论著

文章编号:1000-5404(2013)24-2634-05

SIRT2 沉默对肝癌细胞的迁移和侵袭能力的影响

宋春丽,任吉华,冉龙宽,李宛蔚,陈 娟 (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)

[摘要] **目的** 探讨慢病毒介导的沉默信息调节因子2(silent information regulator2,SIRT2)基因沉默对肝癌细胞的迁移和侵袭能力的影响。**方法** Western blot分析SIRT2在多个肝癌细胞系和永生化肝细胞中的表达,通过慢病毒介导的shRNA干扰技术靶向沉默SIRT2的表达,并通过Real-time PCR和Western blot验证SIRT2基因的沉默效果。细胞迁移及侵袭实验检测SIRT2基因沉默对肝癌细胞迁移和侵袭能力的影响,Western blot检测上皮细胞间充质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)指标蛋白(E-cadherin、α-catenin、α-SMA、N-cadherin)的表达。**结果** SIRT2在多个肝癌细胞系中蛋白表达水平明显上调;慢病毒介导的shRNA能显著抑制细胞SIRT2的表达水平($P<0.05$)。SIRT2基因沉默能抑制肝癌细胞的迁移和侵袭能力($P<0.01$),并使上皮属性蛋白E-cadherin、α-catenin表达水平升高,使间质属性蛋白α-SMA、N-cadherin表达水平降低。**结论** SIRT2基因沉默可以通过抑制肝癌细胞上皮细胞间充质转化从而抑制肝癌细胞的迁移和侵袭能力。

[关键词] SIRT2;肝癌;迁移;侵袭

[中图法分类号] R394-33;R73-37;R735.7 [文献标志码] A

Effect of SIRT2 knock-down on migration and invasion in hepatocellular carcinoma cells

Song Chunli, Ren Jihua, Ran Longkuan, Li Wanwei, Chen Juan (Key Laboratory of Molecular Biology on Infection Diseases of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of lentivirus-mediated silent information regulator 2 (SIRT2) knock-down on the migration and invasion in hepatocellular carcinoma cells (HCCs). **Methods** The expression of SIRT2 in HCC cell lines and L02 cells (immortalized human liver cells) was analyzed by real-time PCR and Western blotting. SIRT2 expression was attenuated by lentivirus-mediated shRNA interference technology, and SIRT2 protein level was measured by Western blotting. Effect of SIRT2 on migration and invasion of HCCs was detected by migration and invasion assay. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) proteins were tested by Western blotting. **Results** SIRT2 was overexpressed in the HCC cell lines. Lentivirus-mediated shRNA interference significantly down-regulated the SIRT2 expression levels in HCCs ($P<0.05$). Knock-down of SIRT2 suppressed the migration and invasion of HCCs ($P<0.01$) and induced upregulation of epithelial markers (E-cadherin and α-catenin) as well as downregulation of mesenchymal markers (α-SMA and N-cadherin). **Conclusion** Knock-down of SIRT2 inhibits the migration and invasion in HCCs possibly through EMT.

[**Key words**] SIRT2; hepatocellular carcinoma; migration; invasion

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81201282), the Specialized Research Fund for Higher Educational Doctoral Program (20125503120004) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA10047). Corresponding author:Chen Juan,E-mail:yixin_xinyuan@163.com

[基金项目] 国家自然科学基金(81201282);2012年度高等学校博士点专项科研基金(20125503120004);重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10047)

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

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131012.1813.008.html(2013-10-12)

肝细胞癌是世界上第五大常见恶性肿瘤之一,在我国占恶性肿瘤死亡率的第2位[1]。一般发现时已处于中晚期,中期生存率为6个月[2]。即使是最有效的抗肿瘤药物如阿霉素[3]、索拉非尼[4]也只能有限地延长患者的寿命,导致低存活率的主要因素就是肿瘤发生转移。因此针对肿瘤侵袭转移的相关基因研究成为肿瘤研究的热点之一。

沉默信息调节因子2(silent information regulator2,SIRT2)是最近发现的一类依赖烟碱胺腺嘌呤二核苷酸(NAD+)的第Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶[5],主要定位于细胞质,最近报道的主要功能有参与细胞周期[6]、维持基因组的稳定性[7]、肿瘤发生[8]等。近年来SIRT2在肝癌中的研究越来越受到人们的重视。我们前期研究发现SIRT2可以促进肝癌细胞的增殖,本研究主要是进一步研究SIRT2对肝癌细胞迁移和侵袭能力的影响。

