·论著·

肝脏特异性 Nampt 基因敲除对缺血性脑卒中的影响

青胜利[1a,1b], 王淑娜[1a], 汪东昇[1a], 吕小群[2], 徐添颖[1a,1b], 缪朝玉[1a]（1. 海军军医大学: a. 药学系药理学教研室, b. 麻醉系麻醉药理学教研室, 上海 200433; 2. 复旦大学附属金山医院药剂科, 上海 201508）

［摘要］ **目的**　烟酰胺磷酸核糖转移酶 (nicotinamide phosphoribosyltransferase, Nampt) 是缺血性脑卒中的治疗新靶点。本研究旨在阐明肝脏来源的 Nampt 是否对缺血性脑卒中具有保护作用。**方法**　运用 Cre/loxP 系统制备肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠。将 $Nampt^{loxP/loxP}$ 小鼠与肝脏特异性表达 Cre 重组酶小鼠 (Alb-Cre) 进行杂交, 采用聚合酶链反应方法鉴定子代基因型。测定基因敲除小鼠和同窝对照小鼠的体重。蛋白免疫印迹法检测小鼠肝脏和脑中 Nampt 蛋白的表达。采用电凝法对肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠和对照小鼠制备大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 脑卒中模型, 造模 24 h 后对各组小鼠进行神经功能损伤评分, TTC 染色测定脑梗死体积, ELISA 法检测各组小鼠血浆 Nampt 水平。**结果**　成功构建肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠, 其基因型为 $Nampt^{loxP/loxP}$ Alb-Cre。肝脏特异性 Nampt 基因敲除组肝脏 Nampt 蛋白表达与对照组相比下降 74.2%。脑 Nampt 蛋白的表达在敲除组与对照组之间无显著性差异。肝脏特异性 Nampt 基因敲除对小鼠的体重无影响。正常生理条件下, 同性别肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠与对照小鼠血浆 Nampt 水平无明显差异。MCAO 造模 24 h 后, 肝脏特异性 Nampt 基因敲除组与对照组神经行为学损伤评分、脑梗死体积和血浆 Nampt 浓度也无显著性差异。**结论**　成功构建肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠; 肝脏来源 Nampt 对缺血性脑卒中没有明显保护作用。

［关键词］ 烟酰胺磷酸核糖转移酶; 特异性敲除; 肝脏; 脑卒中
［中图分类号］ R743.3　［文献标志码］ A　［文章编号］ 1006-0111(2022)01-0012-08
［DOI］ 10.12206/j.issn.1006-0111.202107068

Effects of liver-specific Nampt knockout on ischemic stroke

QING Shengli[1a,1b], WANG Shuna[1a], WANG Dongsheng[1a], LYU Xiaoqun[2], XU Tianying[1a,1b], MIAO Chaoyu[1a](1. Naval Medical University: a. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, b. Department of Anesthetic Pharmacology, Faculty of Anesthesiology, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201508, China）

［**Abstract**］ **Objective**　Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) is a new therapeutic target for ischemic stroke. The aim of this study was to investigate protective effect of liver-derived Nampt on ischemic stroke. **Methods**　Liver-specific Nampt knockout mice were generated using the Cre/loxP system. $Nampt^{loxP/loxP}$ mice were crossed with liver-specific Cre recombinase expression mice (Alb-Cre), and the progeny genotypes were identified by polymerase chain reaction. Body weight of knockout mice and control mice were measured. Nampt in liver and brain was determined by Western blot assay. Middle cerebral artery occlusion (MCAO), a classical ischemic stroke model, was generated in liver-specific Nampt knockout mice and control mice by electrocoagulation. After 24 h of modeling, neurological deficit scores of each group were evaluated and TTC staining was performed to determine the cerebral infarction volume. The level of plasma Nampt in each group was determined by ELISA. **Results**　Liver-specific Nampt knockout mice with the genotype of $Nampt^{loxP/loxP}$Alb-Cre were successfully constructed. The hepatic Nampt expression in knockout mice was significantly decreased by 74.2% compared to control mice, while there was no significant difference in the expression of brain Nampt protein between the knockout group and the control group. Specific knockout of liver Nampt gene expression had no effect on the body weight of mice. Under normal physiological conditions, there was no significant difference in plasma Nampt levels between liver-specific Nampt knockout mice and control mice of the same gender. 24 h after MCAO modeling, there were no significant differences in neurological deficit scores, cerebral infarct volume and plasma Nampt concentration between liver-specific Nampt knockout group and control group. **Conclusion**　Liver-specific Nampt knockout mice are successfully constructed. Liver-derived Nampt has no significant protective effects on ischemic stroke.

［基金项目］ 国家自然科学基金资助项目 (81730098); 上海市科委动物专项 (16140904500)
［作者简介］ 青胜利, 硕士研究生, Email: qsl1992@foxmail.com
［通信作者］ 徐添颖, 副教授, 研究方向: 心脑血管药理学, Email: xty7910@163.com; 缪朝玉, 教授, 研究方向: 心脑血管药理学, Email: cymiao@smmu.edu.cn

［**Key words**］ Nampt; specific knockout; liver; stroke

在我国成人死因中，脑卒中位列第一，全球第二[1-2]。在所有的脑卒中患者中，有 78% 的患者是缺血性脑卒中，其他为出血性脑卒中[3]。脑卒中的治疗药物很少，目前 FDA 唯一批准的药物只有组织纤溶酶原激活剂。但是，由于其治疗窗口狭窄、有禁忌证和并发症风险，组织纤溶酶原激活剂仅适用于 3%～5% 的脑卒中患者[2]。因而，寻求新的治疗靶点和手段显得十分重要。

