DOI:10.16016/j.2097-0927.202306039

沉默调节蛋白3通过mTOR信号途径调节溶酶体功能抑制U87细胞凋亡

张旭东[1,2],单李天一[1],王 蓉[1],刘树义[1],兰 凯[1],陈 敏[1],廉 婷[3],李 凯[1,4],Rajiv Kumar Jha[1,2] 710021 西安,西安医学院临床医学院:中尼友好拉吉姆医学实验室[1],西安市肿瘤早诊创新转化重点实验室[2],陕西省呼吸病预防与诊治工程研究中心[3];710077 西安,西安医学院第一附属医院神经内科[4]

[**摘要**] **目的** 探讨沉默调节蛋白3(sirtuin 3,Sirt3)在胶质瘤细胞U87中的作用,为胶质瘤的早期诊治提供新靶点。**方法** 基于中国脑胶质瘤数据库(CGGA)、GEPIA2数据库,通过生物信息学分析Sirt3在胶质瘤不同分级的表达情况,通过Western blot检测6位胶质瘤患者癌旁与肿瘤组织中Sirt3的蛋白水平。利用shRNA慢病毒、CRISPR/Cas9系统干预U87细胞Sirt3的表达,采用TUNEL染色、PI-Annexin V双荧光标记检测细胞凋亡情况,Western blot检测凋亡相关蛋白Bax、Cleaved-caspase3及LAMP1、LAMP2、LAMP2A、TFEB、mTOR等蛋白的表达。利用mTOR小分子抑制剂Rapamycin处理Sirt3敲减U87细胞,检测相关蛋白及细胞凋亡的变化。对Sirt3敲除前后的U87细胞进行核质分离实验,并检测p-TFEB蛋白表达的变化。在敲减及敲除Sirt3的U87细胞中分别过表达TFEB及Sirt3后,检测溶酶体膜蛋白表达的变化情况。**结果** Sirt3在高级别胶质瘤中高表达,且与患者的低生存率密切相关。敲减Sirt3表达后细胞凋亡增加($P<0.01$),溶酶体膜蛋白LAMP1、LAMP2、LAMP2A显著下调($P<0.01$),p-mTOR显著增加($P<0.01$),通过核质分离实验发现敲除Sirt3后p-TFEB在胞质中增加($P<0.01$)。在Sirt3敲除组过表达Sirt3后,LAMP1、LAMP2蛋白水平恢复,且溶酶体数量显著增加($P<0.01$);在Sirt3敲减组过表达TFEB后,LAMPs蛋白表达明显上调($P<0.01$)。**结论** Sirt3可能通过调控mTOR信号通路影响TFEB的核质分布,上调溶酶体膜蛋白LAMPs表达增强胶质瘤细胞溶酶体功能,进而促进胶质瘤细胞存活和恶性增殖,提示Sirt3可能是胶质瘤临床诊断和进展的分子标志物。

[**关键词**] 沉默调节蛋白Sirt3;胶质瘤;凋亡;溶酶体;雷帕霉素靶蛋白;转录因子EB
[**中图法分类号**] R394.3;R730.23;R739.41 [**文献标志码**] A

Silent information regulator 3 modulates lysosome function to inhibit apoptosis of U87 cell by mTOR pathway

ZHANG Xudong[1,2], SHAN Litianyi[1], WANG Rong[1], LIU Shuyi[1], LAN Kai[1], CHEN Min[1], LIAN Ting[3], LI Kai[1,4], Rajiv Kumar JHA[1,2] [1]China-Nepal Friendship Medical Research Center of Rajiv Kumar Jha, [2]Xi'an Key Laboratory of Innovative and Translational Cancer Early Diagnosis, [3]Research Center for Prevention and Treatment of Respiratory Disease, School of Clinical Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710021; [4]Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710077, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of silent information regulator 3 (Sirt3) in glioma U87 cells, and provide new targets for early diagnosis and treatment of glioma. **Methods** Based on the China Brain Glioma Database (CGGA) and GEPIA2 database, the expression of Sirt3 in different grades of glioma was analyzed by bioinformatics, and the protein level of Sirt3 in the adjacent and tumor samples of 6 glioma patients was further detected by Western blotting. Then, shRNA lentivirus and CRISPR/Cas9 system were used to interfere with the expression of Sirt3 in U87 cells, and TUNEL staining, PI-Annexin V double

[**基金项目**] 陕西省高校青年人才托举计划项目(20200314);陕西省科技厅面上项目(2021JM-495);陕西省教育厅专项科研计划项目(21JK0890);大学生创新创业训练计划(S202111840075)

[**通信作者**] Rajiv Kumar Jha,E-mail:rajivxjtu@gmail.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

fluorescent labeling and Western blotting were used to detect the expression of apoptosis-related proteins(Bax, Cleaved-caspase3) and lysosome membrane proteins (LAMP1, LAMP2, LAMP2A), TFEB, mTOR, and other proteins. Then mTOR small molecule inhibitor, rapamycin was employed to treat Sirt3 knockdown cells, the changes in related proteins and cell apoptosis were detected. In addition, nuclear and cytoplasmic separation experiments were carried out on U87 cells before and after Sirt3 knockout, and protein change of p-TFEB was detected. Finally, the change of lysosome membrane protein after overexpression of TFEB and Sirt3 was detected in U87 cells with knocking down and out of Sirt3. **Results** Sirt3 was significantly highly expressed in glioma tissue, and the level was closely associated with poor survival of the glioma patients. Sirt3 knockdown significantly enhanced cell apoptosis ($P<0.01$), down-regulated the expression of LAMP1, LAMP2 and LAMP2A ($P<0.01$), and improved the expression of p-mTOR ($P<0.01$). Additionally, Sirt3 knockout also up-regulated p-TFEB protein level in the cytoplasm fraction ($P<0.01$) while, in the Sirt3 knockout U87 cells, its overexpression reserved the protein levels of LAMP1 and LAMP2 and increased the amount of lysosome. In the Sirt3 knockdown cells, overexpression of TFEB resulted in up-regulation of LAMPs proteins($P<0.01$). **Conclusion** Sirt3 may affect the nuclear-cytoplasmic distribution of TFEB by regulating the mTOR signaling pathway, up-regulate the expression of LAMPs, enhance the function of lysosome, and then promote the survival and malignant proliferation of glioma cells. Our study suggests that Sirt3 may be a molecular marker for clinical diagnosis and progression of glioma.

[**Key words**] silent information regulator 3; glioma; apoptosis; lysosome; mTOR; TFEB

Supported by the Support Project for Young Talents of Shaanxi Provincial Colleges and Universities (20200314), the General Program of Shaanxi Provincial Department of Science and Technology (2021JM-495), the Special Research Project of Shaanxi Provincial Department of Education (21JK0890), and the Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (S202111840075). Corresponding author: RAJIV Kumar Jha, E-mail: rajivxjtu@gmail.com

胶质瘤是最常见的原发性神经系统肿瘤,占所有原发性神经系统肿瘤的40%以上[1]。高级别胶质母细胞瘤(glioblastoma,GBM)因生长迅速、侵袭性强,患者5年生存率低于10%,严重危害人类健康。目前GBM治疗的策略主要是在手术切除后联合放化疗干扰肿瘤细胞DNA复制,以抑制肿瘤细胞的恶性增殖,但治疗效果不理想。90%以上的患者在指南推荐的标准治疗后数月出现复发[2-3],目前对胶质瘤发病机制研究仍不清楚。最近两项独立研究发现,苍术酮和桉酮通过调控SIRT3-SOD2-ROS信号通路抑制胶质瘤发展[4-5],越来越多的证据表明自噬-溶酶体途径参与胶质瘤发生[6]。在真核细胞中,沉默调节蛋白3(sirtuin 3,Sirt3)对溶酶体降解的正调控作用促进三阴性乳腺癌的进展[7],但Sirt3通过调控溶酶体在胶质瘤发生发展中的作用尚不清楚。

