

• 论 著 •

SIRT3 过表达抑制肝癌细胞的迁移与侵袭*

宋春丽,张 琰,周义文[△]

南方医科大学深圳医院临床检验医学中心,广东深圳 518100

摘 要:**目的** 探讨沉默信息调节因子(SIRT)3 对肝癌细胞迁移与侵袭能力的影响。**方法** 用对照 pc-DNA3.1 质粒转染 Huh-7 细胞(对照组),用 SIRT3 质粒转染 Huh-7 细胞(实验组)。用实时荧光定量 PCR 检测两组 SIRT3 mRNA 表达水平,用蛋白质印迹法检测两组 SIRT3 蛋白表达水平。SIRT3 过表达成功后,用细胞划痕实验和细胞侵袭实验检测 SIRT3 过表达 Huh-7 细胞的迁移和侵袭能力。**结果** 与对照组相比,实验组 SIRT3 mRNA、蛋白表达水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。细胞划痕实验结果显示,划痕 48 h 时,实验组两侧细胞间的距离明显宽于对照组,迁移距离较短。细胞侵袭实验结果显示,两组细胞接种于上室 10 h 后收集,显微镜下计数,对照组每个视野为(45 ± 5)个细胞,实验组每个视野为(25 ± 2)个细胞,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** SIRT3 过表达抑制肝癌细胞的迁移与侵袭,其有望作为肝癌治疗新的分子生物学靶点。

关键词:沉默信息调节因子 3; 肝癌; 迁移; 侵袭

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.12.004 **中图法分类号:**R735.7

文章编号:1673-4130(2021)12-1423-04 **文献标志码:**A

SIRT3 overexpression inhibits migration and invasion of hepatoma carcinoma cells*

SONG Chunli,ZHANG Yan,ZHOU Yiwen[△]

Clinical Laboratory Medicine Center,Shenzhen Hospital,Southern Medical University,
Shenzhen,Guangdong 518100,China

Abstract: Objective To explore the influence of silent information regulator (SIRT) 3 on the migration and invasion of hepatoma carcinoma cells. **Methods** Transfected Huh-7 cells with control pc-DNA3.1 plasmid (control group),and transfected Huh-7 cells with SIRT3 plasmid (experimental group). Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression level of SIRT3 mRNA in the two groups,and the expression levels of SIRT3 protein in the two groups were detected by Western blot. After successful overexpression of SIRT3,cell scratch test and cell invasion test were used to detect the migration and invasion ability of SIRT3 overexpressing Huh-7 cells. **Results** Compared with the control group,the expression levels of SIRT3 mRNA and protein in the experimental group were significantly increased,and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The results of the cell scratch test showed that at 48 h of scratching,the distance between the cells on both sides of the experimental group was significantly wider than that of the control group,and the migration distance was shorter. The results of cell invasion test showed that the cells in the two groups were collected 10 h after inoculation in the upper chamber,and counted under the microscope,the number of cells in each field was (45 ± 5) in the control group,and the number of cells in each field was (25 ± 2) in the experimental group,the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** SIRT3 overexpression inhibits the migration and invasion of hepatoma carcinoma cells,and it is expected to serve as a new molecular biological target for the treatment of hepatoma carcinoma.

Key words:silent information regulator 3; hepatoma carcinoma; migration; invasion

肝癌是我国常见的恶性肿瘤,其起病隐匿、进展迅速、恶性程度高、病死率高^[1]。sirtuin 蛋白家族是近年来发现的一类烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)依赖的组蛋白去乙酰化酶,包括沉默信息调节因子

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81702088)。

作者简介:宋春丽,女,副主任技师,主要从事乙肝和肝癌的分子机制研究。 [△] 通信作者,E-mail:yiwenzhou21@126.com。

本文引用格式:宋春丽,张琰,周义文. SIRT3 过表达抑制肝癌细胞的迁移与侵袭[J]. 国际检验医学杂志,2021,42(12):1423-1426.