本研究检测SIRT2在肝癌细胞中的表达,并将表达靶向SIRT2的shRNA的慢病毒感染肝癌细胞,观察SIRT2基因沉默对肝癌细胞迁移和侵袭能力的影响,并检测EMT指标蛋白的变化,并初步探讨它影响肝癌可能的分子机制,从而为肝癌的基因治疗以及抑制肝癌的发展、转移寻找一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

SK-Hep-1、Huh-7、PLC-5、Hep3B、HepG2、L02和HEK-293FT细胞系购自ATCC(American Type Culture Collection),表达针对SIRT2的shRNA(shSIRT2-1和shSIRT2-2)的慢病毒质粒载体pLK0.1-puro来自Sigma-Aldrich公司。SIRT2(sc-20966)抗体、N-cadherin(sc-59987)购自Santa Cruz公司,E-cadherin(#3195)、α-catenin(#3236)购自Cell Signaling Technology公司,α-SMA(A5228)、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。Transwell小室(353097)、Invasion小室(354480)购自BD公司。逆转录试剂盒(170-8840)购自Bio-Rad公司,FastStart DNA Master SYBR Green Ⅰ(03003230001)购自Roche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、Huh-7、PLC-5、Hep3B、L02和HEK-293FT细胞系培养于含有10%胎牛血清的DMEM培养基中,在含5% CO_2、37 ℃孵箱中常规培养。

1.2.2 Western blot检测SIRT2、E-cadherin、α-catenin、α-SMA、N-cadherin蛋白的表达 收集细胞,用PBS洗涤1次后,加入相应体积RIPA裂解缓冲液,冰上摇床摇15 min后收集裂解液离心,去除细胞碎片,然后用BCA法测定蛋白浓度。30 μg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 ℃孵育摇床过夜(α-SMA抗体1∶300稀释,SIRT2、E-cadherin、α-catenin、N-cadherin抗体1∶1 000稀释,β-actin抗体1∶2 000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3次后,ECL后显影。以β-actin为内参。

1.2.3 慢病毒介导的RNA干扰技术 将靶向SIRT2的序列分子克隆到载体pLK0.1-puro,其中shSIRT2-1和SIRT2-2的序列分别为5′-GCCAACCATCTGTCACTACTT-3′和5′-GCTAAGCTGGATGAAAGAGAA-3′。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shSIRT2-1和shSIRT2-2的慢病毒,同时以表达scramble shRNA(shCont)的慢病毒作为阴性对照。首先在6孔板里接种SK-Hep-1、Huh-7细胞,每孔接种1×10^5细胞,置于37 ℃、5% CO_2培养箱培养24 h后,用含有8 g/mL聚凝胺和含10% FBS的细胞培养液稀释已浓缩25倍的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 提取细胞的总RNA,20 μL逆转录反应体系:RNA 1 μg、Master mix 4 μL、酶1 μL、去RNase水。混匀后按下列条件反应:25 ℃ 5 min,42 ℃ 30 min,85 ℃ 5 min,4 ℃ 5 min。取1 μL cDNA,SYBGreen 5 μL,Forward primer(10 μmol/L)各0.2 μL,去RNase水3.6 μL。混匀后按下列条件反应:94 ℃ 20 s,60℃ 20 s,72 ℃ 15 s,共计35个循环。每个实验样本均采用3管重复,重复3次,取其平均值。

1.2.5 细胞迁移实验检测肿瘤迁移能力 慢病毒介导的shRNA感染的SK-Hep-1细胞和Huh-7细胞与对照组培养24 h后,胰酶消化,Transwell上室(无Matrigel包被上室聚碳酸酯滤膜,滤膜孔径为8 μm)每孔加入无血清DMEM培养基350 μL含细胞数5×10^4/孔,下室加含10%胎牛血清的DMEM培养基900 μL,37 ℃孵育8 h。用棉签轻拭上室滤膜未迁移细胞,固定细胞后0.1%结晶紫染色40 min,倒置显微镜计数并拍照。每张滤膜低倍镜下随机选取10个不同的视野计数,取其平均值,重复实验3次。

1.2.6 细胞侵袭实验检测肿瘤侵袭能力 Invasion上室(Matrigel包被上室聚碳酸酯滤膜,滤膜孔径为8 μm)每孔加入无血清DMEM培养基500 μL含SK-Hep-1细胞数和Huh-7细胞2×10^4/孔,下室加含10%胎牛血清的DMEM培养基700 μL,37 ℃孵育10 h。用棉签轻拭上室滤膜未侵袭细胞,其余同细胞迁移实验。