Sirt3是哺乳动物sirtuin家族成员之一,主要位于线粒体中,依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)发挥去乙酰化酶作用[8]。其在体内有44、28 kD 2种形式,主要靠短同源异构体发挥生物学功能[9]。Sirt3参与生物体内诸多代谢过程,如能量代谢[10]、氧化应激[11]、酮体代谢[12]、线粒体稳态[13]、脂肪酸代谢[14]和尿素循环[15]。

溶酶体是负责细胞内消化的细胞器,含多种酸性水解酶[16]。溶酶体相关膜蛋白(lysosome-associated membrane protein,LAMP)是溶酶体膜蛋白的主要成分,对维持其功能至关重要[17]。研究表明,溶酶体数量的增加会导致细胞生长失控[18]。因此,调节溶酶体蛋白是肿瘤靶向治疗的有效方法。转录因子EB(transcription factor EB,TFEB)是溶酶体生物合成的主要调控因子[19]。调控TFEB蛋白磷酸化的激酶主要有mTOR、ERK、GSK3和AKT,其能影响TFEB蛋白的核质转位进而抑制LAMP的转录、表达[20]。但Sirt3在调节溶酶体中的作用尚不清楚,本研究利用CRISPR/Cas9和shRNA系统干预胶质瘤细胞U87中Sirt3的表达,观察其对细胞凋亡,LAMP1、LAMP2、LAMP2A的蛋白水平及mTOR信号通路的影响。探讨Sirt3在胶质瘤发生发展中的作用及可能的分子机制,以期为胶质瘤治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂

人源胶质瘤细胞系(U87、LN-229、U251、SH-SY5Y、A172)、人胚肾细胞(HEK293T)购自美国ATCC细胞库;胎牛血清、DMEM细胞培养基、胰蛋白酶(货号:

SV30208.02、SH30022.01、SH30042.01)购自 Hyclone 公司;Lipofectamine™2000(货号:11668-027)购自 Invitrogen 公司;总蛋白提取试剂盒(货号:0006-100)购自碧云天公司;Sirt3(货号:A5781)购自爱博泰克生物科技有限公司;GAPDH(货号:KC-5G4)购自康成生物工程有限公司;LAMP1、LAMP2、LAMP2A、Acetylation 及 Cleaved-caspase3(货号:ab24170、ab199946、ab125068、ab115124、E83-77)购自 Abcam 公司;p-TFEB(货号:ABE1971)购自 Merck Millipore 公司;mTOR、p-mTOR、Bax(货号:2983、5536、41162)购自 CST 公司;TFEB(货号:13372-1-AP)购自 Proteintech 公司;Rapamycin(货号:AY-22989)购自 Selleck 公司;辣根过氧化物酶标记的小鼠二抗(货号:A4416)和辣根过氧化物酶标记的兔二抗(货号:A0545)购自 Sigma 公司;TUNEL、PI-Annexin-V 试剂盒(货号:C1086、C1062M)和溶酶体红色荧光标记探针、细胞核染料 Hoechst 33342(货号:C1046、C1028)购自碧云天公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及组织样品 胶质瘤细胞系 U87、LN-229、U251、SH-SY5Y、A172 和人胚肾细胞 HEK293T 在 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的恒温培养箱中培养,培养基为含 10%胎牛血清(FBS),1%双抗(链霉素、青霉素)的 DMEM 高糖完全培养基,待细胞融合率达到 80%左右进行传代。10 μmol/L mTOR 抑制剂 Rapamycin 处理细胞 24 h 后,收集样品进行相关蛋白检测。6 例胶质瘤及相邻癌旁组织于术后立即置于液氮中快速冷冻,患者平均年龄 45 岁,其中男性 2 例(星形细胞瘤),女性 4 例(多形性胶质母细胞瘤)。所有患者样本来自西安医学院第一附属医院(2016 年 1 月至 2021 年 12 月)。研究中所使用样本均获得捐赠者的知情同意书,并得到医院伦理委员会的批准(XYLS2023092)。

1.2.2 生物信息学分析 利用中国胶质瘤数据库 CGGA(http://www.cgga.org.cn/)、GEPIA2 数据库(http://gepia.cancer-pku.cn/)分析 Sirt3 在人源胶质瘤组织中的表达情况。CGGA 数据库中获得 325 例胶质瘤样本(WHO Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ),分析在胶质瘤不同级别、分类中 Sirt3 的表达及其与存活的相关性。同时还利用 GEPIA2 数据库分析 Sirt3 在正常组织(n=207)及癌症组织(n=163)中的表达。

1.2.3 质粒载体构建 将公司合成的 shRNA 及 gRNA 正义链、反义链加蒸馏水溶解,先加热至煮沸然后自然冷却至室温进行退火,退火产物与酶切后的载体 pLKO.1(EcoRⅠ、AgeⅠ)、PX459(BbsI)混匀后在 DNA 连接酶的作用下(16 ℃)反应 16 h 后进行转化,挑取单克隆菌落进行培养、提取质粒,通过测序验证。分别用限制性内切酶 EcoRⅠ、BamHⅠ切割 pLVX-IRES-Zs 及目的基因片段,经连接、转化、质粒提取后通过测序比对验证。对照组(sh*Scramble*)、*Sirt3* 敲减序列(sh*Sirt3*、*Sirt3*-gRNA)及过表达基因扩增引物由擎科生物公司合成,见表 1。

1.2.4 病毒包装和细胞感染 HEK293T 细胞融合度达到 70%时,用分别将 8 μg 骨架质粒 psPAX2、pMD2.G 和 *Scr*、sh*Sirt3*、过表达质粒及 30 μL 转染试剂 PEI 加入 1 500 μL DMEM 培养基(不含血清、双抗)混匀,室温放置 20 min 后,加入 HEK293T 细胞转染 4~6 h 换成新鲜完全培养基,继续培养 48 h 后收集培养基,1 500×*g* 离心 10 min 取上清,再用 0.45 μm 滤膜过滤,所得液体即为包装后病毒。用上述包装好的病毒感染 U87 细胞 48 h 后,用含 2.5 μg/mL 嘌呤霉素的培养基筛选 48 h,收集样本用 Western blot 检测 Sirt3、LAMP1、LAMP2、LAMP2A、mTOR、p-mTOR、TFEB、p-TFEB 等蛋白的表达水平。

表 1 引物序列

名称	序列(5′→3′)
sh*Scramble*	正义链:CCGGGAACTCGAGTTCACATGGTTCCTCGAGGAACCATGTGAACTCGAGTTCTTTTTG
	反义链:AATTCAAAAAGAACTCGAGTTCACATGGTTCCTCGAGGAACCATGTGAACTCGAGTTC
sh*Sirt3*-1	正义链:CCGGGCGGCTCTACACGCAGAACATCTCGAGATGTTCTGCGTGTAGAGCCGCTTTTTG
	反义链:AATTCAAAAAGCGGCTCTACACGCAGAACATCTCGAGATGTTCTGCGTGTAGAGCCGC
sh*Sirt3*-2	正义链:CCGGGTGGGTGCTTCAAGTGTTGTTCTCGAGAACAACACTTGAAGCACCCACTTTTTG
	反义链:AATTCAAAAAGTGGGTGCTTCAAGTGTTGTTCTCGAGAACAACACTTGAAGCACCCAC
gRNA-1	正义链:CACCGCTACACGCAGAACATCGAT
	反义链:AAACATCGATGTTCTGCGTGTAGC
gRNA-2	正义链:CACCGTACGATCTCCCGTACCCCG
	反义链:AAACCGGGGTACGGGAGATCGTAC
pLVX-*Sirt3*	正义链:GAATTCCACC ATGGCGTTCTGGGGTTGG
	反义链:GGATCCTTACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCTTTGTCTGGTCCATCAAGC
pLVX-*TFEB*	正义链:GAATTCCACCATGACAGCAAGCTCAG
	反义链:GGATCCTTACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCTCACAGCACATCGCCCT

1.2.5 细胞裂解与核质分离 在收集好的细胞样品中加入含有蛋白酶抑制剂的预冷提取缓冲液置于冰上,每隔5 min剧烈涡旋1次,共裂解20 min,12 500×*g*、4 ℃离心5 min,取上清进行BCA蛋白定量,再加入对应体积的蛋白上样缓冲液(5× Loading buffer)95 ℃加热5 min后进行SDS-PAGE电泳。细胞蛋白质核、质分离实验参照WANG等[21]的方法进行,将细胞重悬于CSK缓冲液,置于冰上孵育15 min后,5 000 r/min、4 ℃离心5 min,细胞核组分用CSK溶液重悬并用超声破碎仪处理。