(SIRT)1~SIRT7。其中, SIRT3 是线粒体内主要的去乙酰化酶, 其在被线粒体基质加工肽酶切割后活化, 全长 SIRT3 驻留在细胞核中, 在相关因素(例如 DNA 损伤)影响下, SIRT3 会迁移到线粒体内。SIRT3 目前已知的功能包括参与细胞凋亡、能量代谢、热量限制、氧化应激等^[2-6]。近年来, 关于 SIRT3 在肿瘤发生、发展中的作用受到越来越多的关注。本研究在肝癌细胞株 Huh-7 中转染 pc-DNA3.1 质粒(对照)及 SIRT3 质粒, 用细胞划痕实验和细胞侵袭实验来探索 SIRT3 基因过表达对肝癌细胞迁移能力和侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料来源 人肝癌细胞株 Huh-7 来自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

1.2 仪器与试剂 蛋白质印迹法(Western blot)电泳仪、电转膜仪、实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)扩增仪均购自美国伯乐公司; 高速低温离心机购自德国艾本德股份有限公司; 酶标仪购自美国 Genecopoeia 公司; DMEM 培养基、胎牛血清、二甲基亚砷(DMSO)、青链霉素双抗购自美国赛默飞世尔公司; 对照 pc-DNA3.1 质粒、构建在载体 pc-DNA3.1 上的 SIRT3 质粒购自美国 Addgene 公司; SIRT3 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; SYBR Green PCR 反应混合液购自瑞士 Roche 公司; 反转录 PCR 试剂盒购自美国伯乐公司; 蛋白浓度检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; SIRT3 抗体购自美国 CST 公司; 辣根过氧化物酶标记二抗购自美国 GE 公司; Transwell 小室购自美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人肝癌细胞株 Huh-7 培养于 10% 高糖 DMEM 培养基中(含 10% 胎牛血清), 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 待细胞长满培养皿的 80% 后进行传代, 接种于 6 孔板中, 每孔约 8 × 10⁴ 个细胞; 于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 用对照 pc-DNA3.1 质粒转染 Huh-7 细胞(对照组), 用 SIRT3 质粒转染 Huh-7 细胞(实验组), 24 h 后换液, 转染 72 h 后两组均进行 RT-qPCR 和 Western blot 检测。

1.3.2 RT-qPCR 检测 SIRT3 mRNA 表达水平 提取细胞总 RNA, 以随机引物进行反转录合成 cDNA, 于 -20 °C 下保存。取 1.0 μL cDNA, SIRT3 上、下游引物各 0.2 μL 及 5.0 μL SYBR Green PCR 反应混合液, 并补充去 RNA 酶水 3.6 μL 构建 10.0 μL 反应体系, 进行定量 PCR 扩增。扩增条件: 95 °C 2 min (预变性)、94 °C 20 s (变性)、60 °C 20 s (退火)、72 °C 20 s (延伸)、72 °C 1 s, 34 个循环。采用 RT-qPCR 扩

增进行 SIRT3 相对定量分析, SIRT3 上游引物: 5'-ATCGATGGGCTTGAGAGAGT-3', 下游引物: 5'-AGGTTCCATGAGCTTCAACC-3'。β-actin 上游引物: 5'-AGTTGCGTTACACCCTTTCTTGAC-3', 下游引物: 5'-GCTCGCTCCAACCGACTGC-3'。以 β-actin 为内参, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 SIRT3 相对表达水平。实验组和对照组分别取 3 管细胞标本进行检测, 每管重复检测 3 次, 检测结果取平均值。

1.3.3 Western blot 检测 SIRT3 蛋白表达水平 收集实验组和对照组细胞, 冰浴、摇床摇 30 min 充分裂解后离心, 分离出待测蛋白。取 30 μg 待测蛋白标本经 8% SDS-PAGE 电泳, 移至 NC 膜; 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入一抗 SIRT3 抗体(1 : 3 000), 4 °C 摇床孵育 12 h, 洗膜 3 次, 每次 5 min; 加入辣根过氧化物酶标二抗(1 : 3 000), 室温孵育 2 h, 洗膜 3 次, 每次 5 min; 混合发光底物作用 1 min, 将 NC 膜覆于保鲜膜下, 暗箱中显影曝光。用相同方法检测 β-actin 作为内参, 实验重复 3 次。