烟酰胺磷酸核糖转移酶 (Nampt) 又被称作内脏脂肪素，也是一种脂肪因子。它还有一个名称是 PBEF，是合成哺乳动物细胞内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD^+) 的关键限速酶[4]。最近的研究证明了 Nampt 可以作为缺血性脑卒中治疗新靶点[2-3,5-7]。Nampt 治疗缺血性脑卒中的作用机制包括急性期的脑保护以及慢性期的促血管修复和神经再生作用。这些作用机制通过体内体外试验在神经细胞、内皮祖细胞和神经干细胞得到证实。NAD^+在细胞能量维持中起着关键作用[8]，而 Nampt 可以通过补救合成途径促进哺乳动物中 NAD^+生物合成，影响 ATP 的产生，对抗缺血性脑卒中后的供能不足，维持细胞内能量稳态，抑制神经细胞死亡[3]。

Nampt 既可存在于细胞内，也可以分泌到细胞外[9]。从细胞分泌出来后可以存在于血液中，与高血压、糖尿病等多种疾病相关[10,11]。在缺血性脑卒中发生后，外周血液的 Nampt 会显著性升高[12-13]。局部脑组织内 Nampt 对缺血性脑卒中的保护作用已经十分明确，而脑外组织来源的 Nampt 对缺血性脑卒中的作用研究较少。已知肝脏细胞可以分泌 Nampt，并且肝脏被认为是血液 Nampt 的主要组织来源之一[3,14-15]。本研究主要通过 Cre/loxP 重组酶系统特异性敲除肝脏 Nampt 基因的表达，利用大脑中动脉阻塞 (MCAO) 缺血性脑卒中模型，研究肝脏来源的 Nampt 是否参与缺血性脑卒中的保护，为进一步明确 Nampt 作为缺血性脑卒中治疗新靶点的重要意义，为探究外周器官参与缺血性脑卒中损伤及修复的新机制打下基础。

1　实验材料

1.1　实验动物

$Nampt^{loxP/loxP}$ 小鼠 (南京医科大学王强教授实验室赠予) 和 Albumin-Cre 小鼠 (上海南方模式生物科技发展有限公司)。动物自由饮水、进食；环境温度控制在 (25±1) ℃，相对湿度 40%～60%，昼夜均为 12 h。所有动物实验均符合实验动物伦理学要求。

1.2　实验仪器

PCR 仪 (TaKaRa)，M200 PRO 多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司)，SC12 型水平电泳槽 (北京凯元信瑞仪器有限公司)，FR-980A 生物电泳图像分析系统 (上海复日科技有限公司)，红外激光扫描成像系统 (LI-COR)，蛋白电泳、转膜系统 (上海天能科技有限公司)，高通量组织研磨仪 (上海万柏生物科技有限公司)，颅骨钻 (广州坤图生物科技有限公司)，CHR 多功能手术仪 (武汉春光医疗美容仪器有限公司)。

1.3　实验试剂

小鼠鉴定引物 (上海生工生物工程股份有限公司) 序列如表 1 所示。

表 1　基因型鉴定引物

序号	引物序列(5’-3’)	鉴定基因型	条带位置
引物1	野生型上游引物: TGCAAACATCACATGCACAC	$Nampt^{loxP/loxP}$Alb-Cre	150 bp 351 bp 390 bp
	通用型下游引物: TTGGCCCCTTACCATAACTG	$Nampt^{loxP/loxP}$	351 bp
	突变型上游引物: GAAGCAGAAGCTTAGGAAGATGG		
引物2	下游引物: TTCCAGGCTATTCTGTTCCAG	$Nampt^{loxP/loxP}$	300 bp
	上游引物: TCTGGCTCTGTGTACTGCTGA		

鼠尾基因组 DNA 提取试剂盒 (康为世纪生物科技有限公司)，多聚甲醛 (博光生物科技有限公司)，GAPDH 抗体和 BCA 蛋白浓度试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司)，PBEF 抗体 (F-8)(Santa Cruz Biotechnology)，Premix Taq™ (TaKaRa)，硝酸纤维素转移膜 (Whatman)，IRDye®800CW Donkey anti-Mouse IgG 二抗 (LI-COR)，血浆 Visfatin 检测试剂盒 (Phoenix Pharmaceuticals, Inc)，2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (BBI Life Science)，异戊巴比妥 (BIOSZUNE LIFE SCIENCES DEP)，水合氯醛 (国药集团化学试剂有限公司)。

2　实验方法

2.1　肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠的培育

白蛋白 (Alb) 仅在肝脏中表达。目前，Alb 基

因启动子作为肝脏特异性启动子被广泛用于制备肝脏特异性基因敲除小鼠模型[16]。Nampt$^{loxP/loxP}$Alb-Cre 及其同窝对照 Nampt$^{loxP/loxP}$ 小鼠由 Nampt$^{loxP/loxP}$ 和 Alb-Cre 两种小鼠杂交获得。培育过程如图 1：①将 Nampt$^{loxP/loxP}$ 小鼠与 Alb-Cre 小鼠交配，筛选获得 Nampt$^{loxP/WT}$Alb-Cre，②Nampt$^{loxP/WT}$Alb-Cre 与 Nampt$^{loxP/loxP}$ 小鼠交配，得到 Nampt$^{loxP/loxP}$Alb-Cre，③最后将 Nampt$^{loxP/loxP}$Alb-Cre 与 Nampt$^{loxP/loxP}$ 交配，得到用于实验的 Nampt$^{loxP/loxP}$Alb-Cre(即 liver-specific Nampt knockout mice，以下简称 LNKO) 及其同窝对照 Nampt$^{loxP/loxP}$ 小鼠 (以下简称 WT)，用引物 1 对其子代进行基因型鉴定。实验中①②③交配使用的 Nampt$^{loxP/loxP}$ 小鼠全部用 Nampt$^{loxP/loxP}$ 与 Nampt$^{loxP/loxP}$ 小鼠交配所得，用引物 2 对其子代进行基因型鉴定。

