

• 论 著 •

SIRT3 通过 Rb/p16 途径促进肝癌细胞衰老的研究*

宋春丽¹, 黄 荣¹, 李泽华², 周义文^{1△}

(南方医科大学深圳医院: 1. 临床检验医学中心; 2. 烧伤整形科, 广东深圳 518100)

摘 要:目的 探讨沉默信息调节因子 3(SIRT3)对肝癌细胞老化的作用,并初步研究其作用机制。方法 通过转染 SIRT3 基因,使其在肝癌细胞内过表达。用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 技术验证 SIRT3 基因的过表达效果;BrdU 标记实验检测它对肝癌细胞增殖的影响; β -半乳糖苷酶染色检测肝癌细胞的老化情况;Western blot 检测它对衰老相关基因 Rb、p16、P53 蛋白表达的影响。结果 SIRT3 过表达质粒使肝癌细胞中 SIRT3 的 mRNA 及蛋白水平明显增加。SIRT3 基因的过表达能抑制肝癌细胞的增殖,抑制率为 40%~50%;同时,SIRT3 基因过表达能显著诱导肝癌细胞 G₂ 期周期阻滞;转染 pc-DNA3.1 质粒的对照组细胞处于 G₂ 期比例为(22.83±1.58)%,而转染 SIRT3 基因的实验组处于 G₂ 期细胞为(35.65±1.55)%;SIRT3 基因过表达使肝癌细胞中衰老相关的 β -半乳糖苷酶染色较对照组显著增高,阳性细胞占 40%~50%,差异有统计学意义($P<0.05$),并伴随衰老相关基因 Rb、p16 蛋白表达水平明显增加。结论 SIRT3 基因过表达可能通过 Rb/p16 途径促进肝癌细胞衰老。

关键词:沉默信息调节因子 3; 肝细胞癌; 细胞衰老

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.16.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)16-2220-04

Study on the SIRT3 inducing senescence in hepatocellular carcinoma cells through the Rb/p16 pathway*

SONG Chunli¹, HUANG Rong¹, LI Zehua², ZHOU Yiwen^{1△}

(1. Center for Clinical Laboratory Medicine, Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518100, China; 2. Burn and Plastic Surgery Department, Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518100, China)

Abstract:Objective To study the effect of SIRT3 gene(SIRT3) on aging of hepatocellular carcinoma cells(HCC) and its mechanism. **Methods** SIRT3 over-expression was targeted by plasmid transfected technology. Effect of SIRT3 on aging of HCC was detected by RT-PCR and Western blot, respectively. Proliferation of HCC was assayed by Brdu-labeling test. Cell cycle of HCC was displayed by flow cytometry. Aging of HCC was observed with SA- β -gal staining. Aging-related Rb, p16, P53 proteins were demonstrated by Western blot. **Results** SIRT3 over-expression significantly upregulated the SIRT3 mRNA and protein expression levels in HCC. SIRT3 suppressed the proliferation of HCC with an suppression rate of 40%—50%, and significantly induced cell cycle arrest of HCC at stage G₂. The proportion of pc-DNA3.1, SIRT3 plasmid transfected HCC at stage G₂ was about (22.83±1.58)% and (35.65±1.55)%. The aging-related β -galactosidase-stained HCC were significantly greater with a positive rate of 40%—50% ($P<0.05$), and the aging-related Rb, p16 protein expression levels were significantly higher. **Conclusion** SIRT3 promotes the aging of HCC possibly through the Rb/p16 pathway.