1.2.6 Western blot检测U87细胞中的蛋白表达 将制备好的蛋白样品经过10% SDS-PAGE电泳分离,在低温下转移至PVDF膜(使用前用甲醇浸泡激活30 s),用含5%脱脂奶粉的PBST封闭液摇床室温孵育1 h,加入Sirt3、Acetylation、Bax、Cleaved-Caspase3、LAMP1、LAMP2、LAMP2A、m-TOR、p-mTOR、TFEB、p-TFEB、GAPDH等抗体4 ℃孵育过夜,用PBST洗膜4次,每次5 min,室温孵育二抗1 h(1∶20 000),再用PBST洗膜4次,每次5 min,最后用ECL法发光后胶片曝光。

1.2.7 TUNEL染色 将Scr、shSirt3稳转细胞系接种于含有盖玻片的6孔板中培养24 h,4%多聚甲醛(PFA)固定10 min后,用1×PBS缓慢冲洗1次,0.3% TritonX-100室温孵育2 min后,加入适当体积的TUNEL染色试剂避光条件下染色1 h,再用1×PBS缓慢冲洗,最后用10 μg/mL的DAPI复染2 min后在荧光显微镜下进行观察统计。

1.2.8 PI-Annexin V染色 筛选稳定的Scr、shSirt3胶质瘤细胞系用1×PBS洗涤2次,加入不含EDTA的胰酶消化后,1 000×*g*离心5 min,弃上清后用1×PBS重悬计数,再1 000×*g*离心5 min,加入195 μL Annexin V-FITC结合液和5 μL Annexin V-FITC轻轻重悬细胞,最后加入10 μL碘化丙啶染色液(PI)室温避光孵育15 min,采用流式细胞仪检测分析。

1.2.9 Lyso-Tracker Red染色 将一定数量的细胞接种在24孔板中培养过夜,去除细胞培养液并加入配好的Lyso-Tracker Red荧光探针工作液(1∶20 000),与细胞在37 ℃共孵育30 min后,去除Lyso-Tracker染液,加入新鲜细胞培养液,随后在荧光显微镜下拍照并进行统计分析。

1.3 统计学分析

使用Image J软件对通过Western blot测定的蛋白质表达进行定量分析,数据以$\bar{x}\pm s$表示,实验至少进行3次。使用Microsoft Excel 2003(Microsoft Corp)与GraphPad Prism 5.0(GraphPad Software Inc.)软件进行数据采集、记录、运算与分析。两组间比较采用两独立样本t检验,多组间差异分析采用方差分析(Tukey's多重比较)。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Sirt3表达与人胶质瘤临床分级显著相关

基于CGGA数据库中胶质瘤患者数据,通过分析发现在不同临床分级胶质瘤患者中Sirt3 mRNA水平显著性增加($P=0.018$,图1A),同时根据中枢神经系统肿瘤最新的分类标准进行分析,显示Sirt3在胶质母细胞瘤中的表达最高($P=0.013$,图1B)。利用GEPIA2数据库分析正常组织与胶质瘤组织中Sirt3的表达,发现Sirt3在胶质瘤组织中高表达($P<0.05$,图1C)。进一步将患者分为Sirt3高表达组和Sirt3低表达组,发现Sirt3高表达与胶质瘤患者的低生存率密切相关($P<0.01$,图1D)。Western blot检测6名胶质瘤患者的临床肿瘤样本和配对的相邻癌旁组织中的Sirt3表达,结果显示Sirt3在胶质瘤组织中高表达($P<0.01$,图1E)。以上结果提示Sirt3可能在胶质瘤发生发展过程中发挥重要的生物学作用。基于数据库分析和实验结果,提示Sirt3在胶质瘤中异常高表达,可能是胶质瘤发展的促进因素。

2.2 胶质瘤细胞系中Sirt3的表达

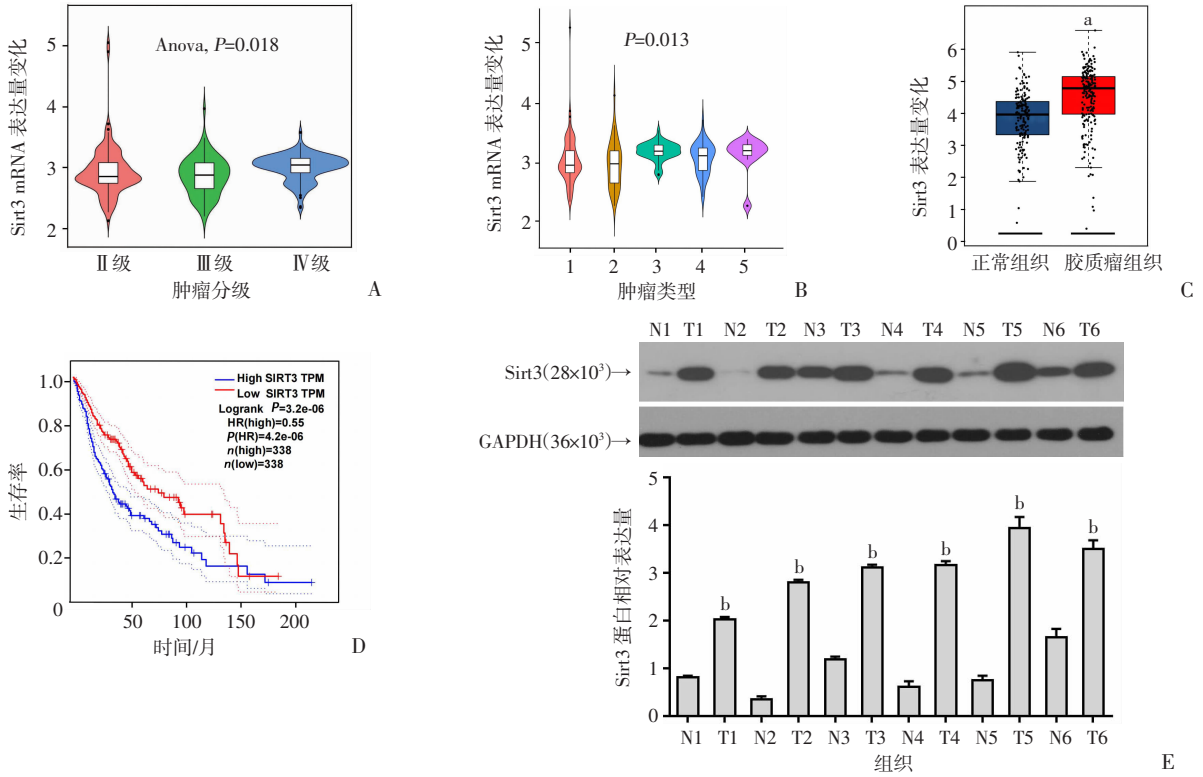
利用Western blot检测胶质瘤细胞系LN-229、U251、U87、SH-SY5Y、A172中Sirt3的表达情况,结果显示Sirt3在U87中的表达明显高于其他细胞系($P<0.05$,图2)。因此,选择U87细胞用于后续实验。

2.3 胶质瘤细胞U87中敲减Sirt3

为进一步明确Sirt3在胶质瘤进展中的生物学功能,构建2个靶向Sirt3不同位点的shRNA载体用来敲减Sirt3的蛋白水平,通过Western blot检测Sirt3、Acetylation确定2个shRNA的敲减效率。与Scr组相比,shSirt3组Sirt3蛋白水平显著降低,Acetylation明显上调($P<0.01$,图3),表明shSirt3质粒敲减效率较高,可以用于后续实验。