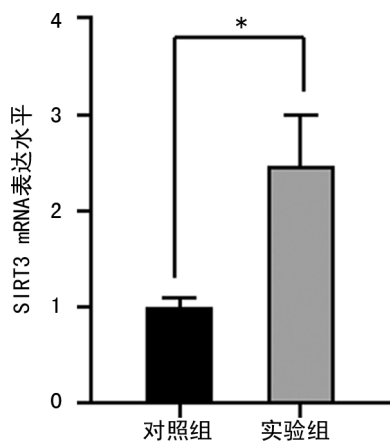
1.3.4 细胞划痕实验检测 Huh-7 细胞的迁移能力 实验组与对照组转染 72 h 后用 10 μL 枪头垂直于培养板中线, 比着直尺划线, 然后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 3 次, 加入 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h, 通过在显微镜下观察划痕两侧细胞的距离来比较 Huh-7 细胞迁移情况。

1.3.5 细胞侵袭实验检测 Huh-7 细胞的侵袭能力 实验组与对照组转染 24 h 后用胰酶消化, 上室(包被 Matrigel 碳酸酯滤膜, 滤膜孔径为 8 μm)每孔分别加入含 Huh-7 细胞 2 × 10⁴ 个的 DMEM 培养基(无血清)500 μL, 下室加入 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清)700 μL, 孵育条件为 5% CO₂、37 °C、10 h。轻轻擦去上室滤膜未侵袭细胞, 固定后用 0.1% 结晶紫染色 40 min, 清洗后晾干, 20 倍倒置显微镜下随机选取两组 5 个不同视野统计细胞侵袭数量, 取其平均值, 实验重复 3 次。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 SIRT3 mRNA 表达水平比较 与对照组相比, 实验组 SIRT3 mRNA 表达水平明显升高, 差异有统计学意义(*P* < 0.001), 实验组 SIRT3 质粒在 Huh-7 细胞中转染成功。见图 1。



注：与对照组比较，* $P < 0.001$ 。

图 1 RT-qPCR 检测 SIRT3 mRNA 表达水平

2.2 两组 SIRT3 蛋白表达水平比较 与对照组相比，实验组 SIRT3 蛋白表达水平明显升高，差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。

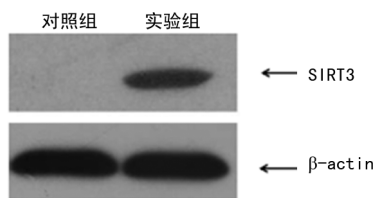


图 2 Western blot 检测 SIRT3 蛋白表达水平

2.3 细胞划痕实验检测 Huh-7 细胞的迁移能力 划痕 48 h 时，对照组两侧边缘的细胞已向中间明显迁移，两侧细胞间距离明显缩短，边缘参差不齐，迁移痕迹较重，而实验组两侧边缘细胞也有缓慢迁移的迹象，但两侧细胞间的距离明显宽于对照组，迁移距离较短。见图 3。

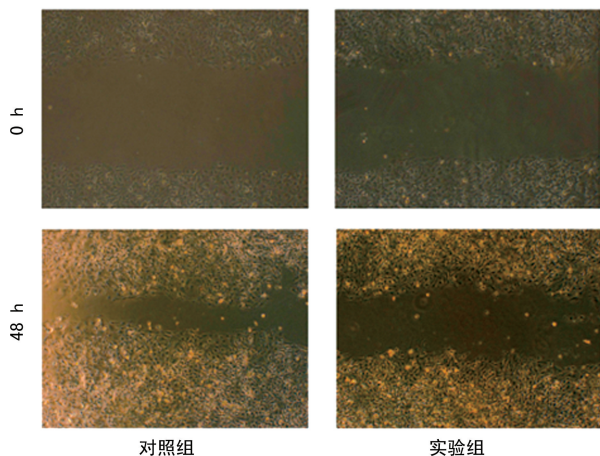


图 3 细胞划痕实验检测 Huh-7 细胞的迁移能力

2.4 细胞侵袭实验检测 Huh-7 细胞的侵袭能力 两组细胞接种于上室 10 h 后收集，显微镜下计数，对照组每个视野为 (45 ± 5) 个细胞，实验组每个视野为 (25 ± 2) 个细胞，差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

