基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003560

过表达SIRT4对骨肉瘤细胞恶性生物学行为及能量代谢的影响

岳小涵，康　权，石雨鹭，罗　庆

（重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所、国家儿童健康与疾病临床医学研究中心、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、重庆市干细胞治疗工程技术研究中心，重庆　400014）

【摘　要】目的：探讨过表达SIRT4对人骨肉瘤细胞恶性生物学行为及对成骨分化的调控作用，以及过表达SIRT4对线粒体能量代谢的影响。**方法：**构建稳定过表达SIRT4的U2OS、MG63骨肉瘤细胞株，通过qRT-PCR和Western blot检测SIRT4的mRNA和蛋白表达水平；CCK-8、克隆形成实验、EDU555染色法及检测细胞增殖；裸鼠胫骨成瘤实验检验成瘤能力；流式细胞术检测细胞周期；DAPI染色及Annexin V-APC/7-AAD双染法检测细胞凋亡；细胞划痕实验、Transwell实验检测细胞迁移及侵袭能力；碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）染色和茜素红S染色分别检测细胞的早期和晚期成骨分化；葡萄糖检测试剂盒测定培养基及细胞内葡萄糖含量；乳酸检测试剂盒测定培养基及细胞内乳酸含量；三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）检测试剂盒检测细胞总ATP含量；四甲基罗丹明酯染色（tetramethylrhodamine ethylester perchlorate，TMRE）测定试剂检测线粒体膜电位。**结果：**过表达SIRT4组细胞增殖、迁移及侵袭能力降低，裸鼠胫骨成瘤的瘤体体积减小，凋亡细胞增多；过表达SIRT4组细胞的G_0/G_1期占比明显增多，S期占比明显减少；过表达SIRT4组细胞ALP染色、茜素红S染色钙盐结节明显增多；过表达SIRT4组培养基中的葡萄糖较对照组消耗减少，细胞中的葡萄糖含量较对照组减少；过表达SIRT4组细胞中的乳酸含量较对照组减少，培养基中的乳酸较对照组产生减少；过表达SIRT4组细胞的总ATP较对照组更低；过表达SIRT4组的线粒体膜电位较对照组更低。**结论：**在U2O和MG63细胞中，过表达SIRT4抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移、侵袭以及成瘤能力，促进骨肉瘤细胞凋亡以及早晚期成骨分化，调节骨肉瘤细胞能量代谢。

【关键词】骨肉瘤；SIRT4；恶性生物学行为；成骨分化；能量代谢

【中图分类号】R114　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2023-11-02

Effect of Sirtuin 4 overexpression on malignant biological behavior and energy metabolism of osteosarcoma cells

Yue Xiaohan，Kang Quan，Shi Yulu，Luo Qing

（*Department of Pediatrics，Children's Hospital of Chongqing Medical University；National Clinical Research Center for Child Health and Disorders；Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders；Chongqing Engineering Research Center of Stem Cell Therapy*）

【Abstract】*Objective*：To investigate the regulatory effect of sirtuin 4（SIRT4）overexpression on the malignant biological behavior of human osteosarcoma cells and osteogenic differentiation，as well as the influence of SIRT4 overexpression on mitochondrial energy metabolism. ***Methods*：**U2OS and MG63 osteosarcoma cell lines with stable overexpression of SIRT4 were constructed，and qRT-PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression levels of SIRT4；CCK-8 assay，colony formation assay，and EDU555 staining were used to observe cell proliferation；tibial tumorigenesis assay in nude mice was used to observe tumorigenic ability；flow cytometry was used to detect cell cycle；DAPI staining and Annexin V-APC/7-AAd double staining were used to measure cell apoptosis；wound healing assay and Transwell assay were used to observe the migration and invasion abilities of cells；alkaline phosphatase（ALP）staining and alizarin red S staining were used to detect early and late osteogenic differentiation，respectively；glucose assay kit was used to determine the content of glucose in the medium and

作者介绍：岳小涵，Email：987105944@qq.com，研究方向：骨肉瘤的恶性生物学行为、成骨分化以及能量代谢。

通信作者：罗　庆，Email：352934430@qq.com。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81172545）；重庆市自然科学基金资助项目（编号：cstc2020jcyj-msxmX0113）。

优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240819.0907.016（2024-08-19）

cells; lactic acid assay kit was used to determine the content of lactic acid in the medium and cells; triphosphate assay kit was used to determine the total content of adenosine triphosphate (ATP) in the medium and cells; tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate staining was used to measure mitochondrial membrane potential. ***Results***: The SIRT4 overexpression group had significant reductions in the proliferation, migration, and invasion abilities of cells, a significant reduction in the tumor volume of tibial osteoblastoma in nude mice, and a significant increase in apoptotic cells. As for cell cycle, the SIRT4 overexpression group showed a significant increase in the proportion of cells in G_0/G_1 phase and a significant reduction in the proportion of cells in S phase. ALP staining and alizarin red S staining showed a significant increase in the number of calcium salt nodules in the SIRT4 overexpression group. Compared with the control group, the SIRT4 overexpression group had significant reductions in the consumption of glucose in the medium and the content of glucose in cells, as well as significant reductions in the content of lactic acid in cells and the medium. The SIRT4 overexpression group had a lower mitochondrial membrane potential than the control group. ***Conclusion***: In U2O and MG63 cells, SIRT4 overexpression inhibits the proliferation, migration, invasion, and tumorigenic ability of osteosarcoma cells, promotes the apoptosis of osteosarcoma cells and early and late osteogenic differentiation, and regulates energy metabolism in osteosarcoma cells.