Key words: SIRT3; hepatocellular carcinoma; cell aging

肝细胞癌(HCC)占原发性肝癌的 90%^[1]。HCC 起病隐匿,出现典型临床症状时大多已处于中晚期,失去手术机会,自然生存期不超过半年^[2]。sirtuin 家族是一类依赖烟碱腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)的Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶^[3],包括 SIRT1~SIRT7,沉默信息调节因子 3(SIRT3)是线粒体内主要的去乙酰化酶,一般存在于线粒体基质中,在成熟过程中它的 N 末端在线粒体基质容易被水解。只有被切割的 SIRT3 蛋白才具有活性,当 SIRT3 信号肽被切除以后,它使组蛋白去乙酰化从而发挥其活性。SIRT3 作为一种线粒体蛋白,主要在以下方面发挥着重要作用,如细胞凋亡^[4]、物质代谢^[5]、细胞老化^[6]、能量产生^[7]和细胞内信号控制等^[8]。近年来 SIRT3 在肿瘤中的作用日益受到人们的关注,但其在 HCC 中发生、发展过程中的机制还不完全清楚。本研究通过将过表达 SIRT3

基因的质粒转染于肝癌细胞中,检测 SIRT3 基因过表达对肝癌细胞老化的作用,并初步探讨其作用机制,以寻求其对肝癌基因治疗的意义。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 荧光定量 PCR 仪、Western blot 电泳仪、Western blot 电转膜仪均购自美国 Bio-rad 公司,Mastercycler96 孔普通 PCR 仪、5810R 台式高速低温离心机购自美国 Eppendorf 公司,酶标仪购自美国 Gene Company Limited 公司。

1.1.2 试剂 人肝癌细胞株 SK-Hep-1 购自 ATCC 公司, SIRT3 质粒(载体为 pc-DNA3.1)、pc-DNA3.1 质粒购自 Addgene 公司。BrdU ELISA 试剂盒购自罗氏公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术公司, SIRT3 抗体(#

* 基金项目:广东省医学科学技术研究基金资助项目(A2016568);广东省深圳市卫生计生系统科研基金(201601043)。

作者简介:宋春丽,女,主管技师,主要从事分子生物学研究。△ 通讯作者,E-mail:yiwenzhou21@aliyun.com。

2627)、P16 抗体(# 4824)、P53 抗体(# 2527)、Rb 抗体(# 9313)、 β -actin 抗体(# 4970) 购自 CST 公司,二抗购自瑞典 GE healthcare 公司。反转录试剂盒购自美国伯乐公司,Light-Cycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Roche 12239264001 购自罗氏公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 SK-Hep-1 肝癌细胞株在含有 1% 青/链霉素、10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,放置于 37 °C 细胞培养箱,于 5% CO₂ 的环境中进行常规培养。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 SIRT3 基因过表达的 mRNA 水平 提取细胞中的 RNA,用 30 μ L 去 RNA 酶的水将 RNA 溶解,测浓度,电泳检测 RNA 提取质量,纯度合格后构建反转录反应体系:1 000 ng RNA,5 $\times$ 反应混合液 4 μ L, iScript 酶混合液 1 μ L,去 RNA 酶水补齐至 20 μ L。充分混匀后按以下条件反应:25 °C 5 min,42 °C 30 min,85 °C 5 min,4 °C 10 min。构建 10 μ L qPCR 体系:反转录产物 1 μ L,去 RNA 酶水 3.6 μ L,SYBR Green qPCR Mix(2 $\times$)5 μ L,SIRT3 上下游引物(10 μ mol/L)各 0.2 μ L。反应条件:预变性 95 °C 2 min;变性 94 °C 20 s,退火 60 °C 20 s,延伸 72 °C 20 s,随后 75 °C 1 s,34 个循环,从第 2 个循环开始读数,溶解曲线为 55~95 °C,每次波动 1 °C,保持 2 s。SIRT3 引物序列,F:5'-ATC-GATGGGCTTGAGAGAGT-3';R:5'-AGGTTCCATGAGCT-TCAACC-3'。所有测试管均采用三管重复,并重复实验 3 次,取其平均值。

1.2.3 Western blot 检测 SIRT3 基因过表达的蛋白水平 种 SK-Hep-1 细胞(每孔 8×10^4)于 6 孔板中,24 h 后将表达 SIRT3 的质粒转染进 SK-Hep-1 细胞中,同时以 pc-DNA3.1 作为空白对照,24 h 后换液继续培养 72 h,然后裂解细胞进行 Western blot 检测。