1.3 统计学处理

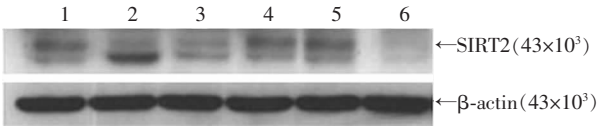
采用SPSS 17.0软件进行统计,两样本均数比较用t检验。

2 结果

2.1 SIRT2在HCC细胞系中的表达

首先在多个HCC细胞系(Huh-7、HepG2、PLC-5、Hep3B、

SK-Hep-1)和永生化的肝细胞系 L02 中检测了 SIRT2 的表达，以 β-actin 作为内参。Western blot 检测结果显示 SIRT2 在 HCC 细胞系中的蛋白表达水平较永生化的肝细胞系 L02 明显升高(图 1)。

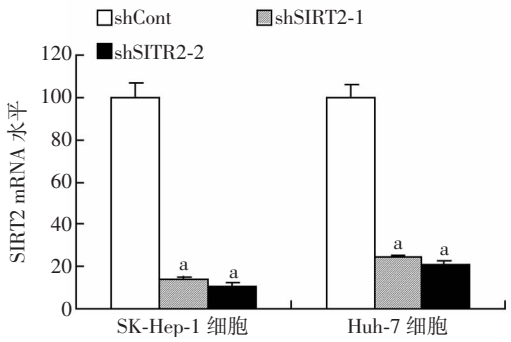


1：Huh-7；2：HepG2；3：PLC-5；4：Hep3B；5：SK-Hep-1；6：L02

图 1 Western blot 检测 SIRT2 在多个肝癌细胞系和肝细胞系中蛋白表达

2.2 Real-time PCR 检测 shRNA 的干扰效果

将表达 shCont、shSIRT2-1 和 shSIRT2-2 的慢病毒分别感染 SK-Hep-1 和 Huh-7 细胞，成功抑制了 SIRT2 mRNA 的表达，在 SK-Hep-1 细胞抑制率分别达 86% 和 89.7%；在 Huh-7 细胞中，抑制率分别达 75.7% 和 80%。SIRT2 的 shRNA 成功地沉默了肝癌细胞中 SIRT2 的 mRNA 表达($P<0.05$，图 2)。

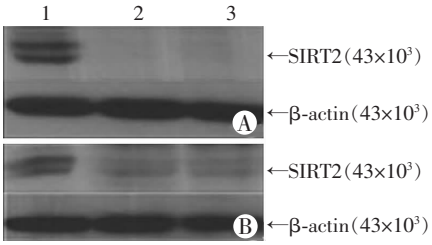


a：$P<0.05$，与 shCont 比较

图 2 Real-time PCR 检测各细胞中 SIRT2 mRNA 的表达

2.3 检测慢病毒介导的 shRNA 对 SIRT2 表达的抑制效应

为了验证 2 个靶向 SIRT2 的 shRNA 的抑制效应，我们将表达 shSIRT2-1、shSIRT2-2 和 shCont 的慢病毒分别感染肝癌细胞 SK-Hep-1、Huh-7，感染 72 h 后，Western blot 检测细胞 SIRT2 的表达。结果显示同 shCont 相比，慢病毒介导的靶向 SIRT2 的 shRNA 成功地沉默了肝癌细胞中 SIRT2 的蛋白表达(图 3)。



1：shCont；2：shSIRT2-1；3：shSIRT2-2；A：SK-Hep-1；B：Huh-7

图 3 Western blot 检测感染表达 shRNA 慢病毒 72 h 后各细胞中 SIRT2 的蛋白水平

2.4 SIRT2 沉默抑制肝癌细胞迁移的能力

细胞迁移实验结果显示接种上室 8 h 后，在肝癌细胞 SK-Hep-1、Huh-7 中表达 shSIRT2-1、shSIRT2-2 和 shCont 的慢病毒发现表达 shSIRT2-1、shSIRT2-2 的穿膜细胞数明显减少，是 shCont 穿膜细胞数的 25%，具有统计学差异($P<0.01$)。说明 SIRT2 沉默明显抑制肝癌细胞迁移的能力(图 4)。