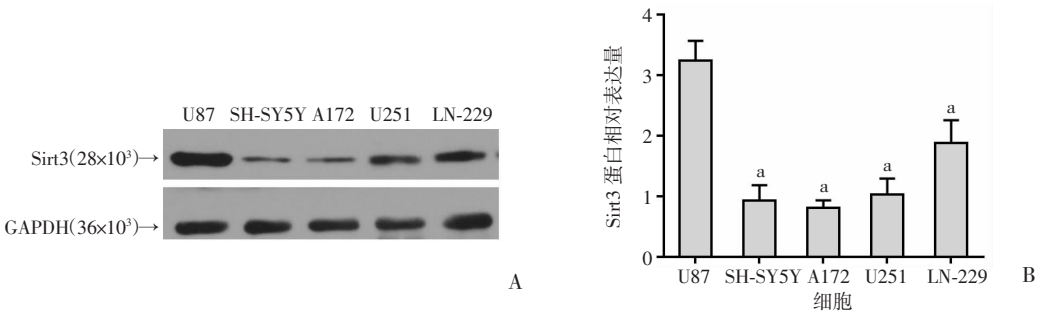
2.4 胶质瘤细胞U87中敲减Sirt3诱导细胞凋亡

U87细胞中敲减Sirt3后,TUNEL染色结果显示,与对照组(Scr)相比,敲减Sirt3后细胞凋亡显著增加($P<0.01$,图4A)。用PI-Annexin V染料标记后流式细胞术分析显示,Sirt3敲减后阳性细胞百分比显著增加($P<0.01$,图4B)。Western blot检测结果显示,Sirt3敲减后凋亡蛋白Bax、Cleaved-caspase3显著增加($P<0.01$,图4C)。提示敲减Sirt3会增加U87细胞凋亡。



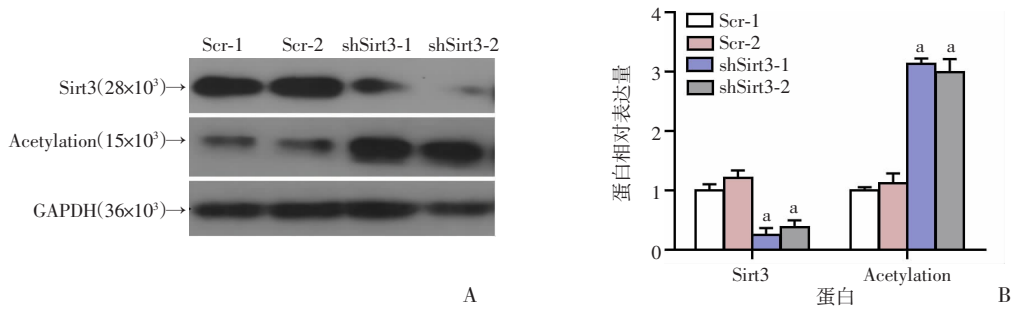
A:Sirt3 在 CGGA 数据库不同临床分级胶质瘤中的表达差异;B:Sirt3 在不同类型胶质瘤中的表达差异　1:星形胶质细胞瘤;2:少突胶质细胞瘤;3:间变性少突胶质细胞瘤;4:间变性星形细胞瘤;5:胶质母细胞瘤;C:利用 GEPIA2 数据库分析胶质瘤组织与正常组织中 Sirt3 的表达　a:$P<0.05$,与正常组织比较;D:Sirt3 表达对胶质瘤患者生存率的影响;E:Western blot 检测 Sirt3 在胶质瘤患者癌旁及肿瘤组织中的表达及半定量分析　N:癌旁组织;T:肿瘤组织;b:$P<0.01$,与癌旁组织比较

图 1　Sirt3 在不同临床分级、不同类型胶质瘤中的表达及对胶质瘤患者生存的影响



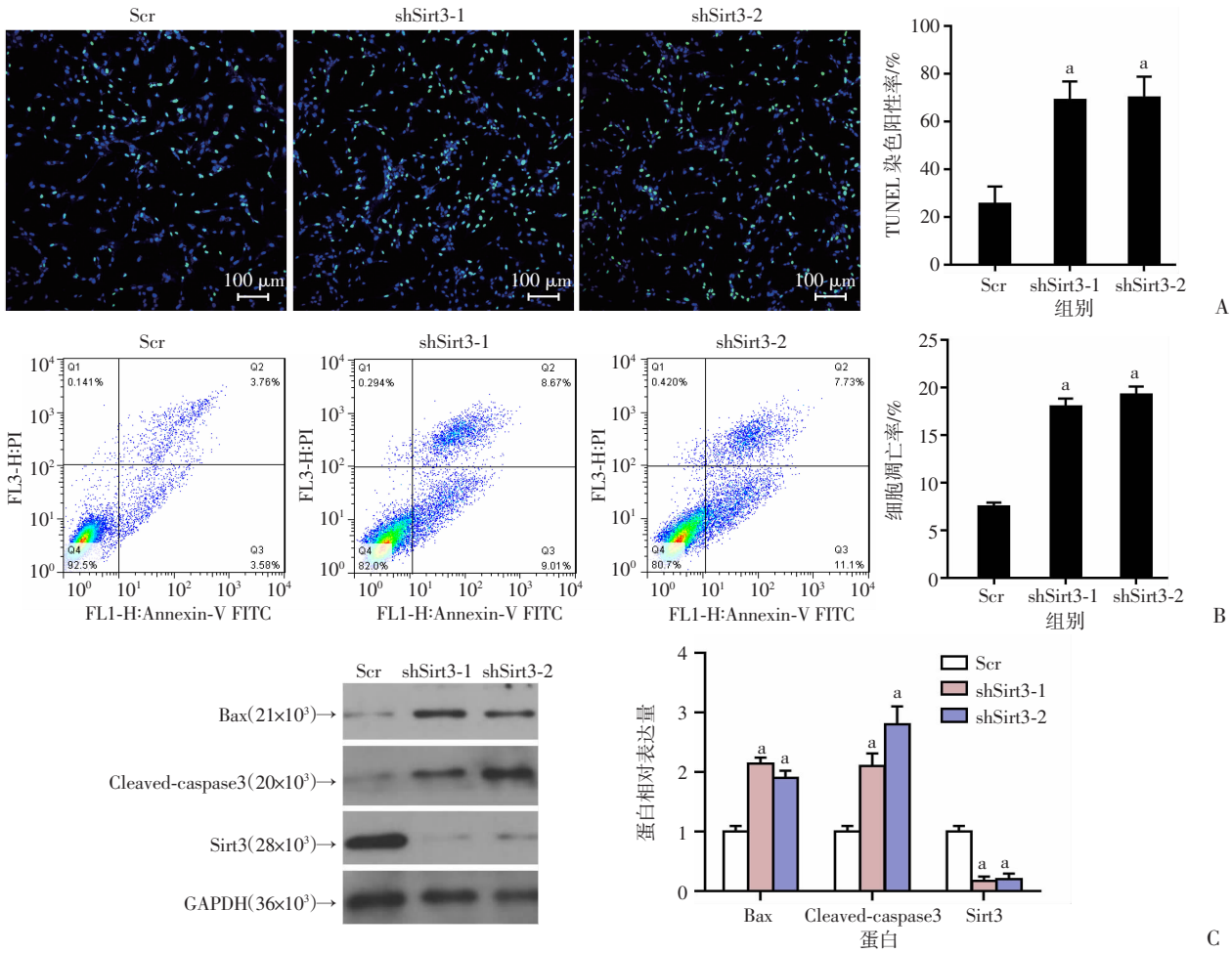
A:Western blot 检测结果;B:Sirt3 的相对表达量分析　a:$P<0.05$,与 U87 比较

图 2　Western blot 检测 Sirt3 在不同胶质瘤细胞中的表达



Scr-1、Scr-2:对照组;shSirt3-1、shSirt3-2:Sirt3 敲减组;a:$P<0.01$,与对照组比较
A:Western blot 检测结果;B:蛋白相对表达量分析

图 3　Western blot 检测 Sirt3 的敲减效果



Scr:对照组;shSirt3-1、shSirt3-2:Sirt3 敲减组;a:$P<0.01$,与对照组比较

A:TUNEL 染色观测敲减 Sirt3 前后 U87 细胞凋亡情况及比例变化;B:流式细胞术分析敲减 Sirt3 后 U87 细胞凋亡情况及比例变化;C:Western blot 检测 Sirt3 敲减后 U87 细胞凋亡蛋白的表达及半定量分析