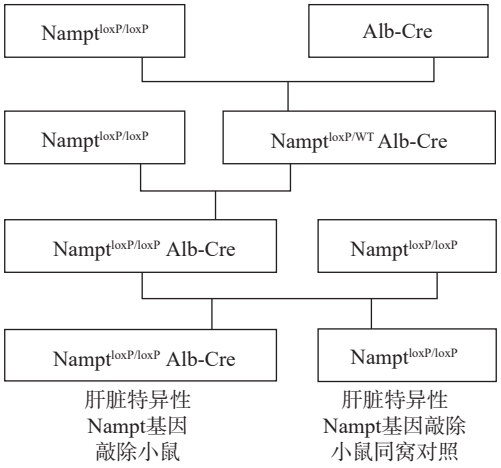

图 1　肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠的培育

2.2　肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠的鉴定

2.2.1　提取 DNA

剪取 5 周龄小鼠尾巴约 0.5 cm。置于 1.5 ml 离心管中，剪碎后，按照鼠尾基因组 DNA 提取试剂盒 (康为世纪生物科技有限公司) 说明书进行提取。

2.2.2　PCR 扩增

扩增小鼠 DNA，扩增程序如图 2，扩增体系 20 μl：Premix Taq^{TM} 10 μl，引物 1 μl (5 μm)，DNA 溶液 2 μl，ddH_2O 体积为 7 μl，混合均匀后放入 PCR 仪进行扩增。Nampt$^{loxP/loxP}$Alb-Cre 与 Nampt$^{loxP/loxP}$ 交配得到的子代用引物 1 和扩增程序图 2A 进行鉴定，Nampt$^{loxP/loxP}$ 与 Nampt$^{loxP/loxP}$ 交配得到的子代，理论上都为 Nampt$^{loxP/loxP}$，用引物 2 和扩增程序图 2B 进行鉴定。

2.2.3　琼脂糖电泳

配制 2% 的琼脂糖凝胶 (琼脂糖凝胶未凝固前每 10 ml 加入 1 μl 的 gelRed 试剂)，在水平 100 V 电泳槽中电泳 30 min。

2.2.4　凝胶成像

最后用生物电泳图像分析系统，在 312 nm 紫外线下拍摄成像。

2.3　肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠肝脏、脑 Nampt 蛋白的表达

用 1% 异戊巴比妥腹腔麻醉小鼠 (100 mg/kg)，心脏取血后，取出小鼠的肝脏、脑，用高通量组织研磨仪对组织进行匀浆，在 4 ℃，12 000×*g* 的条件下，离心 20 min 后取上清液，用 BCA 法进行蛋白定量，通过蛋白免疫印迹法检测 Nampt 蛋白。

2.4　MCAO 模型的制备

用 4% 水合氯醛腹腔麻醉小鼠 (400 mg/kg)，将小鼠固定在鼠板上，剔除左眼周围的毛发后，酒精棉球消毒，用镊子揪起左耳外耳道和左眼外眦之间的皮，平行于下层肌肉表面做 1 cm 切口，分离头骨外周肌肉，用颅骨钻在颞骨前下紧邻颧弓前上缘的

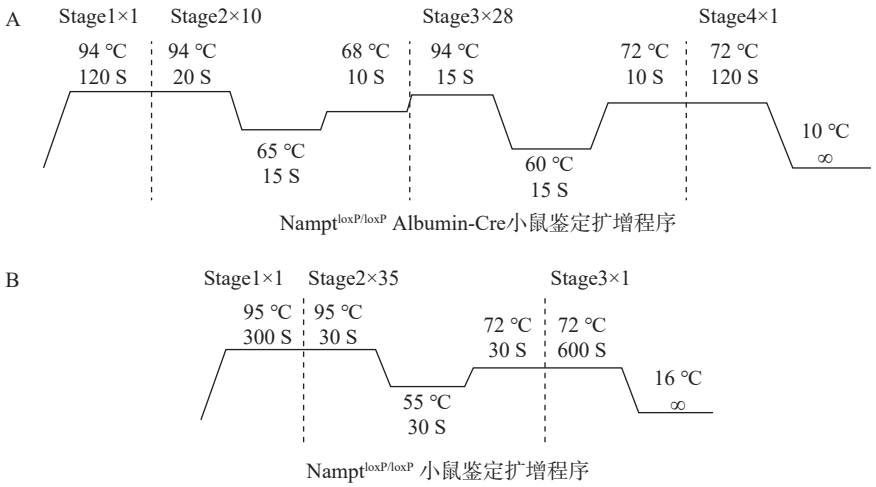

图 2　鼠尾 DNA PCR 鉴定扩增程序

部位打磨使颞骨变薄，用镊子去除部分头骨，在手术显微镜下找到大脑中动脉，并用电凝器凝断位于嗅束至大脑下静脉之间的主干，再缝合伤口。术后将小鼠置于保温毯上，待清醒后放回动物笼内饲养。