2.5 SIRT2 基因沉默抑制肝癌细胞侵袭的能力

细胞侵袭实验结果显示，接种上室 10 h 后，在肝癌细胞 SK-Hep-1、Huh-7 中表达 shSIRT2-1、shSIRT2-2 和 shCont 的慢病

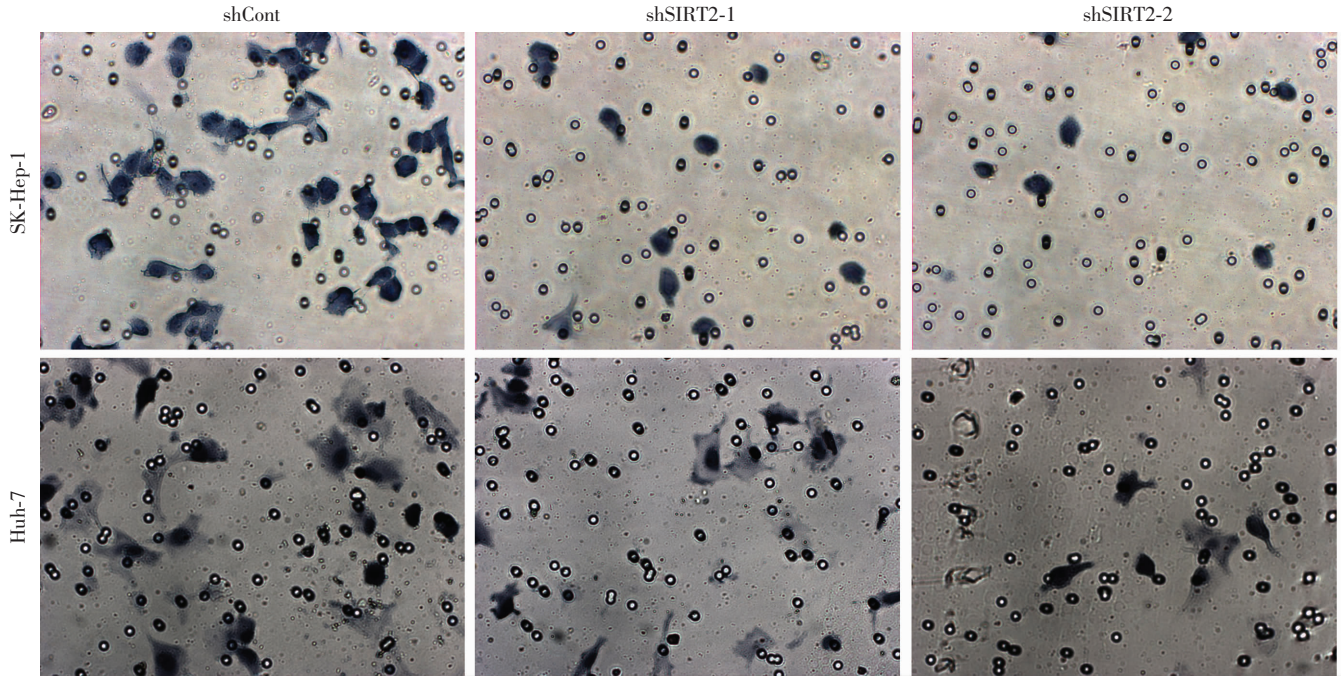


图 4 细胞迁移实验检测感染表达 shRNA 慢病毒后细胞迁移能力的变化 (结晶紫 ×200)