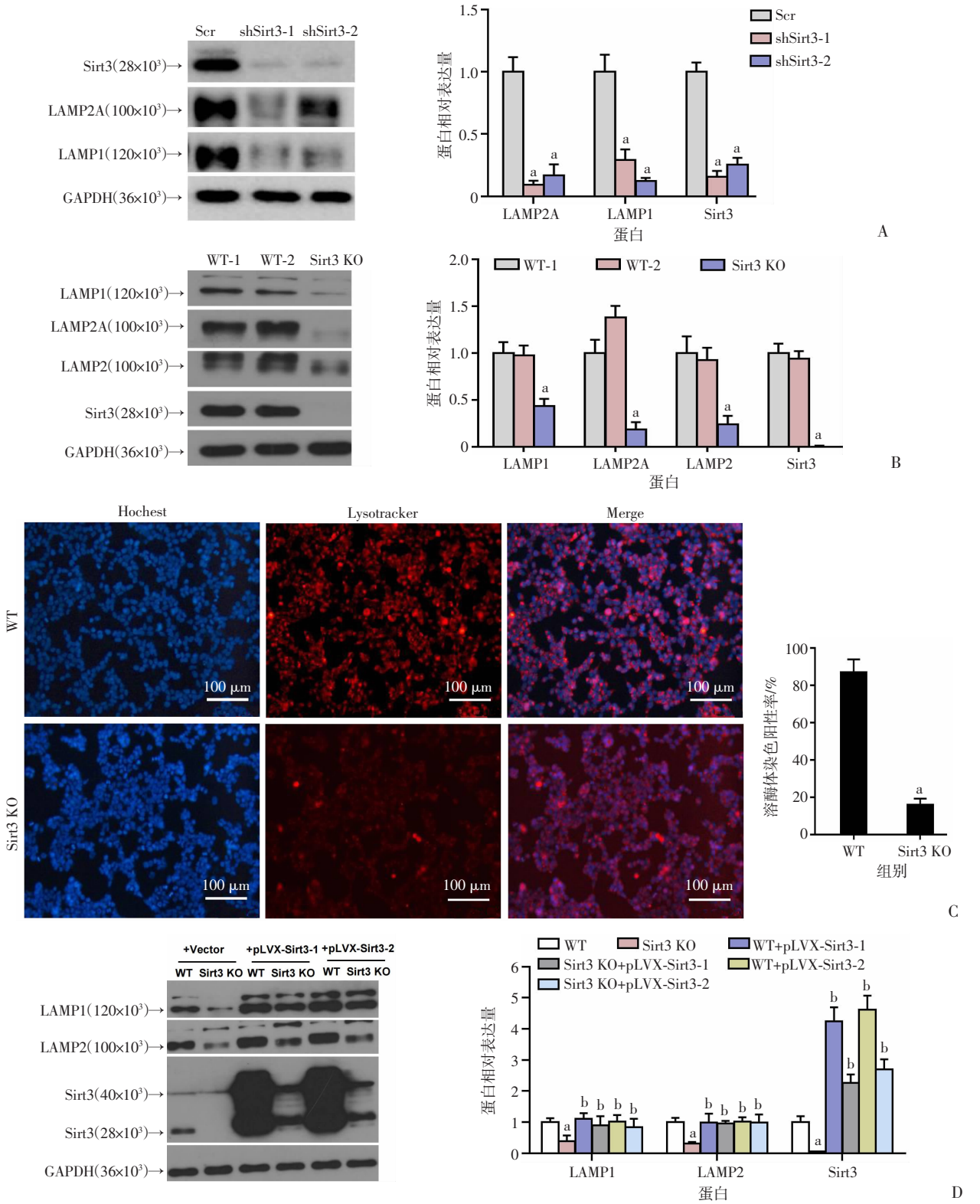
图 4 胶质瘤细胞 U87 中敲减 Sirt3 诱导细胞凋亡

2.5 胶质瘤细胞 U87 中敲减(除)Sirt3 导致溶酶体功能异常

溶酶体具有重要的生物学功能,不仅在延长细胞寿命中有作用,还参与调控细胞凋亡过程。因此,进一步探究 Sirt3 在调控胶质瘤细胞溶酶体中的作用。结果显示,敲减 Sirt3 后溶酶体膜蛋白 LAMP1 和 LAMP2A 显著降低($P<0.01$,图 5A)。利用 Sirt3 敲除细胞系进行 Western blot 验证,结果显示敲除 Sirt3 也会导致 LAMP1、LAMP2、LAMP2A 蛋白水平显著下调($P<0.01$,图 5B)。进一步利用 Lysotracker 染色体系分析溶酶体的数量变化,与 Scr 组相比,Sirt3 敲除组荧光强度明显降低($P<0.01$,图 5C)。最后在 Sirt3 敲除组中转入 *Sirt3* 外源过表达质粒(pLVX-*Sirt3*),利用 Western blot 和 Lysotracker 染色分别检测溶酶体膜蛋白 LAMPs 和数目的变化,发现 LAMP1、LAMP2 的蛋白质水平能够恢复($P<0.01$,图 5D),同时溶酶体的数量也显著增加($P<0.01$,图 5E)。证明 Sirt3 可能在调控胶质瘤溶酶体数量中发挥重要作用。

2.6 胶质瘤细胞 U87 中敲减 Sirt3 通过 mTOR 通路诱导细胞凋亡

mTOR 信号通路是调控细胞凋亡、自噬的重要通路,在细胞代谢中发挥重要的作用。通过 Western blot 检测发现,与对照组相比,敲减 Sirt3 后 p-mTOR、p-TFEB 蛋白显著上调($P<0.01$,图 6A)。为探究 Sirt3 敲减所导致的细胞凋亡增加是否依赖于 mTOR 通路,将 mTOR 通路抑制剂雷帕霉素(Rapamycin)加入 Sirt3 敲减的 U87 细胞中,通过流式细胞术分析发现细胞凋亡比例明显减少($P<0.01$,图 6B)。进一步说明敲减 Sirt3 后 U87 细胞凋亡增加是由 mTOR 激活导致。

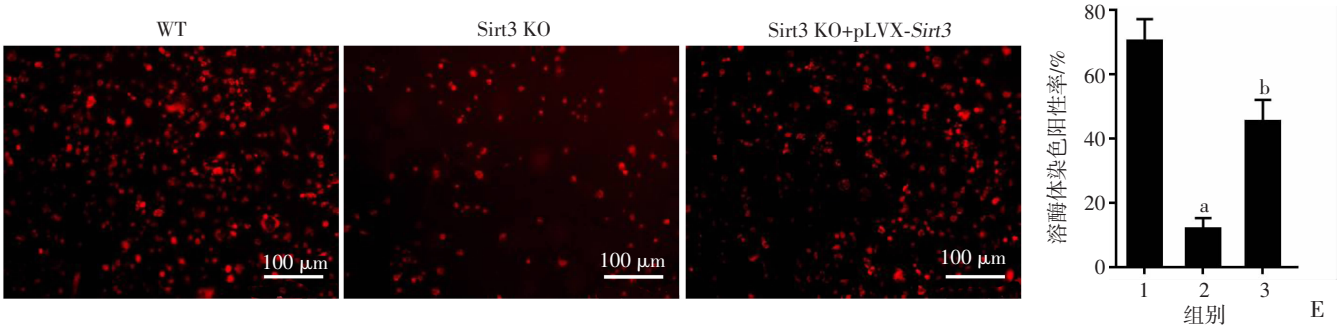


Scr:对照组;shSirt3-1、shSirt3-2:Sirt3 敲减组;WT:空白对照组;Sirt3 KO:Sirt3 敲除组;a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 Sirt3 敲除组比较