1.2.4 BrdU 标记法检测肝癌细胞增殖 SK-Hep-1 细胞以 25×10^4 /mL 细胞数接种于 6 孔板中 24 h 分别转染了 pc-DNA3.1、SIRT3,第 2 天再以 6 000/每孔的细胞数分至 96 孔板培养 2 d,终止细胞培养前,加入 BrdU(终浓度为 30 μ g/L),37 °C 6 h,用 FixDenat37 溶液固定细胞 30 min,加抗 BrdU 单抗(工作浓度 1:100),阴性对照孔加磷酸盐缓冲液(PBS,室温,90 min),酶标仪读取的 OD 值跟细胞内 DNA 的合成速率呈正比。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期 将表达 SIRT3 的质粒转染进 SK-Hep-1 细胞中,以 pc-DNA3.1 作为空白对照,96 h 后收集细胞,应用 5 mL 的 PBS 洗涤收集的细胞 3 次,离心沉淀细胞,弃上清液,70% 预冷的乙醇-20 °C 过夜固定,离心固定过的细胞,弃上清液,PBS 洗涤细胞 3 次用来除去残留的乙醇,用含有 0.2 mg RNase A 的 1 mL PI/Triton X-100 染色液(20 μ g PI/0.1% Triton X-100)重悬细胞,37 °C 染色 15 min。上流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.6 衰老因子相关的 β -半乳糖苷酶染色 将生长状态良好的 SK-Hep-1 细胞接种至 6 孔板中,24 h 后分别转染 pc-DNA3.1、SIRT3 质粒。转染 4 d 后加入 X-Gal 底物,进行跟衰老相关的 β -半乳糖苷酶染色,在光学显微镜下观察变成蓝色的表达 β -半乳糖苷酶的细胞数,随机选择 3 个视野进行观察,每个视野计数 200 个细胞,计算 β -半乳糖苷酶染色阳性的细胞占

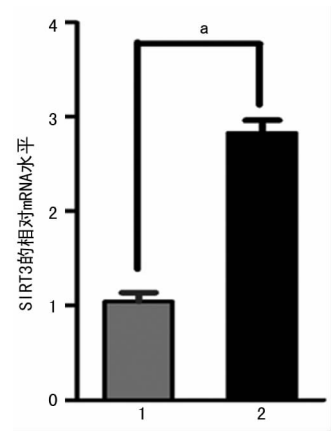
总细胞数的百分比。

1.2.7 Western blot 分析衰老相关蛋白 提取肝癌细胞中的蛋白,BCA 法检测样本蛋白水平,取蛋白总量为 30 μ g 的样品,加入对应体积的 6 $\times$ SDS 蛋白质电泳上样缓冲液(含 β 巯基乙醇),95 °C 10 min 使蛋白变性,在含有 8% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)的凝胶中 120 V 恒压电泳 1.5 h,然后 90 V 恒压转膜 4 h,将 NC 膜转至 5% 脱脂牛奶中封闭,摇床上室温 1 h,TBST 洗涤后分别加入用 5% BSA 稀释的一抗中(SIRT3 抗体的工作浓度 1:3 000,P16 抗体、P53 抗体、Rb 抗体的工作浓度均为 1:1 500),摇床,4 °C 过夜,1 $\times$ TBST 洗涤 3 次,将 NC 膜置于用 5% 脱脂牛奶稀释用 HRP 标记的二抗(工作浓度 1:3 000)中,摇床,室温 2 h 后,1 $\times$ TBST 洗涤 3 次,5 min 1 次,然后将 NC 膜置于暗盒中 ECL 显影曝光。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

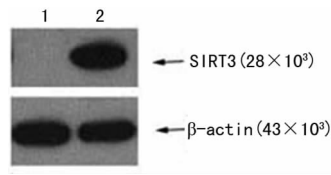
2.1 qPCR 检测 SIRT3 的过表达效果 将 SIRT3 质粒转染 SK-Hep-1 细胞,同时以 pc-DNA3.1 作为空白对照,转染 72 h 后提取细胞总 RNA。结果显示转染了 SIRT3 质粒的肝癌细胞 mRNA 水平较对照组明显增加,说明 SIRT3 基因的过表达是成功的。见图 1。



