

文章编号:1000-5404(2012)19-1929-04

论著

SIRT1 基因沉默诱导肝癌细胞老化及其机制

宋春丽¹,任吉华¹,张祯祯²,陶颖¹,陈娟¹ (400016 重庆,重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室¹; 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院感染科²)

[摘要] **目的** 探讨慢病毒介导的沉默信息调节因子1(silent information regulator1, SIRT1)基因沉默对肝癌细胞老化的影响及机制。**方法** 通过慢病毒介导的shRNA干扰技术靶向沉默SIRT1的表达,并通过Real-time PCR和Western blot验证SIRT1基因的沉默效果。BrdU标记实验检测细胞增殖情况,流式细胞仪检测细胞周期变化; β -半乳糖苷酶染色观察肝癌细胞有无老化;Western blot检测衰老相关基因p53和p21蛋白的变化。**结果** 慢病毒介导的shRNA能显著抑制细胞SIRT1的mRNA及蛋白水平。SIRT1沉默能抑制肝癌细胞的增殖,抑制率达70%~80%;同时,SIRT1沉默能显著诱导G₁期细胞周期阻滞:感染shCont的细胞处于G₁期比例为(44.29±0.36)%,而感染shSIRT1-1的细胞处于G₁期细胞为(69.20±1.24)%,感染shSIRT1-2的细胞处于G₁期比例为(65.86±1.75)%。SIRT1沉默后肝癌细胞中衰老相关的 β -半乳糖苷酶染色显著增高,阳性细胞占40%~50%($P<0.05$),并伴随衰老相关基因p53和p21蛋白表达增加。**结论** SIRT1基因沉默可能通过p53/p21途径促进细胞衰老。

[关键词] 沉默信息调节因子1;肝细胞癌;肿瘤细胞系;细胞衰老

[中图分类号] R394.2; R73-354; R735.7 **[文献标志码]** A

Silent information regulator 1 gene induces aging of hepatocellular carcinoma cells via p53/p21 pathway

Song Chunli¹, Ren Jihua¹, Zhang Zhenzhen², Tao Ying¹, Chen Juan¹ (¹Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; ²Department of Infectious Diseases, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of lentivirus-mediated silent information regulator 1 gene (SIRT1) on aging of hepatocellular carcinoma cells (HCCs) and its mechanism. **Methods** SIRT1 expression was targeted by lentivirus-mediated shRNA interference technology. Effect of SIRT1 on aging of HCCs was detected by RT-PCR and Western blot analysis, respectively. Proliferation of HCCs was assayed by BrdU-labeling test. Cell cycle of HCCs was displayed by flow cytometry. Aging of HCCs was observed with SA- β -gal staining. Aging-related p53 and p21 proteins were demonstrated by Western blot analysis. **Results** Lentivirus-mediated shRNA significantly down-regulated the SIRT1 mRNA and protein expression levels in HCCs. SIRT1 suppressed the proliferation of HCCs with a suppression rate of 70% - 80%, and significantly induced cell cycle arrest at stage G₁. The proportion of shCont-, SIRT1- and SIRT2-infected HCCs at stage G₁ was about (42.29±0.36)%, (69.20±1.24)%, and (65.86±1.75)%, respectively. The aging-related β -galactosidase-stained HCCs were significantly greater with a positive rate of 40% - 50% ($P<0.05$), and the aging-related p53 and p21 protein expression levels were significantly higher. **Conclusion** SIRT1 promotes the aging of HCCs possibly through the p53/p21 pathway.

[Key words] silent information regulator 1; hepatocellular carcinoma; tumor cell line; cell aging

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81171628). Corresponding author: Chen Juan, E-mail: yixin_xinyuan@163.com

肝细胞癌是世界上常见的恶性肿瘤之一,位居全球恶性肿瘤发病率的第5位^[1],也是我国常见的恶性肿瘤,死亡率居我国恶性肿瘤的第2位^[2]。沉默信息调节因子1(silent information regulator1, SIRT1)是最近