【Key words】osteosarcoma; sirtuin 4; malignant biological behavior; osteogenic differentiation; energy metabolism

骨肉瘤是最常见的原发性恶性骨肿瘤，常发生在青少年中，新辅助化疗的应用使骨肉瘤患者的生存率有了一定的提升，低级别骨肉瘤患者的5年生存率约为90%[1]，而骨肉瘤转移性患者的5年总体生存率为35.5%[2]。目前骨肉瘤的病因尚未完全阐明，通过研究骨肉瘤的潜在发病机制，可能为临床治疗提供新的治疗策略。

有研究指出能量代谢在肿瘤发生和发展中起到不可或缺的作用[3]。本课题组前期发现过表达糖异生关键酶基因（fructose-1, 6-bisphosphatase 1, FBP1）和敲低3-磷酸甘油酸脱氢酶（3-phosphoglycerin dehydrogenase, PHGDH）可以改变骨肉瘤糖代谢微环境，促进成骨分化，逆转恶性生物学行为。sirtuin 4（SIRT4）主要位于线粒体中，一些证据表明SIRT4是能量代谢和肿瘤发生之间的“桥梁蛋白”[4]，SIRT4除了具有ADP-核糖基转移酶、NAD+依赖性脱乙酰酶活性，还可以通过ADP-核糖基化、脱甲酰化、脱乙酰基化调节底物蛋白的功能[5-6]，这些酶的活性也使SIRT4能够参与能量代谢过程，如促进胰岛素的分泌、协同糖酵解抑制剂参与糖酵解过程[7]、抑制谷氨酸脱氢酶调节谷氨酰胺代谢[8]、参与DNA损伤反应[9]等，SIRT4已被证实在多种肿瘤中异常表达，在肿瘤细胞增殖、分化、凋亡和能量代谢中发挥着重要作用[10-11]；在前列腺癌的研究中，过表达SIRT4抑制前列腺癌细胞的迁移、侵袭能力和增殖，诱导细胞凋亡，同时抑制谷氨酰胺的代谢[11]；同时有多项研究指出SIRT4可以协同化疗药物，例如SIRT4可以增强结直肠癌细胞对5-FU和奥沙利铂的化学敏感度[12]；SIRT4能增强乳腺癌细胞对他莫昔芬的敏感性[13]等。本研究采用低表达SIRT4的骨肉瘤细胞株U2OS和MG63为研究对象，构建稳定过表达SIRT4的人骨肉瘤细胞株，以研究过表达SIRT4对骨肉瘤细胞株U2OS和MG63恶性生物学行为、成骨分化及能量代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

骨肉瘤细胞株U2OS由重庆医科大学基础医学院黄增益教授赠予，骨肉瘤细胞株MG63由本实验室保存；胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司；105 IU/L青霉素、100 mg/L链霉素的DMEM高糖培养基购自美国Gibco公司；过表达SIRT4慢病毒购自擎科生物；青霉素-链霉素溶液（100×）、胰蛋白酶消化液、DAPI染料、结晶紫染液、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase, ALP）、茜素红S染液、Beyo-Click™EdU 555细胞增殖检测试剂盒、Triton-X100、抗荧光淬灭封片液、一抗稀释液及封闭液、葡萄糖检测试剂盒以及ATP检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司；逆转录试剂盒和SYBR荧光染料购自abclonal生物科技有限公司；CCK-8试剂购自米鼠（西安）生物科技有限公司；鼠抗人SIRT4单克隆抗体购自proteintech武汉三鹰生物技术有限公司，鼠抗β-actin单克隆抗体、山羊抗鼠二抗购自成都正能生物技术有限责任公司；PVDF膜购自美国Bio-Rad公司；全蛋白提取试剂盒、乳酸（lactate, LD）测试盒以及Annexin V-APC/7-AAD双染细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司；四甲基罗丹明酯染色（tetramethylrhodamine ethylester perchlorate, TMRE）测定试剂购自Medchemex-

press公司；实时荧光定量聚合酶链式反应引物购自北京六合华大基因科技股份有限公司，引物序列见表1。

表1 实时荧光定量聚合酶链式反应引物序列

基因	引物序列
SIRT4	F:5'-TATCCTCACTGCCTGGGAGAAGAAG-3'
	R:5'-AGTTTCAGACACGCCAAGTCATCC-3'
β-actin	F:5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'
	R:5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'

