布于肌细胞、黏膜层细胞和脂肪细胞中, 表明 *SIRT2* 在苏姜猪组织中的表达具有广泛性, 且是许多生物学过程的重要参与因素之一。

关键词: *SIRT2* 基因; 苏姜猪; 组织表达谱; 免疫组化

中图分类号: S828.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2019)13–0055–04

SIRT2 (silent mating type information regulation 2 homolog 2) 是 Sirtuins 蛋白家族的一个成员, 在动物组织中分布广泛, 通过催化不同的底物去乙酰化参与细胞周期调控、细胞代谢、细胞凋亡、基因沉默等许多生物学过程^[1–2]。在体内外试验发现, 抑制 *SIRT2* 基因的转录可以提高 HIF1 α 的乙酰化水平, 导致脂肪酸氧化和能量解偶联下降, 此外, *SIRT2* 还可以去乙酰化作用 *PEPCK1* 基因, 调节细胞对葡萄糖浓度变化的应答, 表明 *SIRT2* 在调控糖脂代谢中发挥着关键的作用^[2–3]。截至目前, 针对母猪组织中 *SIRT2* 表达定位的研究, 特别是苏姜猪的研究鲜有报道。本研究通过实时荧光定量和免疫组织化学方法检测 *SIRT2* 在苏姜猪组织中的表达分布, 不仅丰富了 *SIRT2* 在猪各组织功能中的作用机制, 而且对于深入探索 *SIRT2* 在苏姜猪组织中的作用, 通过分子育种技术持续选育提高苏姜猪生产性能, 提供新的理论参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

随机选取饲养管理方式一致的 6 月龄健康苏姜猪母猪 3 头, 进行屠宰。屠宰后分别采集心脏、肝脏、脾、肺、肾脏、胃、大肠、小肠、皮下脂肪、背最长肌、腿肌、卵巢、输卵管、子宫共 14 个组织样各 2 份, 一份置于液氮中保存, 用于基因提取, 另

一份用 PBS 清洗后在 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 制成石蜡组织切片, 用于免疫组织化学检测。

1.2 试验方法

1.2.1 主要仪器和试剂 紫外分光光度计 (Beckman 公司), Quantstudio 多重实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Life Technologies 公司), 组织脱水机、包埋机和切片机 (德国 Leica 公司)。Trizol[®] Plus RNA Purification Kit 和 SuperScript[™] III First – Strand Synthesis SuperMix for qRT – PCR, 购于 Invitrogen 公司; RNase – Free DNase Set, 购于 Qiagen 公司; Power SYBR[®] Green PCR Master Mix, 购于 Roche 公司, Anti – *SIRT2* antibody, 购于 ABCAM 公司。

1.2.2 总 RNA 提取和反转录 根据 Invitrogen 公司总 RNA 提取试剂盒说明书操作, 利用紫外分光光度计检测 RNA 纯度和浓度。反转录按照 SuperScript[™] III First – Strand Synthesis SuperMix for qRT – PCR 试剂盒说明操作。反应条件为: 25 ℃, 10 min; 50 ℃, 30 min; 85 ℃, 5 min, 于 – 20 ℃ 贮存备用。

1.2.3 引物设计与合成 根据 GenBank 中猪 *SIRT2* 基因序列 (NM_001114271.1) 设计引物, 选择 β – *actin* 作为内参基因。采用 Primer Premier 6.0 和 Beacon designer 7.8 软件进行定量 PCR 引物设计, 引物序列见表 1。

表 1 *SIRT2* 基因 RT – PCR 引物序列及扩增长度

基因名称	引物序列 (5'→3')	扩增长度 (bp)
<i>SIRT2</i>	F: GGTGGAGAAGCCGAGATGGA; R: GGGAGCCGAAGTCAGGGAT	199
β – <i>actin</i>	F: GGAGATCGTGCGGGACAT; R: GTTGAAGGTGGTCTCGTGGAT	223