注:1 为 pc-DNA3.1;2 为 SIRT3;**P* < 0.05。

图 1 qPCR 检测细胞中 SIRT3 的 mRNA 水平

2.2 Western blot 检测 SIRT3 基因过表达的蛋白水平 将 SIRT3 质粒转染 SK-Hep-1 细胞,同时以 pc-DNA3.1 作为空白对照,转染 72 h 后提取细胞蛋白裂解液进行 Western blot 检测,结果显示转染了 SIRT3 质粒的肝癌细胞中 SIRT3 基因的蛋白水平较对照组明显增加,说明 SIRT3 的蛋白水平也成功地过表达,见图 2。

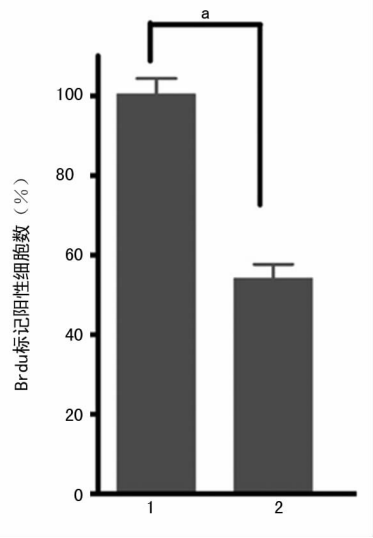


注:1 为 pc-DNA3.1;2 为 SIRT3。

图 2 Western blot 检测细胞中 SIRT3 的蛋白水平

2.4 SIRT3 基因过表达对细胞周期的影响 将 pc-DNA3.1、SIRT3 质粒分别转染 SK-Hep1 细胞,转染 96 h 后固定细胞进

行流式细胞术分析。结果显示,转染 SIRT3 的细胞处于 G₂ 期细胞较对照组细胞(pc-DNA3.1 组)明显增加($P<0.05$),说明 SIRT3 基因过表达会诱使细胞产生 G₂ 期细胞周期阻滞。见图 3 和表 1。

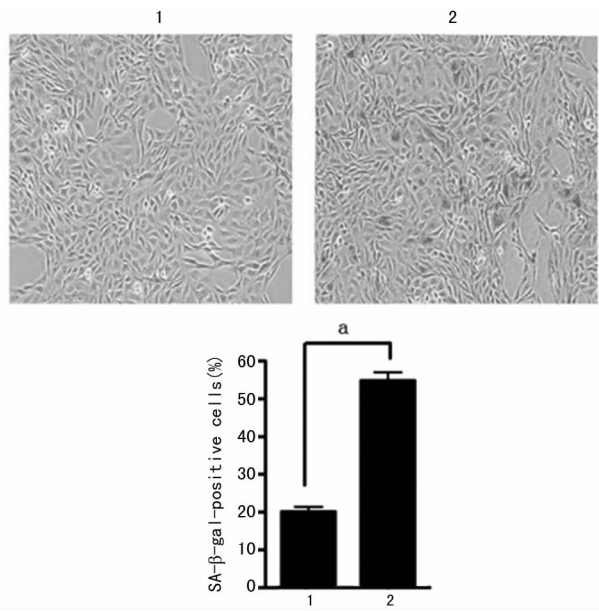


注:1 为 pc-DNA3.1;2 为 SIRT3;^a $P<0.05$ 。
图 3 BrdU 标记实验检测 SIRT3 基因过表达对肝癌细胞增殖的影响

表 1 流式细胞术检测细胞周期 (%)

组别	G ₁	S	G ₂
pcDNA3.1 组	47.94±0.29	29.23±1.32 ^a	22.83±1.58 ^a
SIRT3 组	52.07±1.56	12.28±1.54 ^a	35.65±1.55 ^a