1.2 细胞培养

将U2OS、MG63细胞用含有10%胎牛血清及青霉素/链霉素（1X）的DMEM高糖培养基置于37 ℃、体积分数为5%CO_2的孵育箱中培养，待细胞贴壁后进行过表达SIRT4慢病毒和空白对照病毒转染。

实验设置2组，每次实验重复次数至少3次以上：①阴性对照组，转染空载慢病毒；②SIRT4过表达组，转染SIRT4过表达慢病毒。

1.3 方法

1.3.1 qRT-PCR检测SIRT4 mRNA表达水平 筛选过表达SIRT4的慢病毒U2OS和MG63稳定株筛选后，提取各组细胞总RNA并逆转录成cDNA，再通过q-PCR检测各组细胞中SIRT4 mRNA表达水平。

1.3.2 蛋白质印迹法检测SIRT4和Id1的蛋白的表达 筛选过表达SIRT4的慢病毒U2OS和MG63稳定株筛选后，提取各组细胞总蛋白，通过BCA法测定蛋白浓度并定量，再配制10% SDS-PAGE以分离目的蛋白。先用90 mV电压15~20 min电泳，后转130 mV电压30 min电泳分离蛋白，将分离后的蛋白用湿转法转移至PVDF膜上，封闭30 min后洗膜；然后加入SIRT4鼠抗人单克隆抗体（1∶40 000）、Id1（inhibitor of DNA binding 1）兔抗人单克隆抗体（1∶1 000）、β-actin单克隆抗体（1∶10 000），4 ℃反应过夜；回收一抗后，继续用TBST洗膜，随后加入山羊抗鼠抗原（1∶5 000）、山羊抗兔抗原（1∶5 000），室温反应2 h后TBST洗膜，最后ECL发光显影。采用ImageJ软件分析各组蛋白条带灰度值，目的蛋白的相对表达水平通过目的蛋白与β-actin的比值来表示。

1.3.3 细胞克隆形成实验、CCK-8、Edu555细胞增殖检测法以及裸鼠胫骨成瘤实验检测细胞的增殖能力

1.3.3.1 细胞克隆形成实验 细胞按5×10^2个/孔接种于6孔板，培养到大多数单个克隆细胞数目大于50%为止，克隆完成后用4%多聚甲醛固定20 min，PBS冲洗加入结晶紫染料，室温避光孵育20 min，最后PBS洗涤3次后拍照。

1.3.3.2 CCK-8法 取2组骨肉瘤细胞按2.5×10^3个/孔接种于96孔板，置于37 ℃、5%CO_2的孵箱中培养，于细胞贴壁0 h、24 h、48 h、72 h后，每孔加入10 μL CCK-8试剂，继续孵育1.5 h，最后用酶标仪检测450 nm波长处各孔的吸光度（absorbance，A）值。

1.3.3.3 Edu555细胞增殖检测法 细胞铺板48 h后进行检测，加入1×Edu工作液孵育3.5 h进行标记，PBS清洗后加入4%多聚甲醛固定30 min，去除固定液后PBS清洗，再用0.3%的Triton-X100通透15 min，后用PBS洗3次，再用Edu555工作液每个孔200 μL室温避光敷育30 min，然后PBS洗3次，DAP染色15 min后用PBS清洗，最后用抗荧光淬灭封片液进行封片，使用共聚焦显微镜进行图片拍摄。

1.3.3.4 裸鼠胫骨成瘤实验 将MG63 2组骨肉瘤细胞离心收集后计数，用无菌PBS重悬细胞将细胞浓度调整为2×10^7个/mL，用碘伏消毒后经裸鼠膝关节注射60 μL的细胞悬液至胫骨骨膜内，每周观察肿瘤大小，4周后处死裸鼠，分离肿块，拍照记录。

1.3.4 DAPI染色法、Annexin V-APC/7-AAD双染法检测细胞的凋亡

1.3.4.1 DAPI染色法 细胞贴壁24 h后进行染色，4%多聚甲醛固定30 min后，用PBS清洗，加入DAPI染料室温避光孵育，最后PBS洗涤3次，荧光显微镜下观察和拍照。

1.3.4.2 Annexin V-APC/7-AAD双染法 用不含EDTA的胰蛋白酶溶液消离心收集细胞沉淀，加入500 μL BlindBuffer轻轻吹匀成单细胞悬液，再加入5 μL AnnexinV-APC和5 μL 7-ADD染液，轻轻吹匀，室温避光染色10 min，最后进行流式细胞仪检测。

1.3.5 划痕法、Transwell检测细胞侵袭、迁移能力

1.3.5.1 划痕法 待细胞密度长到95%以上后用200 μL的Tip头垂直均匀用力划痕，PBS清洗后加入基础培养，在0 h、24 h、48 h后镜下观察细胞划痕愈合情况。划痕愈合率=（0 h划痕宽度-48 h划痕宽度）/0 h划痕宽度×100%

1.3.5.2 Transwell迁移实验 将细胞离心计数，调节浓度为1×10^5个/mL，然后在Transwell chamber上室中加入100 μL无血清细胞悬液，下室加入500 μL 10%血清的完全培养基，24 h加入4%多聚甲醛固定30 min，PBS清洗后加入结晶紫染色，最后PBS清洗后显微镜下观察拍照。