收稿日期: 2018 – 04 – 08

基金项目: 江苏省泰州市科技支撑计划 (农业) 项目 (编号: TN201612)。

作者简介: 王利红 (1975—), 女, 山西太原人, 博士, 副教授, 主要从事为动物遗传繁育研究。E – mail: wanglihong345@126.com。

通信作者: 张伟, 硕士, 高级畜牧师, 主要从事畜牧方向研究。E – mail: hdjgzhangwei001@163.com。

1.2.4 Real – Time PCR 扩增体系和反应条件 Real – Time PCR 反应体系 (20.0 μ L) 含 Power SYBR[®] Green Master Mix 10.0 μ L、(10 μ mol/L) Forward Primer 0.5 μ L、(10 μ mol/L) Reverse Primer 0.5 μ L、cDNA 1.0 μ L。反应条件为: 95 ℃, 1 min, 95 ℃ 15 s, 63 ℃ 25 s 收集荧光 40 个循环。每个样品重复 3 次。

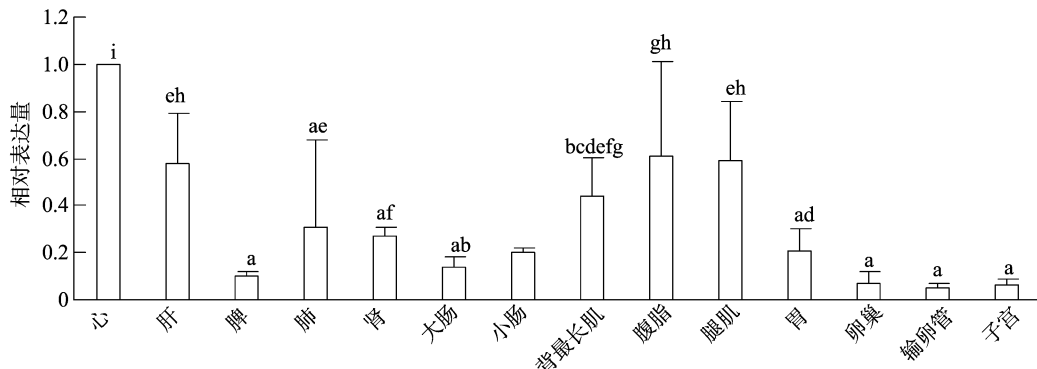
1.2.5 免疫组化 将组织切片置于 60 ℃ 恒温箱中固定 1 h 后依次放入二甲苯、100% 乙醇、95% 乙醇、85% 乙醇、75% 乙

醇,用 ddH₂O 洗涤。抗原修复后,ddH₂O 和 PBST 清洗,3% H₂O₂ - 甲醇溶液浸泡,15 min 后用 PBST 浸泡并清洗。之后,用血清封闭切片,一抗 4 ℃ 孵育过夜,室温复温 1 h 后,用 PBST 浸泡并清洗,加入酶标二抗室温孵育,并用 PBST 浸泡并清洗,DAB 显色液显色,中性树胶封片。

1.2.6 数据统计与分析 *SIRT2* 基因的相对表达水平以 2^{-ΔΔC_T} 计算,应用 SPSS 19.0 软件进行数据的统计分析。

2 结果

2.1 苏姜猪不同组织中 *SIRT2* mRNA 表达量分析



柱上相同字母表示组织间差异不显著($P > 0.05$)、不同字母表示各组织间差异显著($P < 0.05$)

图1 苏姜猪组织中 *SIRT2* mRNA 表达谱

2.2 苏姜猪组织中 *SIRT2* 表达定位分析

通过免疫组化检测,在苏姜猪的心脏、肝脏、脾、肺、肾脏、胃、大肠、小肠、皮下脂肪、背最长肌、腿肌、卵巢、输卵管、子宫共 14 个组织样中均检测到 *SIRT2* 免疫阳性细胞(图 2)。