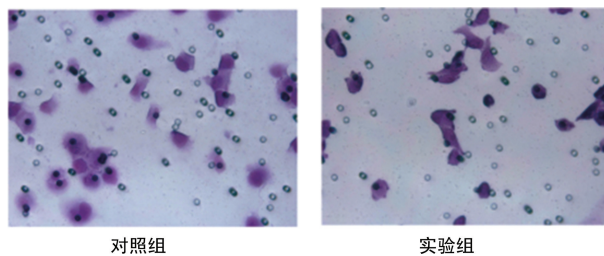


图 4 细胞侵袭实验检测 Huh-7 细胞的侵袭能力

3 讨 论

SIRT3 是一种去乙酰化酶，在肝脏、心脏和褐色脂肪组织等代谢活跃的部位高表达。鉴于目前越来越多的研究将肿瘤定义为代谢性疾病，而线粒体又与代谢密切相关，SIRT3 作为线粒体内主要的去乙酰化酶，猜测其必然与肿瘤代谢有着一定联系。SIRT3 可以通过调控多种细胞代谢通路影响肿瘤细胞的代谢和生长。SIRT3 在一些肿瘤中发挥促进肿瘤生长的作用，如 SIRT3 可以保护宫颈癌细胞免受基因毒性和氧化应激介导的细胞坏死，还可以通过去乙酰化 Ku70，增加 Ku70 与 Bcl-2 相关 X 蛋白(BAX)的结合，防止 BAX 在线粒体易位和应激条件下引起细胞凋亡^[7]；SIRT3 还可使丝氨酸羟甲基转移酶 2 脱乙酰化，从而促进结直肠癌的发生^[8]。SIRT3 在其他一些肿瘤中则发挥抑制肿瘤生长的作用，如 SIRT3 在骨肉瘤中通过调节活性氧和缺氧诱导因子-1 α 发挥抑癌基因的作用^[9]；此外，其还可以通过微小 RNA-708-5p 抑制胰腺癌的进展^[10]。本课题组在前期研究中发现，SIRT3 在肝癌中表达水平明显降低，其对肝癌细胞的增殖起抑制作用，并且可以通过糖原合成酶激酶-3 β /BAX 途径诱导肝癌细胞凋亡^[11]。此外，本课题组还发现，SIRT3 通过调节 P53 途径来诱导肝癌细胞老化^[12]。

迁移和侵袭是恶性肿瘤的重要生物学特征。sirtuin 蛋白家族中的一些成员也陆续被发现有影响肿瘤迁移和侵袭的能力，比如 SIRT5 通过调节乙酰辅酶 A 乙酰转移酶 1 促进前列腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移^[13]；SIRT6 通过细胞外调节蛋白激酶(ERK)1/2-基质金属蛋白酶 9(MMP9)途径促进骨肉瘤细胞的迁移和侵袭^[14]；SIRT7 通过激活 ERK/信号传导与转录激活因子 3 信号通路促进神经胶质瘤细胞的增殖和侵袭^[15]，其还可以通过抑制 E-钙黏蛋白促进结直肠癌细胞的增殖和侵袭^[16]。SIRT3 与肿瘤侵袭、迁移的关系也有较多报道，如其通过调节脂肪酸合酶促进宫颈癌细胞的侵袭和转移^[17]；通过缺氧诱导因子-1 α /磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1/丙酮酸脱羧酶 E1 α 亚蛋白抑制胆管癌的发生^[18]。因此，sirtuin 蛋白家族成员在不同的肿瘤组织中有不同的功能，而且同一成员在不同肿瘤中的功能也有明显差异，说明 sirtuin 家族成员

的功能具有细胞和肿瘤特异性。

本研究初步探讨了 SIRT3 对肝癌细胞迁移和侵袭能力的影响。与对照组相比,实验组 SIRT3 mRNA、蛋白的表达水平明显升高,提示 SIRT3 过表达的肝癌细胞模型构建成功,进一步通过细胞划痕实验和细胞侵袭实验分析过表达 SIRT3 对肝癌细胞迁移和侵袭能力的影响。细胞划痕实验结果显示,48 h 时实验组两侧细胞间的距离明显宽于对照组,说明 SIRT3 过表达抑制了肝癌细胞的迁移能力。细胞侵袭实验结果显示,实验组穿膜细胞数明显少于对照组,表明高表达 SIRT3 的肝癌细胞侵袭能力受到抑制,但目前关于高表达 SIRT3 抑制肝癌细胞迁移、侵袭能力的具体分子机制尚不明确,这也将成为本课题组接下来的研究方向。

综上所述,SIRT3 与肝癌的发生、发展密切相关,SIRT3 的高表达可以抑制肝癌细胞的迁移与侵袭,其有望为肝癌个体化治疗和抗肿瘤药物的开发提供新的方向。

参考文献

[1] WEN Y,ZHOU X Q,LU M T,et al. Belaf1 promotes angiogenesis by regulating HIF- α transcription in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*,2019,38(11):1845-1859.