1.3.5.3 Transwell侵袭实验 Transwell chamber下室加入60 μL稀释基质胶，放入孵育箱中至基质胶凝固，将细胞离心计数，调节细胞浓度为1×10^5个/mL，后上室中加入100 μL无血清细胞悬液，在下室中加入500 μL 10%血清的完全培养基，24 h后PBS清洗，4%多聚甲醛固定30 min后用PBS清洗，加入结晶紫染色，最后PBS轻洗用棉签轻拭去上室细胞，显微镜下观察拍照。

1.3.6 流式细胞术检测细胞周期 加入胰酶（不含EDTA）消化收集细胞离心，用PBS洗涤后加入75%乙醇4 ℃固定24 h，PBS洗涤后离心，加入500 μL细胞周期试剂，振荡混匀，室温避光放置30 min，最后流式细胞仪检测细胞周期分布情况。

1.3.7 碱性磷酸酶染色、茜素红染色检测细胞成骨分化能力

1.3.7.1 ALP染色法 细胞用含4%FBS、10 mmol/L β-磷酸甘油、0.1 μmol/L地塞米松、0.1 g/mL VitC的成骨培养基处理2周后，4%多聚甲醛室温避光固定，再用碱性磷酸酶显色缓冲室温避光染色后拍照。

1.3.7.2 茜素红S染色法 细胞经过上述成骨培养基处理30 d后，4%多聚甲醛避光固定，再用茜素红S染液室温避光染色后拍照。

1.3.8 过表达SIRT4对骨肉瘤U2OS、MG63细胞能量代谢的影响

1.3.8.1 葡萄糖消耗量检测 细胞铺板24 h后每孔加入200 μL裂解液，将细胞刮下离心收集，取上清液待测，每个EP管中分别加入5 μL标准品和样品，再依次加入185 μL Glucose Assay Reagent，PCR仪上95 ℃ 8 min循环至4 ℃后，每管取180 μL液体至96孔板中，测定630 nm的A值，再用BCA试剂盒测样品的蛋白浓度，最后按照说明方法计算葡萄糖消耗量。

1.3.8.2 乳酸生成量检测 细胞铺板24 h后离心，300 W超声破碎收集上清液备用，EP管中分别加入20 μL的样品与标准品、1 mL的酶工作液和200 μL的显色剂混匀，37 ℃水浴箱反应10 min后加入2 mL终止液终止反应，每管吸出250 μL液体至洁净的96孔板中，测定530 nm的A值；再用BCA试剂盒测定样品的蛋白浓度，最后按照说明方法计算乳酸生成量。

1.3.8.3 ATP检测 细胞铺板24 h后离心收集上清液备用，在避光的96孔板中依次加入100 μL ATP检测工作液、20 μL样品和标准品混匀，用化学发光仪测定RLU值，再用BCA试剂盒测定样品的蛋白浓度，最后按照说明方法计算细胞中ATP含量。

1.3.8.4 线粒体膜电位检测 细胞铺板24 h加入稀释的TMRE染料敷育30 min，再加入1X的Hoechest敷育20 min后用PBS清洗，最后加入DMEM，用共聚焦显微镜拍照。

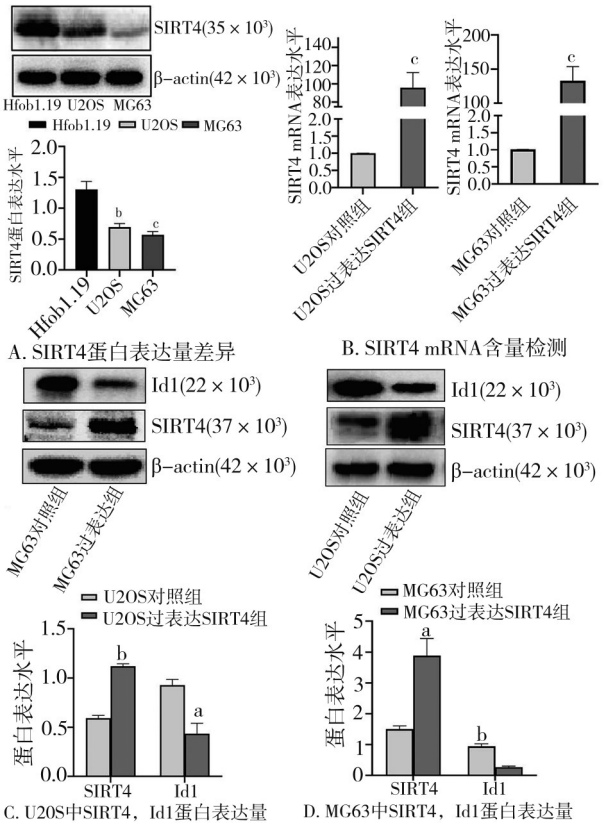
1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.4.1统计学软件进行分析，采用t检验或单因素方差分析。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 过表达SIRT4上调U2OS、MG63细胞中SIRT4的表达，抑制Id1的表达