2.5　MCAO 造模 24 h 后神经行为学损伤评分

神经行为学损伤评分采用 5 分法[17]。0 分：正常，无神经功能缺损；1 分：瘫痪侧前爪不能完全伸展，轻度神经功能缺损；2 分：行走时，小鼠向瘫痪侧转圈，中度神经功能缺损；3 分：行走时，小鼠身体向瘫痪侧倾倒，重度神经功能缺损；4 分：不能自发行走，有意识丧失。

2.6　TTC 染色评估脑梗死体积

MCAO 造模 24 h 后将小鼠麻醉，断头取出脑，放入−20 ℃ 冷冻 15 ~ 20 min，再用刀片将全脑冠状切出 6 片 1 mm 厚的脑片，去掉尾部带有嗅球、小脑和低位脑干的部分。脑片用 37 ℃ 预热的 2% TTC 染色，37 ℃ 避光染色 30 min，正常组织为红色，梗死组织为白色。4% 多聚甲醛固定 1 h 后，用滤纸吸干液体再取出脑片，用扫描仪扫描脑片，用 Image J 计算梗死面积，以测量梗死脑组织体积占总测量脑片体积的百分比作为衡量脑梗死的指标。每片切片的脑梗死体积=(该切片双面梗死面积之和÷2)×层厚，相对脑梗死体积 (%)=(全部切片梗死体积之和÷全部切片体积之和)×100%。

2.7　血浆 Nampt 的测定

小鼠心脏取血得到血浆后，用 ELISA 法测定 Nampt 的含量。测定步骤按照血浆 Visfatin 检测试剂盒说明书进行。

2.8　统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析，实验数据用 ($\bar{x}\pm s$) 表示，通过独立样本 t 检验分析组间差异的显著性，以 P<0.05 为具有统计学差异。

3　结果

3.1　肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠的鉴定

核酸电泳条带为 150 bp+351 bp+390 bp 的为 Nampt$^{loxP/loxP}$Alb-Cre，即 LNKO 小鼠，核酸电泳条带为 351 bp 的为 Nampt$^{loxP/loxP}$，即 WT 小鼠。小鼠基因型鉴定结果如图 3 所示，从左到右，泳道 1 为 DNA Maker，泳道 2 和 3 为 WT 小鼠 (351 bp)，泳道 4 和 5 为 LNKO 小鼠 (150 bp+351 bp+390 bp)。

3.2　肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠体重测定

比较各组小鼠 12 周龄的体重。如图 4 所示，WT 雄性小鼠的体重为 (25.31±1.91) g，LNKO 雄性小鼠的体重为 (25.19±1.17) g，WT 雌性小鼠的体重为 (19.79±1.19) g，LNKO 雌性小鼠的体重为 (20.36±1.79) g。同一性别中，LNKO 和 WT 小鼠体重比较没有显著性差异。WT 小鼠中，雄鼠比雌鼠平均重 5.52 g(P<0.001)。LNKO 小鼠中，雄鼠比雌鼠平均重 4.83 g (P<0.001)。以上结果说明特异性敲除肝脏 Nampt 基因表达，对小鼠的体重无影响。

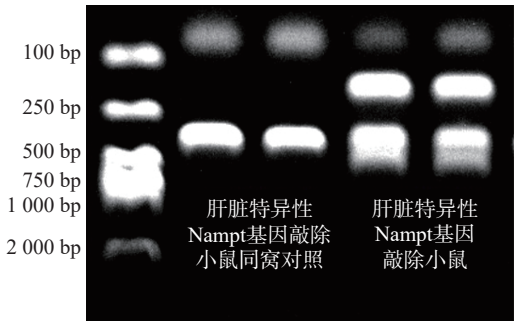

图 3　肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠鉴定电泳图

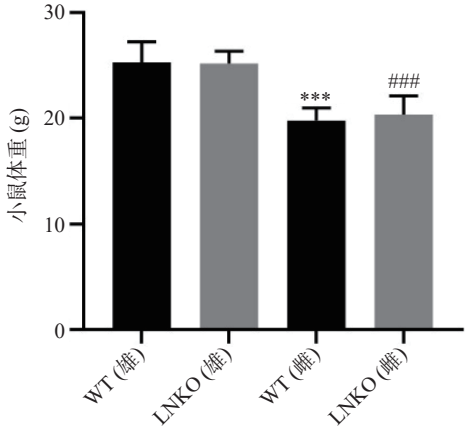

图 4　12 周龄肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠体重情况 (n≥7)

WT: 肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠同窝对照；LNKO: 肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠。
$^{***}P$<0.001，与 WT(雄) 组比较；$^{###}P$<0.001，与 LNKO (雄) 组比较。

3.3　肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠肝脏、脑组织 Nampt 蛋白的表达

为进一步验证成功培育肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠，提取各组小鼠的肝脏和脑组织蛋白，通过蛋白免疫印迹验证两种组织中 Nampt 蛋白的表达。如图 5A 所示，同一性别肝脏组织中，LNKO 小鼠 Nampt 蛋白表达水平都显著性低于其对照 WT 小鼠，其中 LNKO 雄性小鼠 Nampt 蛋白表达水平比 WT 雄性小鼠降低了 67.1%；LNKO 雌性小鼠 Nampt 蛋白表达水平比 WT 雌性小鼠降低了 81.3%。如图 5B 所示，在脑组织中，LNKO 小鼠 Nampt 蛋白表达水平与其对照小鼠相比无显著性差异。蛋白免疫印迹结果进一步证明，肝脏特异