通过免疫组化检测,*SIRT2* 免疫阳性颗粒主要分布在苏姜猪心脏、背最长肌和腿肌的肌肉组织的肌细胞质中。其他组织中,*SIRT2* 免疫阳性细胞除分布于相应肌层外,还主要分布于胃组织黏膜层的固有腺层,小肠、大肠、输卵管、子宫组织的黏膜层,肝脏组织的肝小叶,肾脏组织的近曲小管和远曲小管,肺组织的肺泡上皮层和支气管的黏膜层,脾脏组织的红髓,卵巢组织的皮质部和卵泡的颗粒层,皮下脂肪的脂肪细胞中,且均主要分布于各组织细胞的细胞质中。

3 讨论与结论

SIRT2 作为第 3 类去乙酰化酶 Sirtuins 家族中的一员,是一种保守的 NAD(nicotinamide adenine dinucleotide,烟酰胺腺嘌呤二核苷酸) 依赖性去乙酰酶沉默信息调节因子,在细胞周期、脂肪细胞分化、细胞骨架形成、神经系统功能、衰老、氧化应激和热量限制等生命过程中具有重要的调控作用^[2]。在不同组织中,作为去乙酰化酶的 *SIRT2* 能与许多不同的因子结合使其去乙酰化,如 Histone、Tubulin、Foxo1、p53、p300、CDC14B 等因子,然而,*SIRT2* 也存在被其他因子乙酰化,减弱其乙酰化活性的情况,因此 *SIRT2* 在不同组织和生物反应过程中发挥着多样的作用^[4]。猪 *SIRT2* 位于第 6 条染色体,由 9 个外显子和 8 个内含子组成。本研究通过实时荧光定量检测方法,在所采集的苏姜猪 14 个组织样中均检测到 *SIRT2* 基因 mRNA 的表达,这与 Jin 等^[5] 和刘炳婷^[2] 在猪的许多组织

采用相对定量法,以 β -actin 作为内参基因,矫正不可控制因素,归一化起始组织量,并定义心脏组织中的表达水平为 1,以对 *SIRT2* mRNA 在不同组织中的表达水平进行相对定量。

在苏姜母猪猪 14 个组织中均检测到 *SIRT2* mRNA 的表达,由图 1 可知,*SIRT2* mRNA 在心脏组织中的表达量相对最高,显著高于其他组织($P < 0.05$);在肝脏、背最长肌、腿肌中的表达量均较丰富,显著高于除脂肪和肺组织外的其他组织($P < 0.05$);在脾、卵巢、输卵管、子宫组织中的表达量相对最低。

中检测到 *SIRT2* mRNA 的表达报道相同,表明 *SIRT2* 在苏姜猪组织中的表达也具有广泛性。

对比各组织器官中 *SIRT2* mRNA 的表达量差异,在热量限制的小鼠模型中,发现大量 *SIRT2* mRNA 存在于白色脂肪组织和肾脏组织中^[6]。吴国芳等在小鼠肌肉和心脏组织中检测到 *SIRT2* mRNA 相对高的表达量,肝、肺、肾、脂肪中呈中等表达,脾组织中的表达最低^[7]。桂林生在秦川牛的肾脏、皮下脂肪组织和肺脏中检测到 *SIRT2* mRNA 呈现高度表达,而在肌肉、心脏和肝脏中呈现低度表达^[8]。刘炳婷在长白猪的肌肉和脂肪组织中检测到较丰富的 *SIRT2* mRNA 表达^[2]。本研究在苏姜猪心脏、肌肉和肝脏组织中检测到丰富的 *SIRT2* mRNA 表达,其次为脂肪组织,脾组织中则表达量相对较低,这一表达量差异趋势与吴国芳等的报道相似。苏姜猪肌肉和脂肪组织中丰富的 *SIRT2* mRNA 表达,表明 *SIRT2* 基因与苏姜猪的生长发育和肉质性状间存在直接或间接的关系。