Western blot检测结果显示SIRT4在骨肉瘤U2OS、MG63细胞中的表达均低于正常成骨细胞Hfob1.19（图1A）（P<0.01、P<0.001），故以U2OS、MG63细胞为研究对象，过表达SIRT4进行实验。实时荧光定量PCR检测结果（图1B）显示，与对照组相比，过表达SIRT4中U2OS、MG63细胞的SIRT4 mRNA表达水平明显升高（P<0.001）；Western blot检测结果（图1C、D）显示在过表达SIRT4的U2OS、MG63细胞的SIRT4蛋白表达水平升高（P<0.05）；Id1的蛋白表达水平降低（P<0.05）。这些结果表明，转染SIRT4过表达慢病毒后，可明显上调U2OS、MG63细胞中SIRT4的mRNA及蛋白表达水平，而上调的SIRT4则可以抑制Id1的表达。



注：a，与对照组比较，P < 0.05；b，与对照组比较，P < 0.01；c，与对照组比较，P < 0.001

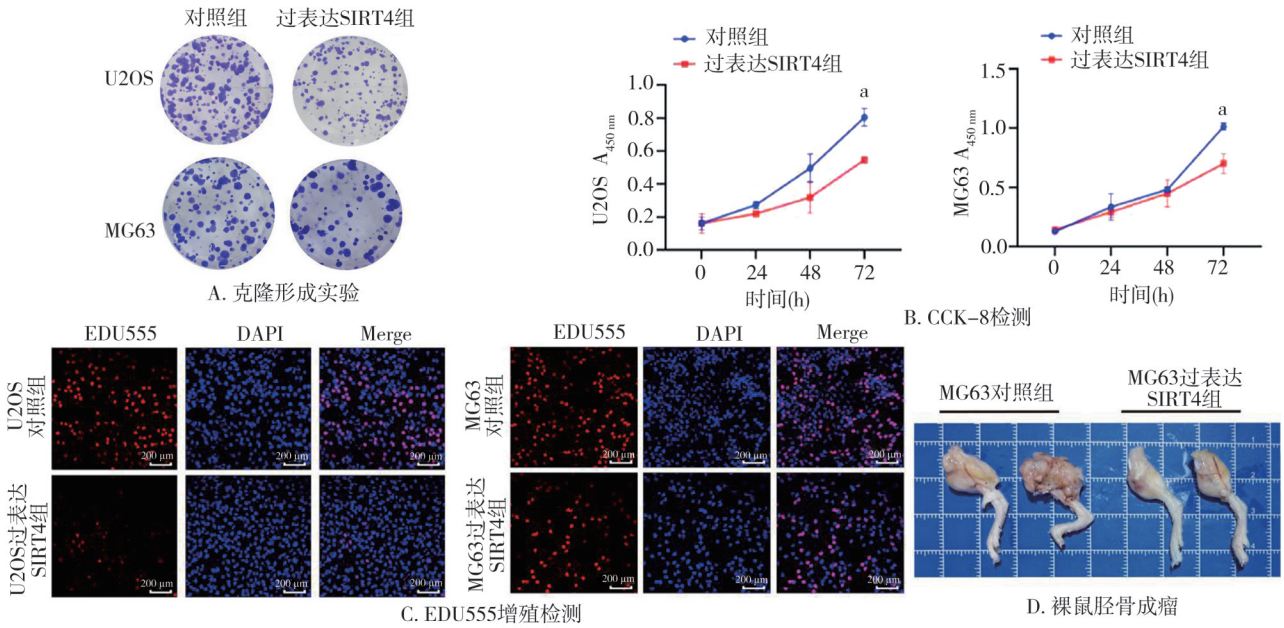
图1 SIRT4慢病毒转染前后mRNA及蛋白表达量检测

2.2 过表达SIRT4可抑制骨肉瘤U2OS、MG63细胞增殖

细胞克隆形成实验结晶紫染色结果（图2A）显示，过表达SIRT4组U2OS、MG63细胞克隆形成数较对照组减少；CCK-8结果（图2B）显示，在0 h、24 h、48 h时各处理组间$A_{450\,nm}$值无明显差异，在72 h时，过表达SIRT4组的$A_{450\,nm}$值明显小于对照组（P<0.01）；EDU染色（图2C）结果显示，过表达SIRT4组U2OS、MG63细胞增殖数较NC组明显减少；裸鼠胫骨成瘤（图2D）结果表明MG63过表达组细胞的瘤体明显小于对照组。以上表明过表达SIRT4可以抑制骨肉瘤U2OS、MG63细胞的增殖。