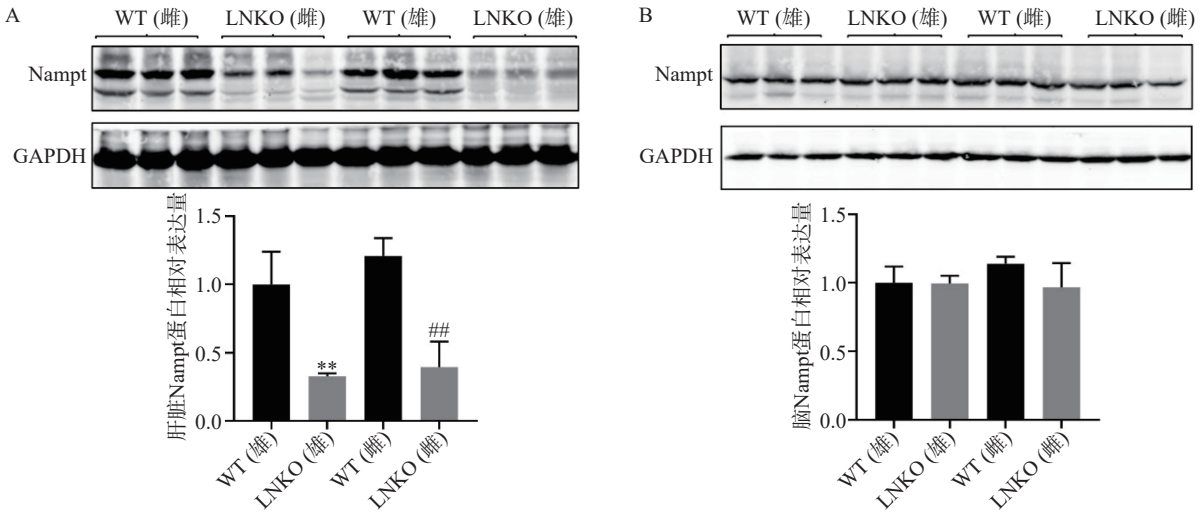

图 5　肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠肝脏、脑组织中 Nampt 蛋白的表达 (n=3)

A.各组小鼠肝脏 Nampt 蛋白免疫印迹代表图和相对灰度统计; B.各组小鼠脑 Nampt 蛋白免疫印迹代表图和相对灰度统计, 相对表达量为 Nampt 与 GAPDH 灰度值之比; WT: 肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠同窝对照; LNKO: 肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠。$^{**}P$<0.01, 与 WT(雄) 组比较; $^{\#\#}P$<0.01, 与 WT(雌) 组比较。

性 Nampt 基因敲除小鼠被成功构建。

3.4　生理条件下肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠血浆 Nampt 蛋白水平

根据血浆 Visfatin 检测试剂盒的数据处理方法, 测量 Nampt 蛋白的标准品 (浓度依次为 0.1、1、10、100、1 000 ng/ml) 在 450 nm 处的吸光度(A)值, 对数据进行四参数 Logistic 曲线拟合得到图 6A, R^2=1, 曲线拟合效果很好。

根据拟合曲线方程和样品的吸光度值, 计算各组小鼠血浆 Nampt 蛋白浓度。如图 6B 所示, 同一性别对应的 LNKO 与 WT 小鼠血浆 Nampt 蛋白浓度无显著性差异, LNKO 与 WT 小鼠的血浆 Nampt 蛋白浓度也无显著性差异。只有 LNKO 雄性组的血浆 Nampt 蛋白平均浓度比 LNKO 雌性组略升高 0.91 ng/ml(P<0.05)。

3.5　肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠 MCAO 造模 24 h 后相关指标评价

MCAO 造模 43 只小鼠, 成功造模 38 只, 其中 WT 雄性小鼠 11 只, LNKO 雄性小鼠 8 只, WT 雌性小鼠 11 只, LNKO 雌性小鼠 8 只, 造模成功率为 88.37%。

3.5.1　肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠 MCAO 造模 24 h 后脑梗死情况

图 7A 显示各组典型脑片 TTC 染色, 白色是梗死区。图 7B 代表统计后各组相对脑梗死体积。MCAO 造模 24 h 后, 相对脑梗死体积数据如下: WT 雄性组为 (16.14±1.78)%, LNKO 雄性组为 (17.71±2.08)%, WT 雌性组为 (16.85±3.36)%, LNKO 雌性

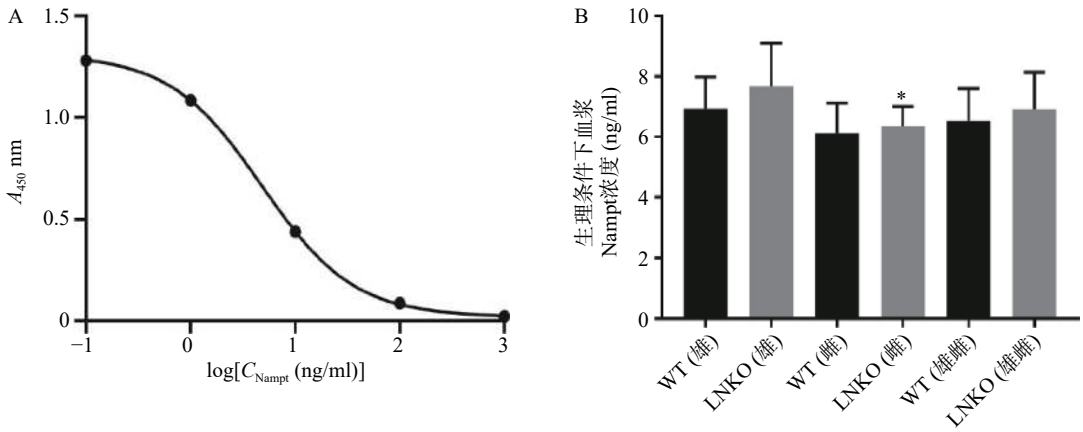

图 6　生理条件下肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠血浆 Nampt 蛋白表达 (n≥6)