发现的一类依赖烟碱腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)的第Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶^[3]。SIRT1在成熟组织中广泛表达,在胚胎早期和生殖细胞中含量丰富。SIRT1通过对组蛋白及多种非组蛋白进行去乙酰化修饰来调节基因表达,参与细胞衰老^[4]、凋亡^[5]、分化^[6]、应激耐受^[7]及能量代谢^[8]等多种重要的生理活动。近年来SIRT1与肿瘤的关系成为肿瘤学的研究热点,但其在

[基金项目] 国家自然科学基金(81171628)

[通信作者] 陈娟, E-mail: yixin_xinyuan@163.com

肝癌发生、发展过程中的作用报道还非常少。本研究检测 SIRT1 在肝癌细胞中的表达,并将表达靶向 SIRT1 的 shRNA 的慢病毒感染肝癌细胞,观察 SIRT1 基因沉默对细胞增殖及老化的影响,初步探讨其作为肝癌基因治疗靶点的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌 SK-Hep-1 和 HepG2 细胞系购自 ATCC (American Type Culture Collection),表达针对 SIRT1 的 shRNA (shSIRT1-1 和 shSIRT1-2) 的慢病毒质粒载体 pLK0.1-puro 来自 Sigma-Aldrich 公司。SIRT1 抗体、p53、p21、 β -actin 抗体 (A5316) 购自 Sigma-Aldrich 公司,BCA 试剂盒来自碧云天公司,辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的驴抗兔 IgG 抗体购自 GE healthcare 公司。BrdU 试剂盒购自罗氏公司。逆转录试剂盒和 SYBGreen 均购自 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG2 细胞系培养于含有 10% 胎牛血清、1% 青/链霉素的 MEM 培养基中,SK-Hep-1 细胞系培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,在含 5% CO₂、37 °C 孵箱中常规培养。

1.2.2 Western blot 检测 SIRT1、p53、p21 蛋白的表达 裂解细胞,提取各细胞总蛋白后 BCA 法测蛋白浓度。30 μ g 蛋白样品变性后经 8% SDS-PAGE 电泳,将蛋白转移至 NC 膜。5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育摇床过夜 (SIRT1 抗体 1:3 000 稀释,p53、p21 抗体 1:1 000 稀释),TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,二抗室温孵育 2 h (二抗为 HRP 标记的驴抗兔 IgG 1:3 000 稀释),用 TBST 洗膜后,ECL 后显影。以 β -actin 为内参。

1.2.3 慢病毒介导的 RNA 干扰技术 将表达 shRNA 的载体 pLK0.1-puro、pLP1、pLP2、pVSVG 共转染 HEK293FT 细胞,经过磷酸钙转染法包装成高滴度的表达 shSIRT1-1 和 shSIRT1-2 的慢病毒,同时以表达 scramble shRNA (shCont) 的慢病毒作为阴性对照,以未处理细胞作为空白对照。将病毒通过病毒浓缩液处理后,感染 SK-Hep-1、HepG2 细胞。感染前将细胞接种到 6 孔细胞板,每孔接种 1×10^5 个细胞,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,用含有 8 g/ml 聚凝胺和 10% FBS 的细胞培养液稀释病毒到相应滴度进行感染,感染后 72 h 裂解细胞进行 Western blot 检测。

1.2.4 Real-time PCR 相对定量法 用 Trizol 提取细胞的总 RNA,20 μ l 逆转录反应体系:RNA 1 μ g,Master mix 4 μ l,DEPC H₂O 补齐。混匀后按下列条件反应:25 °C 5 min,42 °C 30 min,85 °C 5 min,4 °C 5 min。取 1 μ l cDNA,加入 SYBGreen 10 μ l,Forward primer (10 μ mol/L) 各 0.4 μ l,H₂O 7.2 μ l。混匀后按下列条件反应:95 °C 15 s,60 °C 30 s,72 °C 15 s,共计 40 个循环。溶解曲线分析:按照仪器预设模式,绘制溶解曲线,结果显示为单一峰表示 PCR 反应特异性好。实验管均采用 3 管重复,重复 3 次,取其平均值。

1.2.5 BrdU 标记法检测细胞增殖 具体操作按照试剂盒说明书。将感染慢病毒的细胞 SK-Hep-1 按照 6 000/孔的细胞数接种于 96 孔板,培养 48 h 后加入 BrdU (终浓度为 30 μ g/L),37 °C 孵育 6 h。弃培养液,加入 FixDenat37 溶液室温孵育