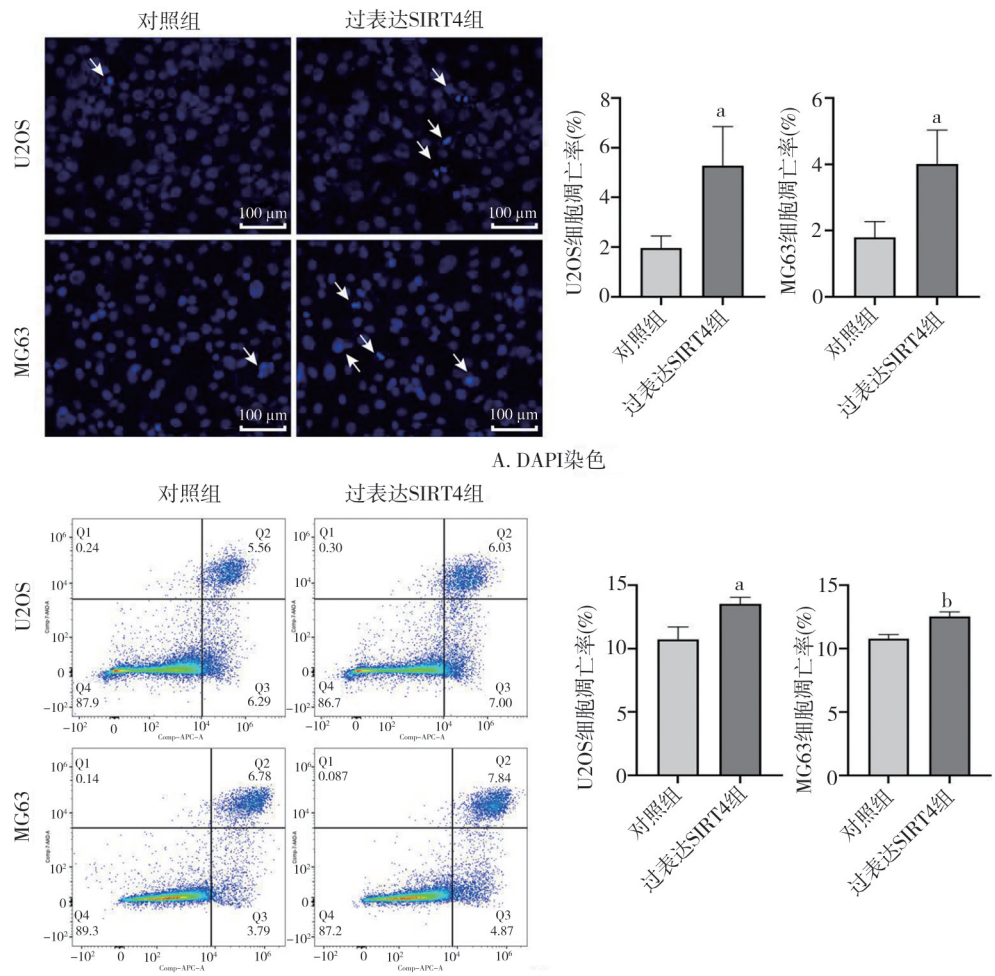
2.3 过表达SIRT4促进骨肉瘤U2OS、MG63细胞凋亡

DAPI染色（图3A）显示过表达SIRT4组U2OS、MG63细胞凋亡数目明显多于对照组（P<0.05）；Annexin V-APC/7-AAD双染法流式细胞术结果（图3B）显示，与对照组相比较，过表达SIRT4组细胞的凋亡率增高（P<0.05、P<0.01）。这些结果显示，过表达SIRT4促进骨肉瘤U2OS、MG63细胞的凋亡。



注：a，与对照组比较，$P<0.01$

图2　过表达SIRT4抑制U2OS、MG63增殖以及胫骨成瘤



注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与对照组比较，$P<0.01$

图3　过表达SIRT4促进U2OS、MG63凋亡

2.4　过表达SIRT4抑制骨肉瘤U2OS、MG63细胞的迁移能力

划痕实验（图4A）显示，划痕后24 h及48 h，过表达SIRT4组划痕愈合速度较NC组明显减慢，48 h过表达SIRT4组划痕愈合率明显低于NC组（$P<0.01$、$P<0.001$）；Transwell实验（图4B）显示，过表达SIRT4组细胞的穿膜数明显低于对照组细胞数。以上结果显示，过表达SIRT4能够抑制骨肉瘤U2OS、MG63细胞的迁移能力。