A:Western blot 检测 Sirt3 敲减后 U87 细胞溶酶体膜蛋白 LAMP1、LAMP2A 的表达;B:Western blot 检测 Sirt3 敲除后 U87 细胞溶酶体膜蛋白 LAMP1、LAMP2、LAMP2A 的表达;C:Lysotracker 探针染色分析 U87 细胞溶酶体数量变化;D:Western blot 检测在敲除 Sirt3 的 U87 细胞中过表达 Sirt3 后 LAMP1、LAMP2 蛋白表达

图 5 胶质瘤细胞 U87 中敲减(除)Sirt3 导致溶酶体功能异常

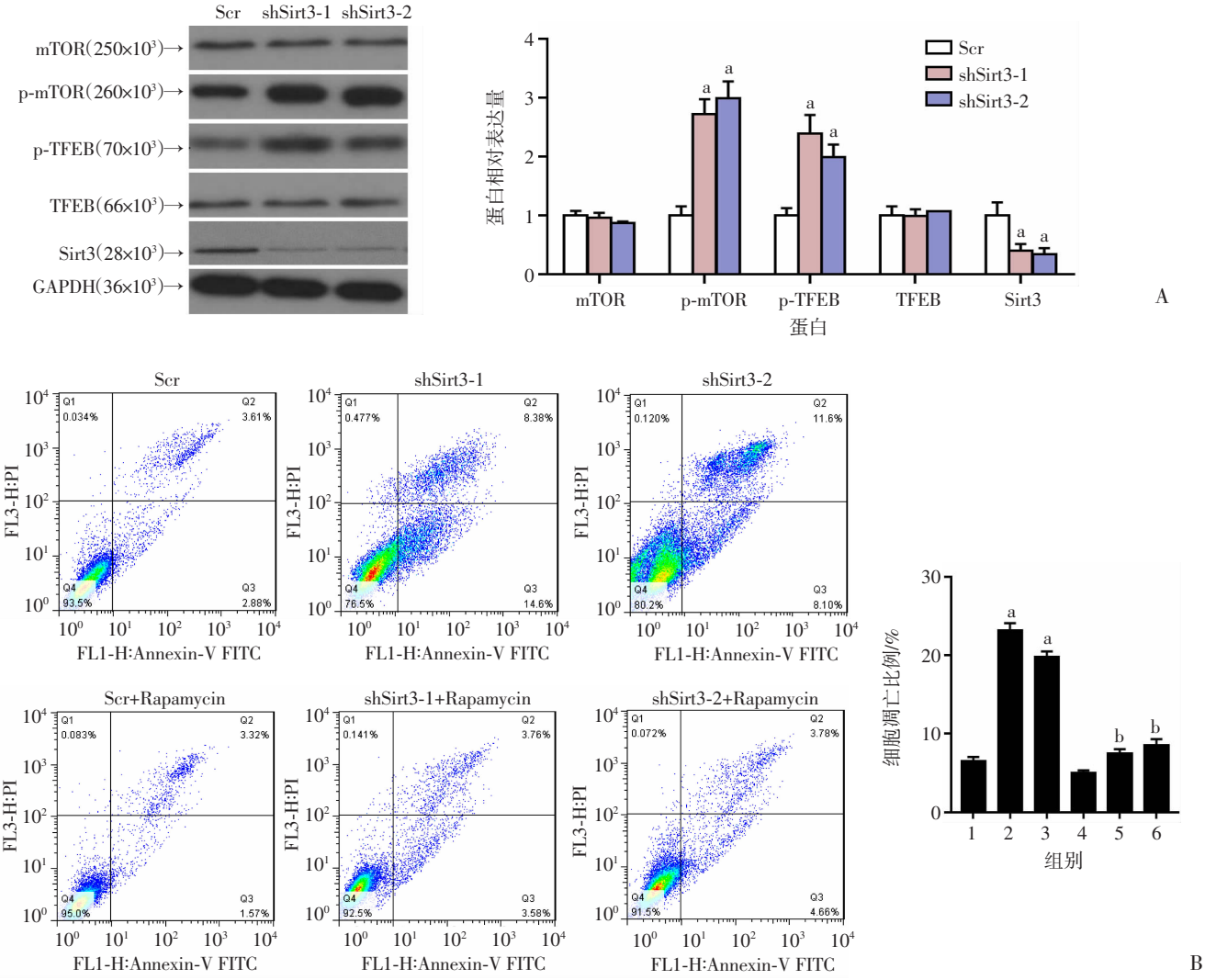
图 5E 续下页



Scr:对照组;shSirt3-1、shSirt3-2:Sirt3 敲减组;WT:空白对照组;Sirt3 KO:Sirt3 敲除组;a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 Sirt3 敲除组比较

E:Lysotracker 染色分析外源过表达 Sirt3 后细胞溶酶体的数量变化 1:WT;2:Sirt3 KO;3:WT+pLVX-*Sirt3*

续图 5 胶质瘤细胞 U87 中敲减(除)Sirt3 导致溶酶体功能异常



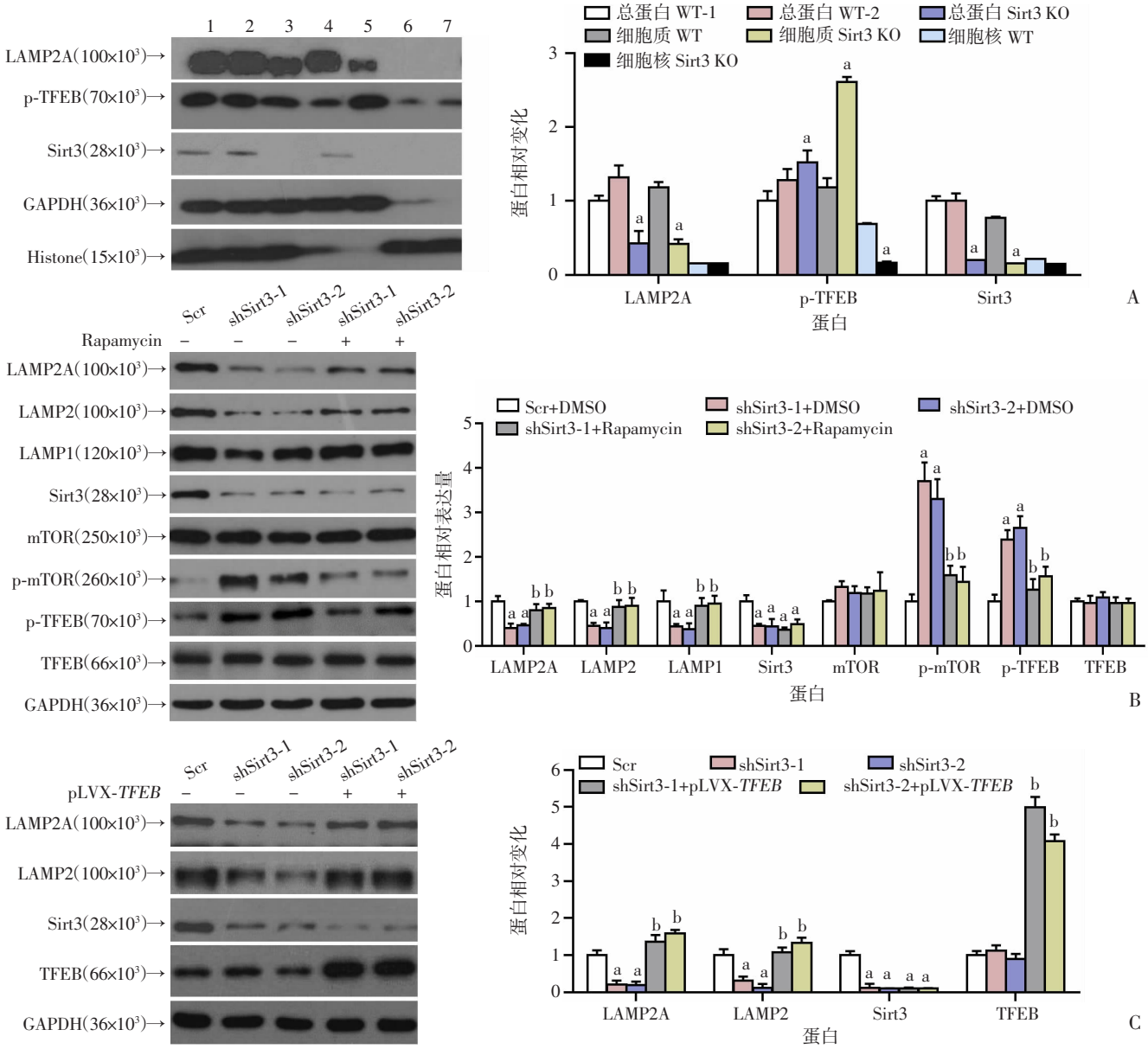
Scr:对照组;shSirt3-1、shSirt3-2:Sirt3 敲减组;a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.01$,与 Sirt3 敲减组比较