通过定位检测,发现 *SIRT2* 主要位于细胞质中,与微管共定位,为 α -微管蛋白的去乙酰化酶,并在少突胶质细胞的分化过程中起着重要的作用^[9],此外,*SIRT2* 还可通过使 p65 去乙酰化,以调节 NF- κ B 依赖性基因的表达。而在细胞有丝分裂的 G2/M 转换期,*SIRT2* 可以瞬间转移到细胞核内,去乙酰化组蛋白 H4 的 16 位赖氨酸,降低其乙酰化水平,推迟细胞从分裂期退出^[10-12]。本研究通过免疫组织化学检测苏姜猪各组织中 *SIRT2* 表达分布,结果与相关报道相同,*SIRT2* 免疫阳性颗粒主要定位于各组织细胞的细胞质中。Yang 等证实 *SIRT2* 能够通过 Nrf2 信号通路参与心力衰竭^[13],本研究在苏姜猪心脏和肌肉组织中检测到 *SIRT2* 免疫阳性颗粒,且在

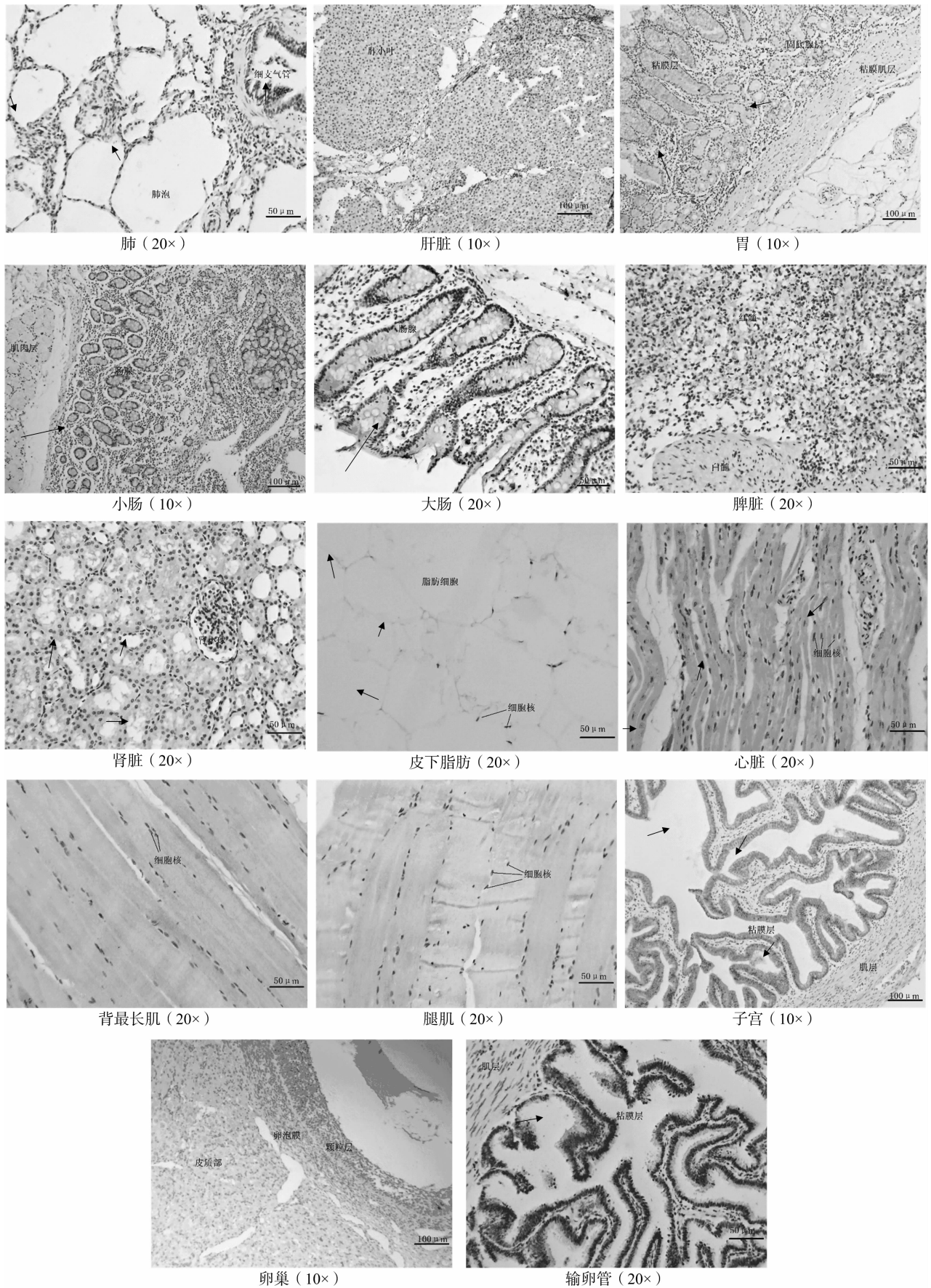


图2 SIRT2 免疫阳性细胞在苏姜猪组织中的分布

实时荧光定量检测中测得相对较高的 *SIRT2* mRNA 表达量,表明 *SIRT2* 对于苏姜猪心脏及肌肉功能的重要性。除肌细胞外,*SIRT2* 免疫阳性细胞还主要分布于苏姜猪消化系统如胃、小肠、大肠的腺体层和消化腺——肝脏的肝小叶中,表明 *SIRT2* 与腺细胞的分泌功能有关。

肺是动物的呼吸器官,具有呼吸、代谢、防御功能。通过免疫组织化学检测方法,在苏姜猪肺组织的支气管的上皮层和肺泡上皮细胞的细胞质中检测到 *SIRT2* 免疫阳性颗粒。细支气管的上皮层由纤毛细胞和分泌细胞组成;肺泡上皮主要由 I 型和 II 型肺泡细胞组成,其中 II 型肺泡细胞相对最多,具有合成与分泌表面活性物质,降低肺泡的表面张力,使肺泡回缩力降低,稳定肺泡的形态,以减少吸气阻力的作用。苏姜猪肺支气管上皮层和肺泡上皮细胞中 *SIRT2* 的表达可能与上述细胞的分泌功能有关。