A.不同 log[C_{Nampt}(ng/ml)] 与 450 nm 处吸光度值按照四参数 Logistic 曲线拟合得到的标准曲线; B. 生理条件下各组小鼠血浆 Nampt 蛋白水平; WT: 肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠同窝对照; LNKO: 肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠。$^{*}P$<0.05, 与 LNKO (雄) 组比较。

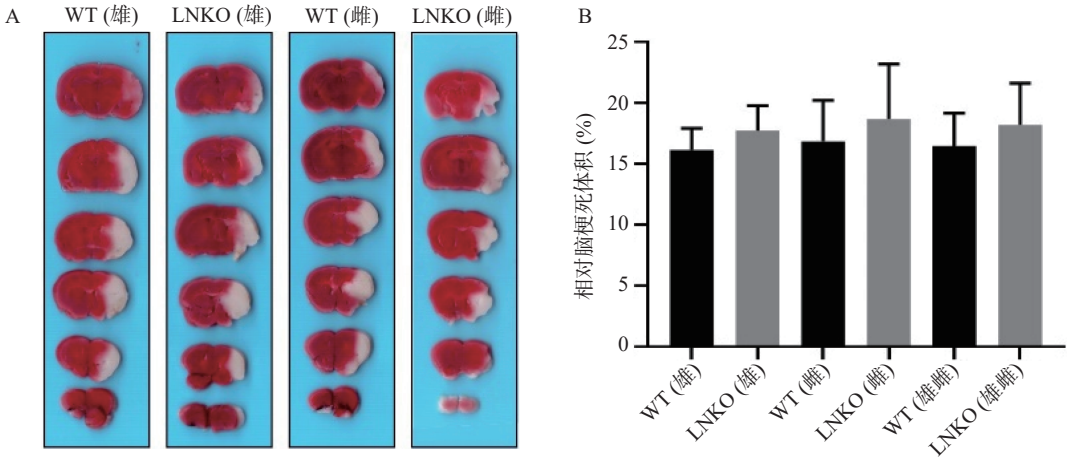

图 7　肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠 MCAO 造模 24 h 后脑梗死情况 (n≥8)

A.各组 MCAO 造模 24 h 后 TTC 染色典型脑片; B.MCAO 造模 24 h 后各组小鼠相对脑梗死体积计算。WT: 肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠同窝对照; LNKO: 肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠。

组为 (18.68±4.50)%。各组在 MCAO 造模 24 h 后的相对脑梗死体积无显著性差异。

3.5.2　肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠 MCAO 造模 24 h 后神经行为学损伤评分

神经行为学损伤评分数据如表 2 所示。造模 24 h 后，各组小鼠以轻度神经功能损伤为主，瘫痪侧前肢不能完全伸展；每组都存在部分发生中度神经功能损伤，行走时向瘫痪侧转圈。各组在 MCAO 造模 24 h 后神经行为学评分无显著性差异，而且各组神经行为学评分高低与相对脑梗死体积一致。

表 2　各组小鼠 MCAO 造模 24 h 后神经行为学损伤评分 (n≥8)

组别	神经行为学损伤评分(分)
WT雄性组	1.20±0.42
LNKO雄性组	1.50±0.71
WT雌性组	1.32±0.56
LNKO雌性组	1.63±0.69
WT组	1.26±0.49
LNKO组	1.56±0.68

WT: 肝脏特异性Nampt基因敲除小鼠同窝对照; LNKO: 肝脏特异性Nampt基因敲除小鼠。

3.5.3　肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠 MCAO 造模 24 h 后血浆 Nampt 蛋白水平

MCAO 造模 24 h 后，各组血浆 Nampt 蛋白平均浓度：WT 雄性组为 (6.26±0.98) ng/ml，LNKO 雄性组为 (6.44±1.03) ng/ml，WT 雌性组为 (5.28±0.86) ng/ml，LNKO 雌性组为 (5.70±0.80) ng/ml。如图 8 所示，LNKO 及其同窝对照 WT 小鼠在 MCAO 造模 24 h 后血浆 Nampt 蛋白表达无显著性差异。

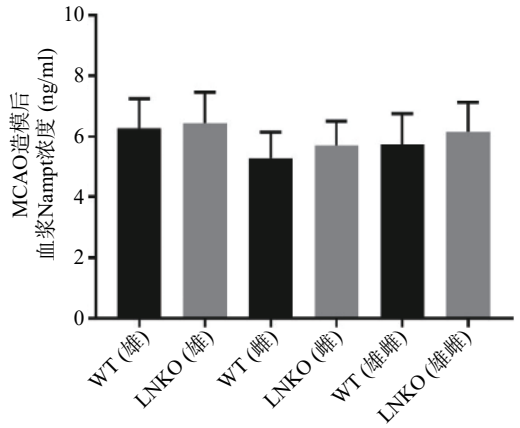

图 8　肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠 MCAO 造模 24 h 后血浆 Nampt 蛋白表达 (n≥6)

WT: 肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠同窝对照；
LNKO: 肝脏特异性 Namp 基因敲除小鼠。

4　讨论

本研究利用 Cre/loxP 重组酶系统成功构建肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠，并证实肝脏来源 Nampt 对缺血性脑卒中没有明显保护作用。