注:与 pc-DNA3.1 组比较,^a $P<0.05$ 。



注:1 为 pc-DNA3.1;2 为 SIRT3;^a $P<0.05$ 。
图 4 β-半乳糖苷酶染色检测(×200)并计数阳性细胞数百分比

2.5 SIRT3 基因过表达诱导肝癌细胞衰老 在光学显微镜下观察到变成蓝色的表达 β-半乳糖苷酶的细胞数较对照细胞明显增多;在 SK-Hep1 细胞中,转染 SIRT3 质粒的细胞的染色

阳性细胞数比对照细胞多近 3 倍,以上结果说明 SIRT3 过表达诱导肝癌细胞老化。见图 4。

2.6 SIRT3 基因过表达促进衰老相关蛋白 Rb、p16 和 p53 的表达 Western blot 结果显示在 SK-Hep1 细胞中,SIRT3 基因过表达使 SK-Hep1 细胞中 Rb 蛋白和 p16 蛋白的表达量明显增多,而 p53 蛋白的表达量却没有明显变化。Rb 可以通过诱导 p16 的表达从而引起细胞周期阻滞,从而在细胞衰老中起关键作用。提示 SIRT3 过表达可能通过调控 Rb/p16 途径诱导了细胞衰老。见图 5。

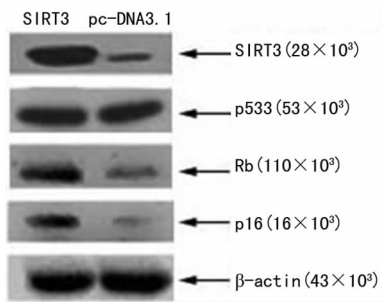


图 5 Western blot 分析转染 SIRT3 质粒 96 h 后的细胞中 Rb、p16 和 p53 蛋白水平

3 讨论

近年来,SIRT3 在肿瘤发生、凋亡及调控中的作用越来越受到人们的关注。SIRT3 可以通过调节 KU70-Bax 通路参与细胞凋亡^[9],通过去乙酰化 SOD2、MnSOD 来调节氧化应激反应^[10-11],通过调节 p53 途径来诱导老化等^[7]。SIRT3 在一些肿瘤中也起着双重调节的作用,比如它在口腔癌中表达上调,对口腔癌起促进肿瘤发生的作用^[12],而在乳腺癌^[13]、骨肉瘤^[14]、结肠癌^[15]中表达降低,对肿瘤起抑制作用。SIRT3 在肝癌中的作用及机制,目前国内外这方面的报道很少。本研究通过前期大量 HCC 标本的筛查,发现 SIRT3 在人 HCC 组织中的表达明显低于癌旁组织,同时发现 SIRT3 在多个肝癌细胞系中也呈现低表达状态^[16]。在本研究中发现 SIRT3 过表达可使肝癌细胞受到明显抑制,引起细胞周期 G₂ 期细胞阻滞,并使与老化相关的 β-半乳糖苷酶明显增加,Western blot 检测发现部分老化相关基因(Rb、p16)的蛋白表达水平均明显增加,而 p53 蛋白表达却没有明显变化,从而得出 IRT3 基因的过表达可能通过 Rb/p16 途径,而不是 p53/p21 途径促进肝癌细胞衰老从而抑制细胞的增殖。笔者前期报道过 SIRT1 基因沉默后引起细胞周期 G₁ 期细胞阻滞,衰老相关基因 p53 和 p21 蛋白表达增加,可能通过 p53/p21 途径促进细胞衰老^[17]。说明 SIRT1 和 SIRT3 虽同属于 sirtuin 家族,但在肝癌细胞衰老中的作用路径和调控机制却有明显差异,甚至发挥相反的作用,特别是其作用在细胞内的信号通路也会有明显不同,进一步加深了研究者对 sirtuin 家族了解的兴趣。

细胞衰老是引起生物体老化的一种潜在因素,也被认为是生物体抑制肿瘤的一种方式。目前研究报道普遍认为端粒长度的缩短是触发细胞老化的关键因素^[18-19]。本课题计划下一步将合成 Rb 和 p16 siRNA,观察 Rb 和 p16 基因干扰后是否逆转 SIRT3 过表达引起的部分老化,以提供更充分的证据确定它是否通过 Rb/p16 途径引起肝癌细胞的衰老,并通过 qPCR 筛查端粒酶反转录酶(TERT)和保护端粒蛋白复合体

(包括 TRF1 和 POT1 等)以及其他的端粒相关蛋白,希望通过
对 SIRT3 在 HCC 中的功能鉴定和研究,加深对肝癌细胞老化
机制的认识,为寻找新的肝癌治疗靶点打下基础。

参考文献

[1] Brau N, Fox RK, Xiao P, et al. Presentation and outcome of hepatocellular carcinoma in HIV infected patients; a U. S. -Canadian multicenter study [J]. J Hepatol, 2007, 47 (4):527-537.