Jin 等在猪睾丸中检测到 *SIRT2* mRNA 的高表达^[5],但有关 *SIRT2* mRNA 在雌性动物生殖系统中的表达量情况则鲜见报道。本研究在苏姜母猪的生殖系统中,检测到 *SIRT2* mRNA 的表达,但表达量不高。经免疫组织化学检测,*SIRT2* 免疫阳性细胞主要分布于卵巢组织的皮质部和卵泡的颗粒层,输卵管和子宫组织的黏膜层,表明 *SIRT2* 可能参与卵泡的形成及卵母细胞的成熟过程,并且与生殖道中细胞的分泌功能有关,但在发情周期不同阶段,*SIRT2* 的表达是否存在规律性变化,有待后续进一步研究。

肾脏具有动物机体排泄体内代谢废物,以维持体内钠、钾、钙等电解质的稳定及酸碱平衡的功能^[14]。其中,近曲小管的功能主要是重吸收功能,而远曲小管的功能则是继续吸收水和钠离子,并向管腔内分泌钾离子、氢离子和氨,这对维持血液的酸碱平衡有重要作用。本研究在苏姜猪肾脏组织的近曲小管和远曲小管的上皮细胞中检测到丰富的 *SIRT2* 免疫阳性颗粒,表明 *SIRT2* 与近曲小管和远曲小管上皮细胞的吸收和分泌功能有关。

脂肪组织是动物重要的代谢器官和内分泌器官,调控着动物机体许多生理和病理过程。在 Sirtuins 家族的所有蛋白中,*SIRT2* 被认为是在脂肪组织中表达量最高的蛋白^[15-16]。在 3T3-L1 脂肪细胞和猪前体脂肪细胞中,*SIRT2* 基因超表达可通过去乙酰化 *FoxO1*,促进 *FoxO1* 与 *PPAR γ* 的结合,抑制 *PPAR γ* 的转录活性,进而抑制脂肪细胞的分化。在动物机体因为饥饿或者能量消耗需要脂类水解供能时,*SIRT2* 通过对 *FoxO1* 的去乙酰化调控脂类的水解^[17]。本研究在苏姜猪皮下脂肪的脂肪细胞中检测到 *SIRT2* 免疫阳性颗粒,且 *SIRT2* mRNA 表达量较丰富,表明 *SIRT2* 基因与苏姜猪脂肪组织形成有关。