Cre/loxP 重组酶系统介导的基因打靶方法是目前应用最为广泛的基因条件性敲除方法。loxP 序列中的特殊回文结构可以被 Cre 酶特异性识别结合并催化两个 loxP 序列之间的片段发生同源重组，进而实现对该片段的基因敲除。我们通过基因鉴定和肝脏 Nampt 蛋白免疫印迹从基因和蛋白两个层面对该动物模型进行验证，结果都表明小鼠肝脏 Nampt 基因被特异性敲除。以同窝对照为

阴性对照，监测两组小鼠的一般状况，发现其体重、活动状态等无显著差异。有研究曾比较 10、55、110 周雌性肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠与对照小鼠体重，两者无显著性差异，这与本研究结果一致[16]。

Nampt 是一种脂肪细胞因子，可由脂肪组织大量分泌。除此以外，其他如肝细胞，白细胞，单核细胞，B 细胞，心肌细胞和各种神经细胞也可分泌 Nampt，目前认为脂肪、肝脏和白细胞是血液 Nampt 来源的主要器官[3]，但是血液中 Nampt 的各组织分泌的贡献率并不是十分清楚。本研究首次显示特异性敲除小鼠肝脏 Nampt 基因的表达并不能显著影响生理情况下血浆 Nampt 蛋白浓度，这是基于肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠的一个在体研究结果，不同于前期的相关研究。前期研究报道了肝脏 HepG2 细胞[15]、大鼠来源肝细胞[14-15] 和原代人的肝细胞[15] 可以大量分泌 Nampt 蛋白，这些结论主要基于的都是体外的细胞实验，没有研究整体的动物和人。本研究结果说明生理状态下肝脏 Nampt 的分泌水平可能相对较低，对血液 Nampt 的贡献率不如脂肪组织。肝脏特异性 Nampt 基因敲除导致的 Nampt 分泌减少在生理状态下可能仍然能够被脂肪等组织很好地代偿，因而血浆 Nampt 水平不改变。在这点上，脂肪特异性 Nampt 基因敲除对血液 Nampt 水平的影响更大。Yoon 等[18] 发现雌性脂肪特异性 Nampt 基因敲除鼠的血浆 Nampt 水平显著低于雌性对照鼠。此外，研究结果说明肝脏特异性敲除 Nampt 基因表达后，性别因素并不显著影响肝脏对血液 Nampt 的贡献率，这与脂肪特异性 Nampt 基因敲除小鼠有所不同[18]。

但是肝脏特异性 Nampt 基因敲除是否影响外周血 Nampt 水平还可能与病理状态和禁食因素等有关。有研究报道与健康对照组相比，肝硬化患者的血液 Nampt 水平显著升高[19]，提示病理状态时肝脏对血液 Nampt 的贡献会发生改变。另一方面，血液 Nampt 水平受禁食因素影响，所以检测结果和动物进食状态有关。有研究发现禁食会升高 Nampt 血液水平[18]。本研究在未禁食下检测，肝脏特异性 Nampt 基因敲除不改变血液 Nampt 水平。但在禁食状态下，各组织对血液 Nampt 贡献情况很可能会发生改变，从而引起血液 Nampt 水平变化。本研究所反映的仅是在非禁食的生理状态下以及脑缺血后的肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠的外周血 Nampt 水平，在其他条件下肝脏特异性 Nampt 基因敲除是否对血液 Nampt 水平有影响有待进一步研究。

本研究的一个重要目的是确认肝脏来源 Nampt 是否参与脑缺血损伤及修复。在缺血性脑卒中时，机体除了调动脑内细胞的 Nampt 发挥保护作用，肝脏来源的 Nampt 是否也参与了机体的内在防御修复作用仍属未知。本研究采用电凝法制备脑卒中模型和肝脏特异性 Nampt 基因敲除动物开展研究。电凝法手术在直视下操作，手术中出血量少，造模成功率高，导致的脑缺血效果稳定，可模拟永久性脑梗死。造模后小鼠出现轻度到中度神经功能损伤，脑片 TTC 染色出现白色梗死区域，说明电凝法可成功制备 MCAO 模型。肝脏特异性 Nampt 基因敲除小鼠肝脏 Nampt 蛋白表达下降，而脑内 Nampt 蛋白表达不受影响，非常适合本课题的研究目的。研究结果显示，同一性别，与野生型相比，肝脏特异性 Nampt 基因敲除并不影响脑卒中的相对梗死体积和神经行为学评分，说明肝脏来源 Nampt 不主要参与脑缺血损伤及修复。这一结果的原因可能与肝脏来源 Nampt 对血液 Nampt 的贡献率不大有关。血液 Nampt 的水平是外周 Nampt 发挥脑生物学功能的基础。在正常条件下，本研究已证实肝脏来源 Nampt 对血液 Nampt 的贡献率不大。在脑卒中条件下，卒中后 24 h 肝脏特异性 Nampt 基因敲除组和对照组小鼠血液 Nampt 水平无显著性差异，也说明肝脏来源 Nampt 对卒中后血液 Nampt 变化的贡献率不大。

本研究显示，肝脏特异性 Nampt 基因敲除后，雄性小鼠比雌性小鼠血浆中 Nampt 表达水平略高，但是后续这两种性别小鼠在缺血后脑梗死面积并没有显著性差异。在生理状态下，LNKO 雄性比 LNKO 雌性血液 Nampt 水平表达略高。脑卒中 24 h 后，LNKO 雄性小鼠比 LNKO 雌性小鼠血液 Nampt 水平有升高趋势，但无统计学差异。这两个血液水平的结果是比较一致的。同样，从脑梗死结果来看，虽然 LNKO 雌性小鼠的脑梗死体积和 LNKO 雄性小鼠相比无统计学差异，但是有升高趋势。从行为学评分来看，LNKO 雌性小鼠的神经功能学损伤评分相比 LNKO 雄性小鼠也有升高趋势。这两个结果与血液水平也是总体一致的。