30 min 固定细胞。加抗 BrdU-POD 工作浓度 (1:100) 结合 BrdU,阴性对照加 PBS 或血清,室温孵育 90 min。酶标仪读板,读数和新合成的 DNA 有关,即和细胞的增殖速率相关。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞周期 表达 shSIRT1-1、shSIRT1-2 和 shCont 的慢病毒分别感染 SK-Hep-1 细胞,72 h 后收集细胞。PBS 洗 2 次后,1 000 r/min 离心 3 min 收集细胞。加 70% 乙醇于 -20 °C 过夜固定细胞。取一定量的细胞悬液,加入 500 μ l 含 50 μ g/ml 溴化乙啶 (PI) 的 PBS,4 °C 孵育 30 min,洗涤后即可上机检测。

1.2.7 衰老因子相关的 β -半乳糖苷酶染色 将生长状态良好的细胞接种至 6 孔板,分别感染表达 shSIRT1-1、shSIRT1-2 和 shCont 的慢病毒。感染 6 d 后进行 β -半乳糖苷酶染色^[9],以 X-Gal 为底物,在衰老特异性的 β -半乳糖苷酶催化下在细胞中会生成蓝色产物。计数染色阳性细胞的数量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较用 *t* 检验,多样本均数间的显著性检验用方差分析。

2 结果

2.1 Real-time PCR 检测 shRNA 的干扰效果

将表达 shSIRT1-1、shSIRT1-2 和 shCont 的慢病毒分别感染 SK-Hep-1 和 HepG2 细胞,感染 72 h 后提取细胞总 RNA。Real-time PCR 结果显示在 shSIRT1-1 和 shSIRT1-2 成功抑制了 SIRT1 mRNA 的表达,在 SK-Hep-1 细胞抑制率分别达 85% 和 89%;在 HepG2 细胞中,抑制率分别达 79% 和 84% (图 1)。

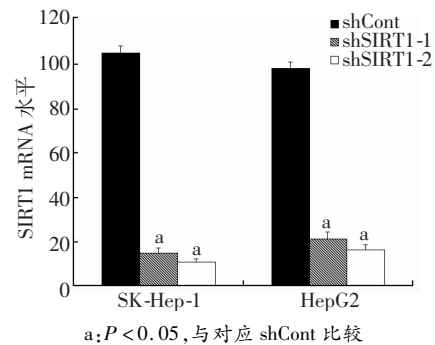
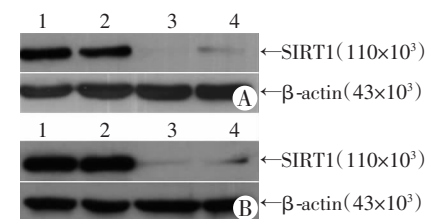


图 1 Real-time PCR 检测各组细胞中 SIRT1 的 mRNA 水平

2.2 Western blot 检测慢病毒介导的 RNA 干扰效果

在 SK-Hep-1 和 HepG2 2 个细胞中,表达 shSIRT1-1 和 shSIRT1-2 的慢病毒均显著抑制了 SIRT1 蛋白表达 (图 2)。结果显示慢病毒介导的 shRNA 成功地沉默了肝癌细胞中 SIRT1 的表达。