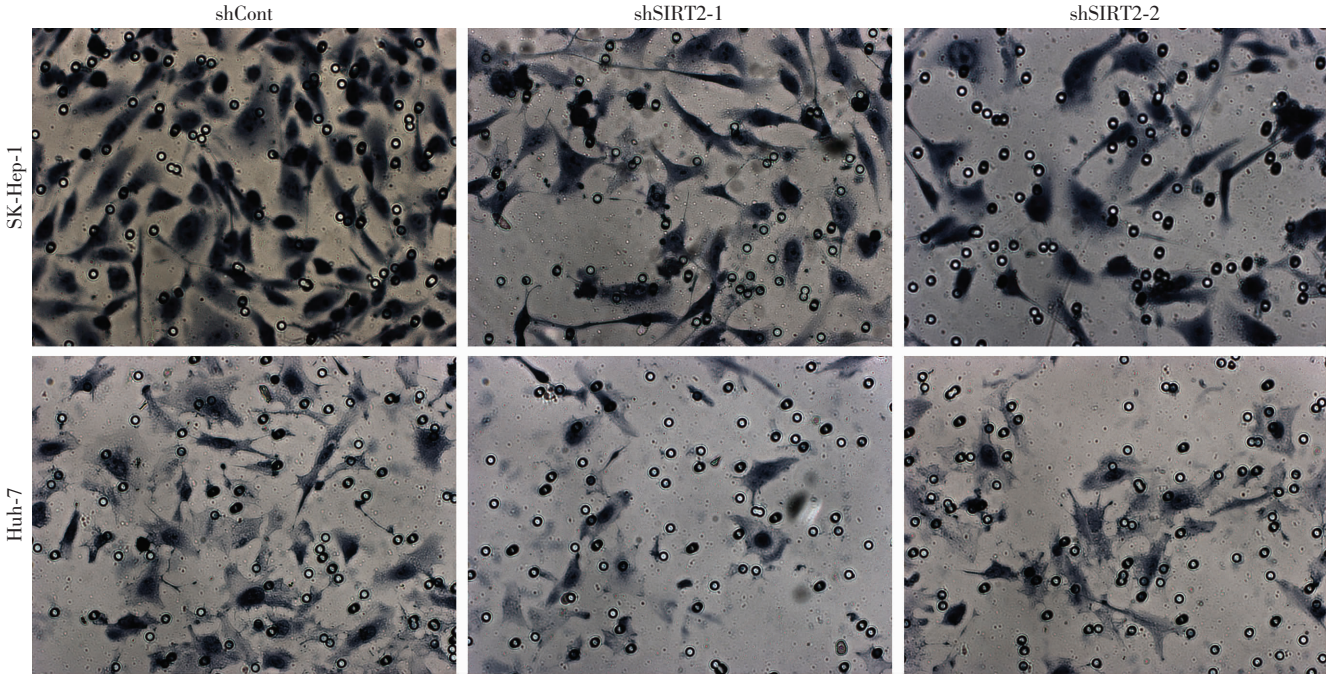
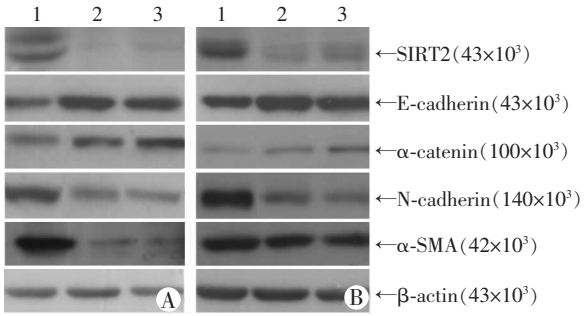


图 5　细胞侵袭实验检测感染表达 shRNA 慢病毒后细胞侵袭能力的变化　（结晶紫 ×200）

毒发现表达 shSIRT2-1、shSIRT2-2 的穿膜细胞数明显减少，是 shCont 穿膜细胞数的 50%，具有统计学差异（$P<0.01$）。说明 SIRT2 沉默明显抑制肝癌细胞侵袭的能力（图 5）。

2.6　SIRT2 基因沉默对 EMT 指标蛋白的影响

为了进一步检测 SIRT2 基因沉默是否引起肝癌细胞进行上皮细胞-间充质转化，我们将表达 shSIRT2-1、shSIRT2-2 和 shCont 的慢病毒分别感染肝癌细胞 SK-Hep-1、Huh-7，感染 72 h 后，Western blot 检测细胞 EMT 指标蛋白的表达。Western blot 结果显示在 SK-Hep-1、Huh-7 细胞中，SIRT2 基因沉默使上皮属性蛋白 E-cadherin、α-catenin 表达水平明显升高，间质属性蛋白 α-SMA、N-cadherin 表达水平明显降低（图 6），提示 SIRT2 基因沉默可能抑制肝癌细胞进行上皮细胞间充质转化。



1：shCont；2：shSIRT2-1；3：shSIRT2-2；A：SK-Hep-1；B：Huh-7

图 6　Western blot 检测感染表达 shRNA 慢病毒 72 h 后 SK-Hep-1 细胞中 EMT 指标蛋白的水平变化

3　讨论

Sirtuin 家族在人体中发挥着各种重要的生物学作用，比如调节基因表达、参与细胞应激反应、DNA 损伤、新陈代谢等[9]。尽管近年来 Sirtuin 家族的功能研究日益引起人们的关注，但它们的去乙酰化作用是如何参与到肿瘤的发生发展中的机制还不清楚[10]。其中 SIRT1 在肿瘤中的研究较为深入，在肿瘤中起双重调节作用。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[11]、前列腺癌[12]、皮肤癌[13] 以及大肠癌[14] 等。而在人类乳腺癌中 SIRT1 表达水平却是降低的[15]。近年来，SIRT2 在肿瘤中的作用也日益增加，Kim 等[16] 认为 SIRT2 缺失增加了基因组的不稳定性，SIRT2 缺失的老鼠更容易发生肿瘤。同时，他们还发现在乳腺癌和肝癌中，SIRT2 的 mRNA 水平是降低的[16]，可惜他们没有检测 SIRT2 在肝癌中的蛋白表达水平。而我们的研究检测到 SIRT2 在肝癌中的蛋白表达水平均升高。因此 SIRT2 可能跟 SIRT1 一样，在肿瘤中起双重调节作用。