血液水平 Nampt 改变仅仅是影响脑梗死严重程度的一个因素，组织水平 Nampt 改变也会影响脑梗死程度。不仅如此，动物的个体差异，手术操作的差异，也会影响脑梗死程度。因此，在现有的动物例数下，两种性别的小鼠在缺血后脑梗死面积并没有统计学差异。后续可以考虑进一步扩大例数，

确认两种性别小鼠在脑梗死程度上是否存在差别，并同时观察脑组织 Nampt 水平是否在两种性别小鼠脑缺血模型上有差别，以明确不同性别小鼠外周来源 Nampt 和脑组织 Nampt 对卒中的影响是否存在差异。

Nampt 是防治脑卒中的内源性靶点[3]，是兼具有多种重要功能的脂肪因子。已知 Nampt 可被分泌入血，血液 Nampt 具有酶活性，有生物学功能[12]。外周来源 Nampt 很可能是机体维持生理稳态，在病理状态下加强防御、促进修复的重要内源性调控因子。因此，确认 Nampt 的血液来源和探究血液 Nampt 的潜在生物学功能具有重要意义。本研究首次确认了肝脏来源 Nampt 对生理状态血液 Nampt 的贡献情况和对脑缺血损伤的作用，为后续研究打下了重要基础。当然，本研究也存在不足，比如仅观测卒中后 24 h 的情况，未观察多个时间点的卒中情况，以及卒中慢性恢复期的情况。血液 Nampt 的另一个主要来源是脂肪，脂肪来源 Nampt 对血液 Nampt 的贡献情况已有报道[18]，但对脑缺血损伤的作用尚未见报道。这些都有待进一步研究探索。

【参考文献】

[1] CAMPBELL B C V, KHATRI P. Stroke[J]. Lancet, 2020, 396(10244): 129-142.
[2] WANG S N, MIAO C Y. Targeting NAMPT as a therapeutic strategy against stroke[J]. Stroke Vasc Neurol, 2019, 4(2): 83-89.
[3] WANG P, MIAO C Y. NAMPT as a therapeutic target against stroke[J]. Trends Pharmacol Sci, 2015, 36(12): 891-905.
[4] REVOLLO J R, GRIMM A A, IMAI S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(49): 50754-50763.
[5] CHEN F, WENG Z, XIA Q, et al. Intracerebroventricular delivery of recombinant NAMPT deters inflammation and protects against cerebral ischemia[J]. Transl Stroke Res, 2019, 10(6): 719-728.
[6] ZHU T, XIE W J, WANG L, et al. Notoginsenoside R1 activates the NAMPT-NAD$^+$-SIRT1 cascade to promote postischemic angiogenesis by modulating Notch signaling[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 140: 111693.
[7] WANG X, LI H, DING S. Pre-B-cell colony-enhancing factor protects against apoptotic neuronal death and mitochondrial damage in ischemia[J]. Sci Rep, 2016, 6: 32416.
[8] HOUTKOOPER R H, CANTÓ C, WANDERS R J, et al. The secret life of NAD+: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways[J]. Endocr Rev, 2010, 31(2): 194-223.
[9] LIU J, CHE X, YOU J, et al. Intracellular Nampt impairs esophageal squamous cell carcinoma neo-adjuvant chemotherapy response independent of eNampt[J]. Am J Transl Res, 2021, 13(3): 1411-1421.
[10] DAKROUB A, NASSER S A, YOUNIS N, et al. Visfatin: a possible role in cardiovasculo-metabolic disorders[J]. Cells, 2020, 9(11): 2444.
[11] ZHOU L, ZHANG S, BOLOR-ERDENE E, et al. NAMPT/SIRT1 attenuate ang II-induced vascular remodeling and vulnerability to hypertension by inhibiting the ROS/MAPK pathway[J]. Oxidative Med Cell Longev, 2020, 2020: 1974265.
[12] ZHAO Y, LIU X Z, TIAN W W, et al. Extracellular visfatin has nicotinamide phosphoribosyltransferase enzymatic activity and is neuroprotective against ischemic injury[J]. CNS Neurosci Ther, 2014, 20(6): 539-547.
[13] LU L F, YANG S S, WANG C P, et al. Elevated visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor plasma concentration in ischemic stroke[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2009, 18(5): 354-359.
[14] ŠKOP V, KONTROVÁ K, ZÍDEK V, et al. Autocrine effects of visfatin on hepatocyte sensitivity to insulin action[J]. Physiol Res, 2010: 615-618.
[15] GARTEN A, PETZOLD S, BARNIKOL-OETTLER A, et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is constitutively released from human hepatocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391(1): 376-381.
[16] DALL M, TRAMMELL S A J, ASPING M, et al. Mitochondrial function in liver cells is resistant to perturbations in NAD+ salvage capacity[J]. J Biol Chem, 2019, 294(36): 13304-13326.
[17] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
[18] YOON M J, YOSHIDA M, JOHNSON S, et al. SIRT1-mediated eNAMPT secretion from adipose tissue regulates hypothalamic NAD+ and function in mice[J]. Cell Metab, 2015, 21(5): 706-717.
[19] MOSCHEN A R, GERNER R, SCHROLL A, et al. A key role for Pre-B cell colony-enhancing factor in experimental hepatitis[J]. Hepatology, 2011, 54(2): 675-686.

［收稿日期］ 2021-07-22　［修回日期］ 2021-10-27
［本文编辑］ 李睿旻