A:Western blot 检测敲减 Sirt3 后 U87 细胞 Sirt3、mTOR、p-mTOR、TFEB 及 p-TFEB 蛋白表达的变化;B:流式细胞术分析敲减 Sirt3 的 U87 细胞经 Rapamycin 处理后细胞凋亡比例的变化 1:Scr;2:shSirt3-1;3:shSirt3-2;4:Scr+Rapamycin;5:shSirt3-1+Rapamycin;6:shSirt3-2+Rapamycin

图 6 胶质瘤细胞 U87 中敲减 Sirt3 通过 mTOR 通路诱导细胞凋亡

2.7 胶质瘤细胞 U87 中干预 Sirt3 表达通过 mTOR 通路影响 LAMPs

TFEB 是溶酶体蛋白 LAMPs 的主要调控因子,可被 mTOR 激酶磷酸化。因此,进一步探究 Sirt3 在调节细胞凋亡和 LAMPs 蛋白水平的潜在机制。利用敲除 Sirt3 的 U87 细胞进行核质分离实验,通过 Western blot 检测发现,与对照组相比,敲除 Sirt3 会导致溶酶体膜蛋白 LAMP2A 表达显著减少,但细胞质中 p-TFEB 表达显著增加($P<0.01$,图 7A)。此外,利用 Rapamycin 处理 Sirt3 敲减的 U87 细胞,Western blot 检测发现,LAMPs 蛋白水平显著升高($P<0.01$,图 7B)。与对照组相比,在敲减 Sirt3 的 U87 细胞中外源过表达 *TFEB* 后 LAMPs 蛋白明显上调($P<0.01$,图 7C)。以上结果均证明 Sirt3 可能通过调节 mTOR 通路,影响 TFEB 的磷酸化状态及核质分布,进而下调 LAMPs 蛋白表达。



Scr:对照组;shSirt3-1、shSirt3-2:Sirt3 敲减组;WT:空白对照组;Sirt3 KO:Sirt3 敲除组;a:$P<0.01$,与对应对照组比较;b:$P<0.01$,与 Sirt3 敲减组比较

A:Western blot 检测 Sirt3 敲除前后核质分离的 U87 细胞 LAMP2A、Sirt3、p-TFEB 蛋白表达 1:总蛋白 WT-1;2:总蛋白 WT-2;3:总蛋白 Sirt3 KO;4:细胞质 WT;5:细胞质 Sirt3 KO;6:细胞核 WT;7:细胞核 Sirt3 KO;GAPDH 代表胞浆蛋白组分;Histone 代表胞核蛋白组分;B:Western blot 检测 Rapamycin 处理敲减 Sirt3 的 U87 细胞 LAMP1、LAMP2、LAMP2A、Sirt3、mTOR、p-mTOR、TFEB、p-TFEB 蛋白表达;C:Western blot 检测过表达 TFEB 敲减 Sirt3 的 U87 细胞 LAMP2A、LAMP2、TFEB 蛋白表达

图 7 胶质瘤细胞 U87 中敲除(减)Sirt3 下调 LAMPs 依赖 mTOR 途径

3 讨论

经标准化的替莫唑胺化疗结合放射治疗后,胶质瘤患者的预后仍较差,且容易复发,5 年生存率极低[22]。因此,筛选和探究新的干预靶点对制定新的治疗策略和改善患者预后具有重要意义。Sirt3 是线粒体中重要的去乙酰化酶,在肿瘤发生发展中具有双重调节作用[23]。最近的一项研究表明,Sirt3 通过阻断上皮-间质转化过程抑制胆囊癌的发展[24]。本研究结果显示,Sirt3 在胶质瘤组织中异常高表达,且与患者生存率呈负相关,提示 Sirt3 在胶质瘤进程中发挥促进作用,是胶质瘤发生的驱动因素。因此,本研究聚焦探讨 Sirt3 在胶质瘤发生发展中的作用机制,旨在为胶质瘤的临床诊治提供理论和实验依据。

mTOR 信号通路在哺乳动物生命活动中有重要的作用,细胞内外多种信号通路上的生长因子、激素、应激和能量转化代谢等因素通过激活 mTOR,调控细胞生长、增殖、凋亡等生理过程[25]。其活性一旦异常就会导致细胞代谢和增殖状态高度活跃,从而导致肿瘤的发生[26]。溶酶体是细胞中调控分解代谢的重要细胞器,参与体内大分子、细胞器循环利用及细胞凋亡等关键生物学过程[27-28]。正常情况下,细胞内的溶酶体数目是恒定的,一旦出现异常可能会导致细胞清除能力障碍,诱发细胞凋亡甚至死亡[29]。LAMP1、LAMP2 和 LAMP2A 是溶酶体上重要的膜蛋白,高度糖基化修饰能增加其稳定性[30]。TFEB 是溶酶体生物发生的主要调节因子[31],与溶酶体膜上的生长调节蛋白 mTOR 复合物 1(mTORC1)共定位,且 mTORC1 能使 TFEB 发生磷酸化,进而抑制 TFEB 核转位过程[32]。

Sirt3 主要位于线粒体,可对靶蛋白进行去乙酰化并增强其活性,进而调控多种生物学过程。乙酰化修饰是一种主要发生在蛋白质赖氨酸残基上的可逆性化学修饰。发生在线粒体上会导致线粒体上多个代谢酶活性降低,严重影响线粒体功能的维持。Sirt3 是调控线粒体蛋白翻译后修饰的重要调节因子,能有效调控超氧化物歧化酶 2(superoxide dismutase 2, SOD2)、乙酰辅酶 A 合成酶等线粒体蛋白乙酰化修饰,从而降低细胞内能量代谢水平及活性氧(ROS)水平。ROS 作为第二信使分子,可以参与 mTOR 等的信号级联反应,进而调控细胞增殖、凋亡等重要生物学过程。近期研究表明芳樟醇通过调控 Sirt3 的表达调节 SOD2 的活性,进而诱导 ROS 促胶质瘤细胞凋亡[33]。本研究显示,敲减 Sirt3 导致细胞凋亡增加,溶酶体膜蛋白 LAMP 明显降低,p-mTOR、胞质中 p-TFEB 蛋白表达上调,且外源过表达 TFEB 能使 LAMPs 蛋白水平恢复,表明敲减 Sirt3 后 mTOR 信号通路激活,从而影响 TFEB 的核质易位,导致 LAMPs 的表达下调,进而诱发细胞凋亡。因此,Sirt3 可能通过调控 mTOR 信号通路,增强 LAMPs 蛋白表达,促进胶质瘤的发生发展。

总之,本研究探讨 Sirt3 表达水平与胶质瘤发生发展及患者生存的关系,结果表明 Sirt3 高表达与胶质瘤患者临床分级正相关,与患者生存负相关。敲减 Sirt3 会影响 mTOR 信号通路及 p-TFEB 细胞定位,最终导致胶质瘤细胞中 LAMP 的表达急剧减少且细胞凋亡明显增加。这些发现表明 Sirt3 可能是胶质瘤诊治中一个新的生物标志物,靶向 Sirt3 也是一种很有前景的胶质瘤治疗策略。

参考文献:

[1] PETKOVIC M, YALÇIN M, HEESE O, *et al*. Differential expression of the circadian clock network correlates with tumour progression in gliomas[J]. BMC Med Genomics, 2023, 16(1): 154. DOI: 10.1186/s12920-023-01585-w.