上皮细胞-间充质转化，是指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程，是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程。其主要的特征为上皮属性蛋白 E-cadherin、α-catenin 表达少，间质属性蛋白 α-SMA、N-cadherin 表达多等[17]。

本研究中通过 Western blot 检测到 SIRT2 在肝癌细胞中的高表达水平，SIRT2 基因沉默后显著抑制了肝癌细胞的迁移和侵袭能力，并使上皮属性蛋白

E-cadherin、α-catenin 表达水平升高,使间质属性蛋白 α-SMA、N-cadherin 表达水平降低,说明 SIRT2 基因沉默可以通过抑制肝癌细胞进行上皮细胞间充质转化从而抑制了肿瘤的迁移和转移能力。而 SIRT2 沉默抑制 EMT 的机制值得我们深入研究。

迁移和侵袭是恶性肿瘤的重要特征,而 EMT 是肿瘤转化瀑布中极为重要的一步。通过 EMT 失去了细胞极性、失去与基底膜的连接等上皮表型从而获得了较高的迁移与侵袭等间质表型[18],因此,阐明 SIRT2 调控肝癌细胞发生 EMT 过程的分子机制对于探索基于 EMT 关键分子的诊断方法及 EMT 关键分子的治疗手段是至关重要的。β-catenin 的功能主要是介导细胞间的黏附,跟 EMT 密切相关。有研究报道减少 E-cadherin的表达和 WNT 信号通路的活化可以导致 β-catenin 表达增加从而加速了 EMT 的进程[19]。β-catenin作为一种多功能的蛋白质,还参与了细胞的增殖、分化和凋亡等,那么 SIRT2 沉默是否通过 β-catenin信号通路调节 EMT 从而发挥着重要的作用呢? 本课题组将进一步深入研究 SIRT2 基因沉默与肝癌细胞 EMT 的机制,从而为肝癌的基因治疗探索新的分子生物学靶点。

参考文献:

[1] El-Serag H B, Rudolph K L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. Gastroenterology, 2007, 132(7): 2557 – 2576.

[2] Forner A, Hessheimer A J, Isabel-Real M, *et al*. Treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2006, 60(2): 89 – 98.

[3] Yeo W, Mok T S, Zee B, *et al*. A randomized phase Ⅲ study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(20): 1532 – 1538.

[4] Llovet J M, Ricci S, Mazzaferro V, *et al*. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 2008, 359(4): 378 – 390.

[5] 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.

[6] 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]. Mol Cell Biol, 2003, 23(9): 3173 – 3185.

[7] Yuan J, Pu M, Zhang Z, *et al*. Histone H3-K56 acetylation is important for genomic stability in mammals[J]. Cell Cycle, 2009, 8(11): 1747 – 1753.

[8] Hiratsuka M, Inoue T, Toda T, *et al*. Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 309(3): 558 – 566.

[9] Chen J, Zhang B, Wong N, *et al*. Sirtuin 1 is upregulated in a subset of hepatocellular carcinomas where it is essential for telomere maintenance and tumor cell growth[J]. Cancer Res, 2011, 71(12): 4138 – 4149.

[10] Carafa V, Nebbioso A, Altucci L. Sirtuins and disease: the road ahead[J]. Front Pharmacol, 2012, 3: 4.

[11] 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.

[12] 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.

[13] 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.

[14] 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.

[15] 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.

[16] Kim H S, Vassilopoulos A, Wang R H, *et al*. SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity[J]. Cancer Cell, 2011, 20(4): 487 – 499.

[17] Thiery J P, Acloque H, Huang R Y, *et al*. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871 – 890.

[18] Acloque H, Adams M S, Fishwick K, *et al*. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease[J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1438 – 1449.

[19] Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers, and strategies to overcome drug resistance in the clinic[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1796(2): 75 – 90.

(收稿:2013-06-23;修回:2013-07-22)

(编辑 邓强庭)