2.5　过表达SIRT4抑制骨肉瘤U2OS、MG63细胞的侵袭能力

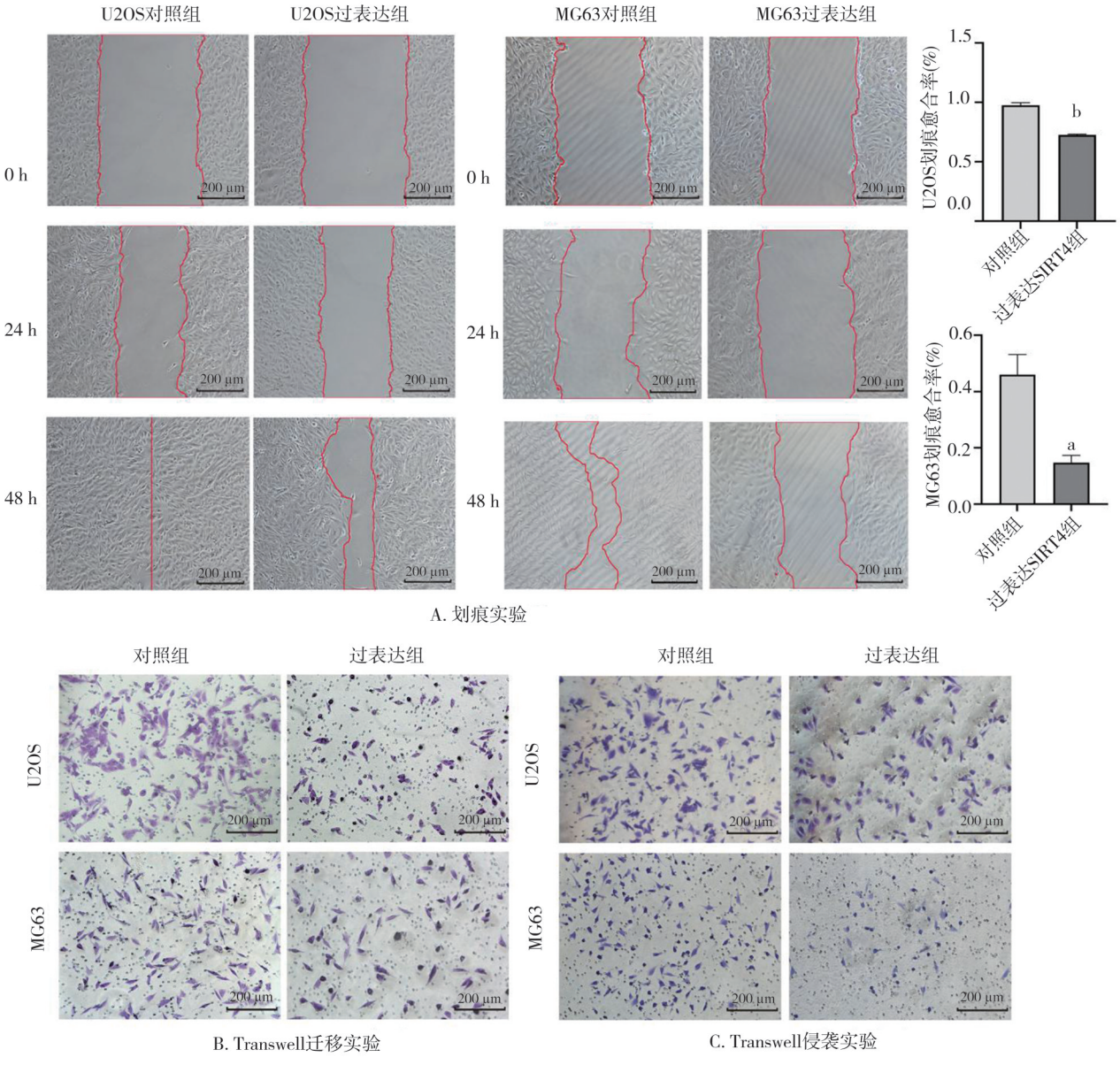
基质胶Transwell实验结果（图4C）显示，过表达组的穿膜细胞数明显低于对照组穿膜细胞数。结果提示，过表达SIRT4抑制骨肉瘤U2OS、MG63细胞的侵袭能力。

2.6　过表达SIRT4对骨肉瘤U2OS、MG63细胞周期的影响

流式细胞周期实验结果（图5）显示，过表达SIRT4组细胞的G_0/G_1期占比明显增多，S期占比明显减少（$P<0.01$、$P<0.001$）。这一结果提示，过表达SIRT4可以将细胞周期阻滞在G_1期影响细胞分裂，从而影响U2OS、MG63的增殖。