[2] VERGARA Z, GOMEZ M S, DESVOYES B, *et al*. Distinct roles of *Arabidopsis* ORC1 proteins in DNA replication and heterochromatic H3K27me1 deposition[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 1-13. DOI: 10.1038/s41467-023-37024-8.

[3] XU S C, TANG L, LI X Z, *et al*. Immunotherapy for glioma: current management and future application[J]. Cancer Lett, 2020, 476: 1-12. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.02.002.

[4] SHI J L, SUN S S, XING S Q, *et al*. Fraxinellone inhibits progression of glioblastoma *via* regulating the SIRT3 signaling pathway[J]. Biomedecine Pharmacother, 2022, 153(1): 113416. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113416.

[5] XU Q C, LIU X Y, MOHSENI G, *et al*. Mechanism research and treatment progress of NAD pathway related molecules in tumor immune microenvironment[J]. Cancer Cell Int, 2022, 22(1): 1-21. DOI: 10.1186/s12935-022-02664-1.

[6] VISINTIN R, RAY S K. Intersections of ubiquitin-proteosome system and autophagy in promoting growth of glioblastoma multiforme: challenges and opportunities[J]. Cells, 2022, 11(24): 4063. DOI: 10.3390/cells11244063.

[7] ZHANG J, ZOU L, SHI D F, *et al*. Structure-guided design of a small-molecule activator of sirtuin-3 that modulates autophagy in triple negative breast cancer[J]. J Med Chem, 2021, 64(19): 14192-14216. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c02268.

[8] WANG T S, CAO Y, ZHENG Q, *et al*. SENP1-Sirt3 signaling controls mitochondrial protein acetylation and metabolism[J]. Mol Cell, 2019, 75(4): 823-834.e5. DOI: 10.1016/j.molcel.2019.06.008.

[9] GAO G Y, CHEN W W, YAN M J, *et al*. Rapamycin regulates the balance between cardiomyocyte apoptosis and autophagy in chronic heart failure by inhibiting mTOR signaling[J]. Int J Mol Med, 2020, 45(1): 195-209. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4407.

[10] GUSYATINER O, HEGI M E. Glioma epigenetics: from subclassification to novel treatment options[J]. Semin

Cancer Biol, 2018, 51: 50-58. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.11.010.

[11] ZHANG H, DAI S H, YANG Y F, *et al*. Role of sirtuin 3 in degenerative diseases of the central nervous system[J]. Biomolecules, 2023, 13(5): 735. DOI: 10.3390/biom13050735.

[12] DIKALOVA A E, PANDEY A, XIAO L, *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. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.119.315767.

[13] ZHAO S J, GONG J F, WANG Y, *et al*. Sirtuin 3 regulation: a target to alleviate β-hydroxybutyric acid-induced mitochondrial dysfunction in bovine granulosa cells[J]. J Anim Sci Biotechnol, 2023, 14(1): 18. DOI: 10.1186/s40104-022-00825-w.

[14] KIM T S, JIN Y B, KIM Y S, *et al*. SIRT3 promotes antimycobacterial defenses by coordinating mitochondrial and autophagic functions[J]. Autophagy, 2019, 15(8): 1356-1375. DOI: 10.1080/15548627.2019.1582743.

[15] ONORATI A V, DYCZYNSKI M, OJHA R, *et al*. Targeting autophagy in cancer[J]. Cancer, 2018, 124(16): 3307-3318. DOI: 10.1002/cncr.31335.

[16] RIZZOLLO F, MORE S, VANGHELUWE P, *et al*. The lysosome as a master regulator of iron metabolism[J]. Trends Biochem Sci, 2021, 46(12): 960-975. DOI: 10.1016/j.tibs.2021.07.003.

[17] BONAM S R, WANG F J, MULLER S. Lysosomes as a therapeutic target[J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(12): 923-948. DOI: 10.1038/s41573-019-0036-1.

[18] MUTVEI A P, NAGIEC M J, HAMANN J C, *et al*. Rap1-GTPases control mTORC1 activity by coordinating lysosome organization with amino acid availability[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1416. DOI: 10.1038/s41467-020-15156-5.

[19] JEONG S J, STITHAM J, EVANS T D, *et al*. Trehalose causes low-grade lysosomal stress to activate TFEB and the autophagy-lysosome biogenesis response[J]. Autophagy, 2021, 17(11): 3740-3752. DOI: 10.1080/15548627.2021.1896906.

[20] ZHOU Y J, ZHOU X T, HUANG X J, *et al*. Lysosome-mediated cytotoxic autophagy contributes to tea polysaccharide-induced colon cancer cell death via mTOR-TFEB signaling[J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(2): 686-697. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c07166.

[21] WANG Y, HUANG Y C, CHENG E, *et al*. LSD1 is required for euchromatic origin firing and replication timing[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 102. DOI: 10.1038/s41392-022-00927-x.

[22] PENG P, CHEN Z R, ZHANG X L, *et al*. Construction and verification of an RNA-binding protein-associated prognostic model for gliomas[J]. Curr Med Sci, 2023, 43(1): 156-165. DOI: 10.1007/s11596-022-2694-1.

[23] PODYACHEVA E, TOROPOVA Y. The role of NAD+, SIRTs interactions in stimulating and counteracting carcinogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(9): 7925. DOI: 10.3390/ijms24097925.

[24] LIU L G, LI Y, CAO D Y, *et al*. SIRT3 inhibits gallbladder cancer by induction of AKT-dependent ferroptosis and blockade of epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Lett, 2021, 510(1): 93-104. DOI: 10.1016/j.canlet.2021.04.007.

[25] LIU G Y, SABATINI D M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2020, 21(4): 183-203. DOI: 10.1038/s41580-019-0199-y.

[26] LIU R, ZENG L W, GONG R, *et al*. mTORC1 activity regulates post-translational modifications of glycine decarboxylase to modulate glycine metabolism and tumorigenesis[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4227. DOI: 10.1038/s41467-021-24321-3.

[27] SAVINI M, FOLICK A, LEE Y T, *et al*. Lysosome lipid signalling from the periphery to neurons regulates longevity[J]. Nat Cell Biol, 2022, 24(6): 906-916. DOI: 10.1038/s41556-022-00926-8.

[28] MAHAPATRA K K, MISHRA S R, BEHERA B P, *et al*. The lysosome as an imperative regulator of autophagy and cell death[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(23): 7435-7449. DOI: 10.1007/s00018-021-03988-3.

[29] 朱圣宇,任超,姚人骐,等. 溶酶体损伤与细胞死亡:疾病治疗新靶点[J]. 生理科学进展, 2021, 52(2): 111-116. DOI: 10.3969/j.issn.0559-7765.2021.02.008.
ZHU S Y, REN C, YAO R Q, *et al*. Lysosomal injury and cell death: a new target for disease treatment[J]. Prog Physiol Sci, 2021, 52(2): 111-116. DOI: 10.3969/j.issn.0559-7765.2021.02.008.

[30] SUDHAKAR J N, LU H H, CHIANG H Y, *et al*. Lumenal Galectin-9-Lamp2 interaction regulates lysosome and autophagy to prevent pathogenesis in the intestine and pancreas[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 4286. DOI: 10.1038/s41467-020-18102-7.

[31] WANG S G, NI H M, CHAO X J, *et al*. Impaired TFEB-mediated lysosomal biogenesis promotes the development of pancreatitis in mice and is associated with human pancreatitis[J]. Autophagy, 2019, 15(11): 1954-1969. DOI: 10.1080/15548627.2019.1596486.

[32] QIAO X B, ZHANG Y X, ZHANG Z, *et al*. KCNJ15 deficiency promotes drug resistance via affecting the function of lysosomes[J]. Asian J Pharm Sci, 2023, 18(3): 100814. DOI: 10.1016/j.ajps.2023.100814.

[33] WANG S Q, YANG J Y, LIN T T, *et al*. Excessive production of mitochondrion-derived reactive oxygen species induced by titanium ions leads to autophagic cell death of osteoblasts *via* the SIRT3/SOD2 pathway[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(1): 257-264. DOI: 10.3892/mmr.2020.11094.

(**收稿**:2023-06-13;**修回**:2023-07-12)

(编辑 汪勤俭)