总之,通过实时荧光定量和免疫组织化学检测方法,在所采集的苏姜猪心脏、肝脏、脾、肺、肾脏、胃、大肠、小肠、皮下脂肪、背最长肌、腿肌、卵巢、输卵管、子宫 14 个组织样中均检测到 *SIRT2* 的表达。*SIRT2* mRNA 在苏姜猪心脏、肌肉、肝脏和脂肪组织中有丰富表达,*SIRT2* 免疫阳性细胞主要分布于各组织器官的肌细胞、黏膜层细胞和脂肪细胞中,表明 *SIRT2* 在苏姜猪组织中的表达具有广泛性,且主要参与肌肉和腺体组织的生物学功能过程。

参考文献:

- [1] 彭亚军,胡高云,李乾斌. 去乙酰化酶 *SIRT2* 及其抑制剂的研究进展[J]. 中国药物化学杂志,2017,27(4):315-324.
- [2] 刘炳婷. *Sirt2* 在猪前体脂肪细胞分化中的作用及其机理研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2010:8-28.
- [3] Jing E X, Gesta S, Kahn C R. *SIRT2* regulates adipocyte differentiation through *FoxO1* acetylation/deacetylation[J]. Cell Metabolism,2007,6(2):105-114.
- [4] 张敏. 猪 *Sirt2*、*PPAR δ* 、*Sms39hJ/2* 基因的 SNPs 检测及性状关联分析[D]. 杭州:浙江农林大学,2014:4-6.
- [5] Jin D, Tan H J, Lei T, et al. Molecular cloning and characterization of porcine sirtuin genes[J]. Comparative Biochemistry and Physiology (Part B: Biochemistry & Molecular Biology), 2009, 153(4):348-358.
- [6] Wang F, Nguyen M, Qin F, et al. *SIRT2* deacetylates *FOXO3a* in response to oxidative stress and caloric restriction[J]. Aging Cell, 2007,6(4):505-514.
- [7] 吴国芳,王磊,周继平. 小鼠 *Sirt2* 基因的组织表达谱及其成肌细胞分化过程中的时序表达[J]. 青海畜牧兽医杂志,2017,47(6):27-30.
- [8] 桂林生. Sirtuins 家族 7 个基因 SNP 检测及其与秦川肉牛生长发育和肉质性状的关联性分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2015:35-36.
- [9] North B J, Verdin E. Mitotic regulation of *SIRT2* by cyclin-dependent kinase 1-dependent phosphorylation[J]. The Journal of Biological Chemistry,2007,282(27):19546-19555.
- [10] Dryden S C, Nahhas f A, Nowak J E, et al. Role for human *SIRT2* NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle[J]. Molecular and Cellular Biology, 2003, 23(9):3173-3185.
- [11] Vaquero A, Scher M B, Lee D H, et al. *Sirt2* is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis[J]. Genes & Development,2006,20(10):1256-1261.
- [12] Wilson J M, Le V Q, Zimmerman C, et al. Nuclear export modulates the cytoplasmic *Sir2* homologue *Hst2*[J]. EMBO Reports,2006,7(12):1247-1251.
- [13] Yang X Y, Shang M, Kamide C E, et al. *Sirt2* contributes to the development of heart failure through a *Nrf2* dependent pathway[J]. Circulation,2016,134(1):1524-4539.
- [14] 赵莎莎,袁华根. 苯并芘对鲤鱼肾脏 SOD 和 CAT 的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(24):168-170.
- [15] Wang F, Tong Q. *SIRT2* suppresses adipocyte differentiation by deacetylating *FOXO1* and enhancing *FOXO1*'s repressive interaction with *PPAR gamma*[J]. Molecular Biology of the Cell,2009(20):801-808.
- [16] 刘炳婷,白亮,刘飞,等. 过表达 *Sirt2* 抑制猪前体脂肪细胞的分化[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2010,26(6):575-580.
- [17] Tedeschi A, Di Giovanni S. The non-apoptotic role of p53 in neuronal biology:enlightening the dark side of the moon[J]. EMBO Reports,2009,10(6):576-583.