[2] FAN X S,XIAO M,ZHANG Q H,et al. miR-195-Sirt3 axis regulates angiotensin II-induced hippocampal apoptosis and learning impairment in mice[J]. *Psychol Res Behav Manag*,2019,12:1099-1108.

[3] WANG H N,LI J L,XU T,et al. Effects of Sirt3 autophagy and resveratrol activation on myocardial hypertrophy and energy metabolism[J]. *Mol Med Rep*,2020,22(2):1342-1350.

[4] ARIELA B,PAOLA C,SARA C,et al. Sirt3 deficiency shortens life span and impairs cardiac mitochondrial function rescued by opal gene transfer[J]. *Antioxid Redox Signal*,2019,31(17):1255-1271.

[5] WU J,ZENG Z H,ZHANG W J,et al. Emerging role of SIRT3 in mitochondrial dysfunction and cardiovascular diseases[J]. *Free Radic Res*,2019,53(2):139-149.

[6] DIKALOVA A E,ARVIND P,LIANG X,et al. Mitochondrial deacetylase Sirt3 reduces vascular dysfunction and hypertension while Sirt3 depletion in essential hypertension is linked to vascular inflammation and oxidative stress[J]. *Circ Res*,2020,126(4):439-452.

[7] LUO K,HUANG W,TANG S. Sirt3 enhances glioma cell via-

bility by stabilizing Ku70-BAX interaction[J]. *Onco Targets Ther*,2018,11:7559-7567.

[8] XU H H,GAN C X,GAO Z Q,et al. Caffeine targets SIRT3 to enhance SOD2 activity in mitochondria[J]. *Front Cell Dev Biol*,2020,8:822.

[9] BELL E L,EMERLING B M,RICOULT S J,et al. Sirt3 suppresses hypoxia inducible factor 1 α and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production[J]. *Oncogene*,2011,30(26):2986-2996.

[10] HUANG S S,GUO H,CAO Y,et al. MiR-708-5p inhibits the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting Sirt3[J]. *Pathol Res Pract*,2019,215(4):794-800.

[11] SONG C L,TANG H,RAN L K,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.

[12] 宋春丽,黄荣,李泽华,等. SIRT3 通过 Rb/p16 途径促进肝癌细胞衰老的研究[J]. *国际检验医学杂志*,2016,37(16):2220-2223.

[13] GUAN J Q,JIANG X Z,GAI J D,et al. Sirtuin 5 regulates the proliferation,invasion and migration of prostate cancer cells through acetyl-CoA acetyltransferase 1[J]. *J Cell Mol Med*,2020,24(23):14039-14049.

[14] LIN H,HAO Y,ZHAO Z X,et al. Sirtuin 6 contributes to migration and invasion of osteosarcoma cells via the ERK1/2/MMP9 pathway[J]. *FEBS Open Bio*,2017,7(9):1291-1301.

[15] MU P F,LIU K,LIN Q Y,et al. Sirtuin 7 promotes glioma proliferation and invasion through activation of the ERK/STAT3 signaling pathway[J]. *Oncol Lett*,2019,17(2):1445-1452.

[16] DENG Z G,WANG X B,LONG X,et al. Sirtuin 7 promotes colorectal carcinoma proliferation and invasion through the inhibition of E-cadherin[J]. *Exp Ther Med*,2018,15(3):2333-2342.

[17] XU L X,HAO J H,MA J Q,et al. SIRT3 promotes the invasion and metastasis of cervical cancer cells by regulating fatty acid synthase[J]. *Mol Cell Biochem*,2020,464(1/2):11-20.

[18] XU L,LI Y,ZHOU L X,et al. SIRT3 elicited an anti-Warburg effect through HIF1 α /PDK1/PDHA1 to inhibit cholangiocarcinoma tumorigenesis[J]. *Cancer Med*,2019,8(5):2380-2391.

(收稿日期:2020-11-23 修回日期:2021-02-12)