1: 空白对照;2: shCont;3: shSIRT1-1;4: shSIRT1-2
A: SK-Hep-1;B: HepG2

图 2 Western blot 检测感染表达 shRNA 慢病毒 72 h 后各组细胞中 SIRT1 的蛋白水平

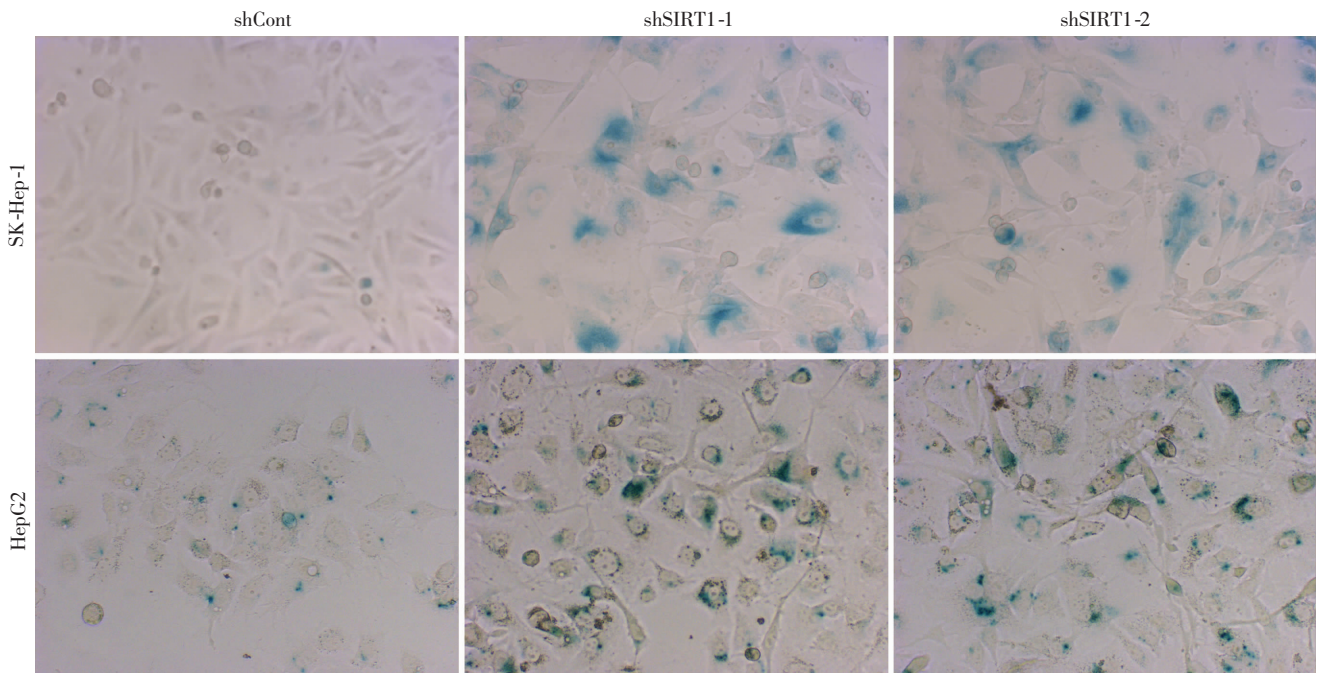


图3 感染慢病毒6 d后β-半乳糖苷酶染色观察各组细胞变化 (×200)

2.3 SIRT1 基因沉默对肝癌细胞增殖的抑制效应

与感染表达 shCont 的慢病毒的 SK-Hep-1 细胞(100%)相比, BrdU 标记实验结果显示感染 shSIRT1-1 和 shSIRT1-2 的细胞 DNA 合成明显受到抑制 [shSIRT1-1: (20 ± 0.62)%, shSIRT1-2: (31 ± 1.74)%], 抑制率分别为 80% 和 69% (P < 0.05), 提示 SIRT1 表达沉默的细胞增殖率显著降低。

2.4 SIRT1 基因沉默对细胞周期的影响

流式细胞仪分析结果显示, 感染 shSIRT1-1、shSIRT1-2 的细胞 G₁ 期细胞比例与处于 G₁ 期的感染 ShCont 细胞比较, 差异具有统计学意义 (P < 0.05), 见表 1。提示 SIRT1 基因沉默诱导了 G₁ 期细胞周期阻滞。

表 1 流式细胞术检测感染慢病毒 72 h 后 SK-Hep-1 细胞周期 (% , $\bar{x} \pm s$)

慢病毒	G ₁	S	G ₂
shCont	44.29 ± 0.36	35.07 ± 1.58	20.64 ± 1.58
shSIRT1-1	69.20 ± 1.24 ^a	13.40 ± 3.25 ^a	17.40 ± 2.90
shSIRT1-2	65.86 ± 1.75 ^a	14.57 ± 0.72 ^a	19.57 ± 1.90

a: P < 0.05, 与对照 shCont 比较

2.5 SIRT1 基因沉默诱导肝癌细胞衰老

SIRT1 基因沉默后的肝癌细胞核及整个细胞都膨大, 并且 β-半乳糖苷酶染色较对照细胞明显增加 (图 3); 随机选择 3 个视野对 200 个细胞进行观察并定量分析显示: 在 SK-Hep-1 细胞中, 感染 shSIRT1-1 或 shSIRT1-2 的慢病毒的细胞的染色阳性细胞数比对照细胞多近 6 倍; 在 HepG2 细胞中, 感染 shSIRT1-1 或 shSIRT1-2 的慢病毒的细胞的染色阳性细胞数比对照细胞多了 3 倍多 (P < 0.05, 表 2)。提示 SIRT1 沉默后诱导肝癌细胞老化。