[2] Yuen MF, Hou JL, Chutaputti A, et al. Hepatocellular carcinoma in the Asia pacific region [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(3):346-353.

[3] Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, et al. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase [J]. Nature, 2000, 403(6771): 795-800.

[4] Marfe G, Tafani M, Indelicato M, et al. Kaempferol induces apoptosis in two different cell lines via Akt inactivation, Bax and SIRT3 activation, and mitochondrial dysfunction [J]. J Cell Biochem, 2009, 106(4):643-650.

[5] Hirschey MD, Shimazu T, Huang JY, et al. SIRT3 regulates mitochondrial protein acetylation and intermediary metabolism [J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011, 76:267-277.

[6] Li S, Banck M, Mujtaba S, et al. p53-induced growth arrest is regulated by the mitochondrial SirT3 deacetylase [J]. PLoS One, 2010, 5(5):e10486.

[7] Ahn BH, Kim HS, Song S, et al. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2008, 105(38):14447-14452.

[8] Jing E, Emanuelli B, Hirschey MD, et al. Sirtuin-3(Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2011, 108(35):14608-14613.

[9] Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, et al. SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that pro-

tects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70 [J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(20):6384-6401.

[10] Qiu X, Brown K, Hirschey MD, et al. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation [J]. Cell Metab, 2010, 12(6):662-667.

[11] Tao R, Coleman MC, Pennington JD, et al. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress [J]. Mol Cell, 2010, 40(6):893-904.

[12] Alhazzazi TY, Kamarajan P, Joo N, et al. Sirtuin-3 (SIRT3), a novel potential therapeutic target for oral cancer [J]. Cancer, 2011, 117(8):1670-1678.

[13] Zhang L, Ren X, Cheng Y, et al. Identification of Sirtuin 3, a mitochondrial protein deacetylase, as a new contributor to tamoxifen resistance in breast cancer cells [J]. Biochem Pharmacol, 2013, 86(6):726-733.

[14] Aquila PD, Rose G, Panno ML, et al. SIRT3 gene expression; a link between inherited mitochondrial DNA variants and oxidative stress [J]. Gene, 2012, 497(2):323-329.

[15] Bell EL, Emerling BM, Ricoult SJ, et al. SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1alpha and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production [J]. Oncogene, 2011, 30(26):2986-2996.

[16] Song CL, Tang H, Ran LK, et al. Sirtuin 3(SIRT3) inhibits hepatocellular carcinoma growth through the glycogen synthase kinase-3 β /BCL2-associated X protein-dependent apoptotic pathway [J]. Oncogene, 2016, 35(5):631-641.

[17] 宋春丽, 任吉华, 张祯祯, 等. SIRT1 基因沉默诱导肝癌细胞老化及其机制 [J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(19):1929-1932.

[18] Deng, Y, Chan SS, Chang S. Telomere dysfunction and tumour suppression; the senescence connection [J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(6):450-458.

[19] Stewart SA, Weinberg RA. Telomeres: cancer to human aging [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006, 22:531-557.

(收稿日期:2016-06-23 修回日期:2016-07-29)

统计资料类型

统计资料共有三种类型:计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料,指通过度量衡的方法,测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小,得到的一系列数据资料,其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到,如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组,然后分别清点各组观察单位(受试对象)的个数,其特点是没有度量衡单位,多为间断性资料,如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组,男性组有 72 例,女性组有 70 例,即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料,可通过半定量的方法测量,其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值,各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同,如根据某种药物的治疗效果,将患者分为治愈、好转、无效或死亡。