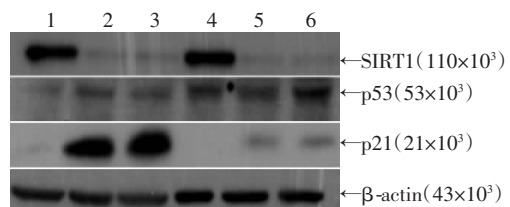
表 2 各组 β-半乳糖苷酶染色阳性的细胞占总细胞数的百分比 (% , $\bar{x} \pm s$)

慢病毒	SK-Hep-1	HepG2
shCont	8.00 ± 0.78	12.00 ± 0.82
shSIRT1-1	45.00 ± 2.51 ^a	43.00 ± 2.52 ^a
shSIRT1-2	50.00 ± 2.52 ^a	38.00 ± 3.00 ^a

a: P < 0.05, 与对应 shCont 比较

2.6 SIRT1 沉默抑制衰老相关蛋白 p53 和 p21 的表达

p53 蛋白水平或活性的增加是重要的细胞衰老诱导因素, p53 可以通过诱导 p21 的表达, 引起细胞周期阻滞, 从而在细胞衰老中起关键作用。Western blot 结果显示在 SK-Hep-1 和 HepG2 细胞中, SIRT1 基因沉默均明显诱导了 p53 蛋白及 p21 蛋白的表达 (图 4)。提示 SIRT1 沉默可能通过调控 p53/p21 途径诱导了细胞衰老。



1~3: SK-Hep-1 细胞 shCont、shSIRT1-1、shSIRT1-2; 4~6: HepG2 细胞 shCont、shSIRT1-1、shSIRT1-2

图 4 Western blot 分析感染表达 shRNA 慢病毒 72 h 后的各组细胞中 p53 和 p21 的蛋白水平

3 讨论

SIRT1 在多种肿瘤的发生、发展过程中发挥着重要作用。SIRT1 基因在多种肿瘤组织及细胞系中表达

水平都明显上调,并参与了肿瘤细胞增殖、凋亡、老化等多个过程。SIRT1在多种人类的肿瘤组织中表达明显增高,其中包括急性髓细胞白血病^[10]、前列腺癌^[11]、皮肤癌^[12]以及大肠癌^[13]等。不仅如此,在多种肿瘤细胞系尤其在对化疗耐药的肿瘤细胞中SIRT1表达也增高。Ford等^[14]报道SIRT1过表达可以促进上皮癌细胞的生长及存活。研究发现SIRT1通过调节p53^[15]、E2F1^[16]、Bax^[17]等活性抑制肿瘤细胞凋亡;同时,SIRT1表达水平或活性的抑制均诱导了乳腺癌细胞、肺癌细胞等多种细胞的衰老^[18]。目前SIRT1在肝癌中的研究报道还非常少,并且对于SIRT1在肝癌形成中的作用尚存争议。Choi等^[19]发现SIRT1在肝癌组织中表达水平明显增高,SIRT1的基因沉默可以诱导肝癌细胞周期阻滞;而Wang等^[20]报道SIRT1 mRNA水平在肝癌组织中比癌旁组织低。本研究中通过Western blot检测到SIRT1在肝癌细胞中的高表达水平,SIRT1基因沉默后显著抑制了肝癌细胞的增殖,并且SIRT1基因沉默后的肝癌细胞出现了明显的老化现象,说明SIRT1沉默可能部分通过诱导细胞老化,使细胞处于生长停滞状态,从而抑制了肝癌细胞的体外增殖能力。我们进一步发现SIRT1沉默可以增加p53蛋白水平并同时诱导了p21的表达,提示SIRT1沉默可能通过p53/p21途径诱导细胞老化,而SIRT1调控p53表达的机制值得我们深入研究。

肿瘤的发生是一个多基因、多步骤的过程,其中恶性增殖能力的获得是肿瘤细胞由良性转为恶性的关键环节。肿瘤细胞衰老是一种安全机制,它通过抑制细胞增殖而预防肿瘤发生,因此筛选衰老诱导因子或抑制因子在肿瘤的研究中具有重要意义,并可为恶性肿瘤的基因治疗提供新的靶点。本研究提示SIRT1基因沉默后可能通过诱导肝癌细胞老化,从而有效地抑制肝癌细胞的体外增殖。本课题组下一步将构建肝癌裸鼠模型,进一步在体内研究SIRT1基因与肝癌细胞增殖的关系,以期在肝癌的基因治疗探索新的分子生物学靶点。

参考文献:

[1] Brau N, Fox R K, 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 M F, Hou J L, Chutaputti A, *et al.* Hepatocellular carcinoma in the Asia Pacific region[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(3): 346 - 353.
[3] Imai S, Armstrong C M, Kaeberlein M, *et al.* Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase [J]. *Nature*, 2000, 403(6771): 795 - 800.
[4] Ota H, Akishita M, Eto M, *et al.* Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*,

2007, 43(5): 571 - 579.
[5] Dixit D, Sharma V, Ghosh S, *et al.* Inhibition of Casein kinase-2 induces p53-dependent cell cycle arrest and sensitizes glioblastoma cells to tumor necrosis factor (TNF α)-induced apoptosis through SIRT1 inhibition[J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3: e271.
[6] Kuroda S, Yamazaki M, Abe M, *et al.* Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like (BATF) regulates epigenetically and energetically effector CD8 T-cell differentiation *via* Sirt1 expression[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(36): 14885 - 14889.
[7] Chong Z Z, Shang Y C, Wang S, *et al.* SIRT1: new avenues of discovery for disorders of oxidative stress[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(2): 167 - 178.
[8] Rodgers J T, Lerin C, Cerhart-Hines Z, *et al.* Metabolic adaptations through the PGC-1 α and SIRT1 pathways[J]. *FEBS Lett*, 2008, 582(1): 46 - 53.
[9] Dimri G P, Lee X, Basile G, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(20): 9363 - 9367.
[10] Bradbury C A, Khanim F L, Hayden R, *et al.* Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors[J]. *Leukemia*, 2005, 19(10): 1751 - 1759.
[11] Huffman D M, Grizzle W E, Bamman M M, *et al.* SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(14): 6612 - 6618.
[12] Hida Y, Kubo Y, Murao K, *et al.* Strong expression of a longevity-related protein, SIRT1, in Bowen's disease[J]. *Arch Dermatol Res*, 2007, 299(2): 103 - 106.
[13] Stunkel W, Peh B K, Tan Y C, *et al.* Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer [J]. *Biotechnol J*, 2007, 2(11): 1360 - 1368.
[14] Ford J, Jiang M, Milner J. Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(22): 10457 - 10463.
[15] Fang H, Tong W, Perkins R, *et al.* Bioinformatics approaches for cross-species liver cancer analysis based on microarray gene expression profiling [J]. *BMC Bioinformatics*, 2005, 6(Suppl 2): S6.
[16] Wang C, Chen L, Hou X, *et al.* Interactions between E2F1 and Sirt1 regulate apoptotic response to DNA damage [J]. *Nature Cell Biol*, 2006, 8(9): 1025 - 1031.
[17] Cohen H Y, Lavu S, Bitterman K J, *et al.* Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2004, 13(5): 627 - 638.
[18] Ota H, Tokunaga E, Chang K, *et al.* Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells [J]. *Oncogene*, 2006, 25(2): 176 - 185.
[19] Choi H N, Bae J S, Jamiyandorj U, *et al.* Expression and role of SIRT1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(2): 503 - 510.
[20] Wang R H, Sengupta K, Li C, *et al.* Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice [J]. *Cancer Cell*, 2008, 14(4): 312 - 323.

(收稿:2012-03-10;修回:2012-05-11)

(编辑 汪勤俭)