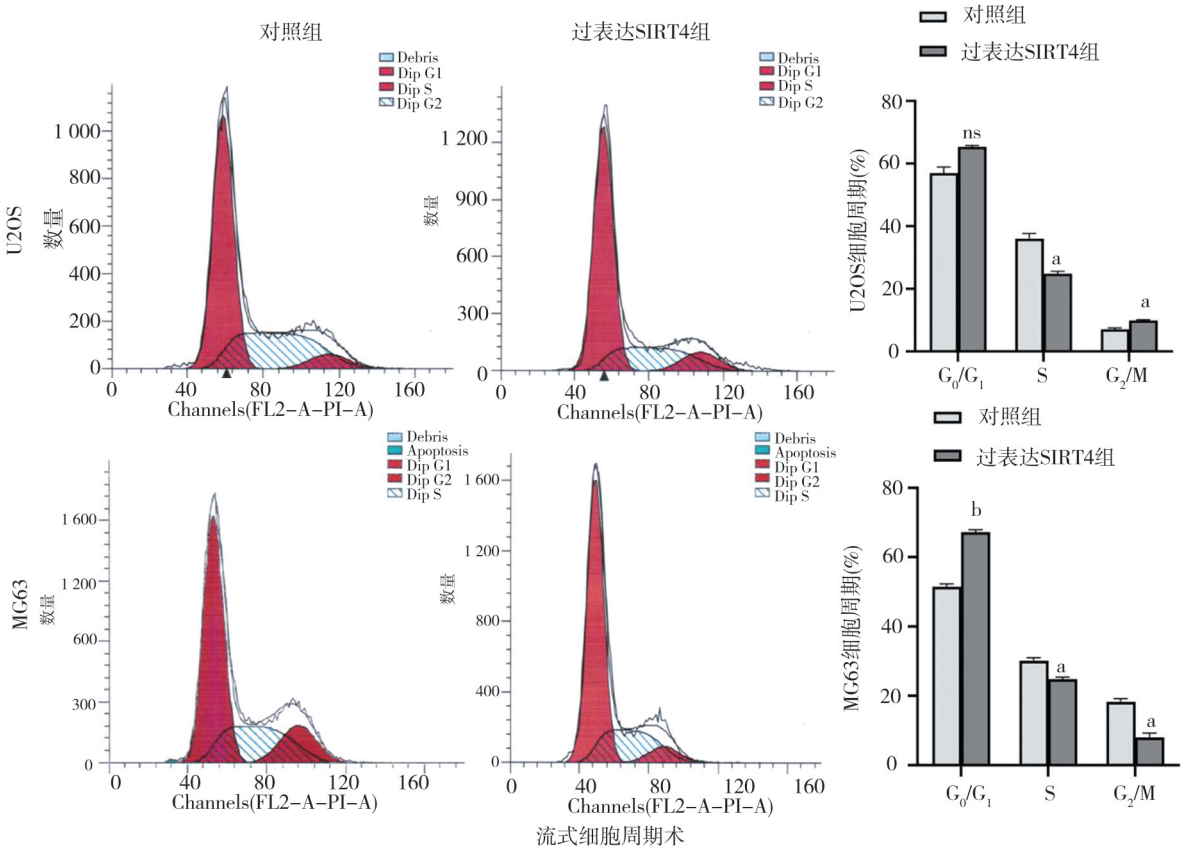
2.7　过表达SIRT4促进骨肉瘤U2OS、MG63细胞的成骨分化能力

碱性磷酸酶染色结果（图6A）显示，过表达SIRT4组染色较对照组阳性率明显上升；茜素红S染色结果（图6B）显示，过表达SIRT4组与对照组相比钙盐沉积明显增多。以上结果显示，过表达SIRT4能够促进骨肉瘤U2OS、MG63细胞的早期和晚期成骨分化。



注：与对照组比较，a，$P<0.01$，b，$P<0.001$

图4　过表达SIRT4抑制U2OS、MG63迁移、侵袭能力



注：a，与对照组比较，$P<0.01$；b，与对照组比较，$P<0.001$；ns，差异无统计学意义

图5　过表达SIRT4将U2OS、MG63细胞周期阻滞在G_0/G_1期

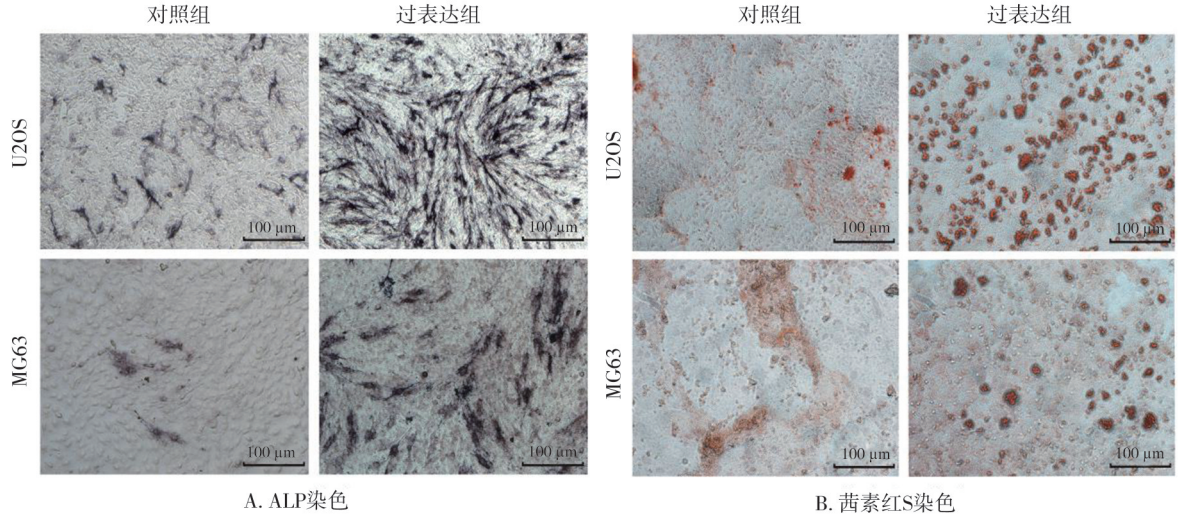
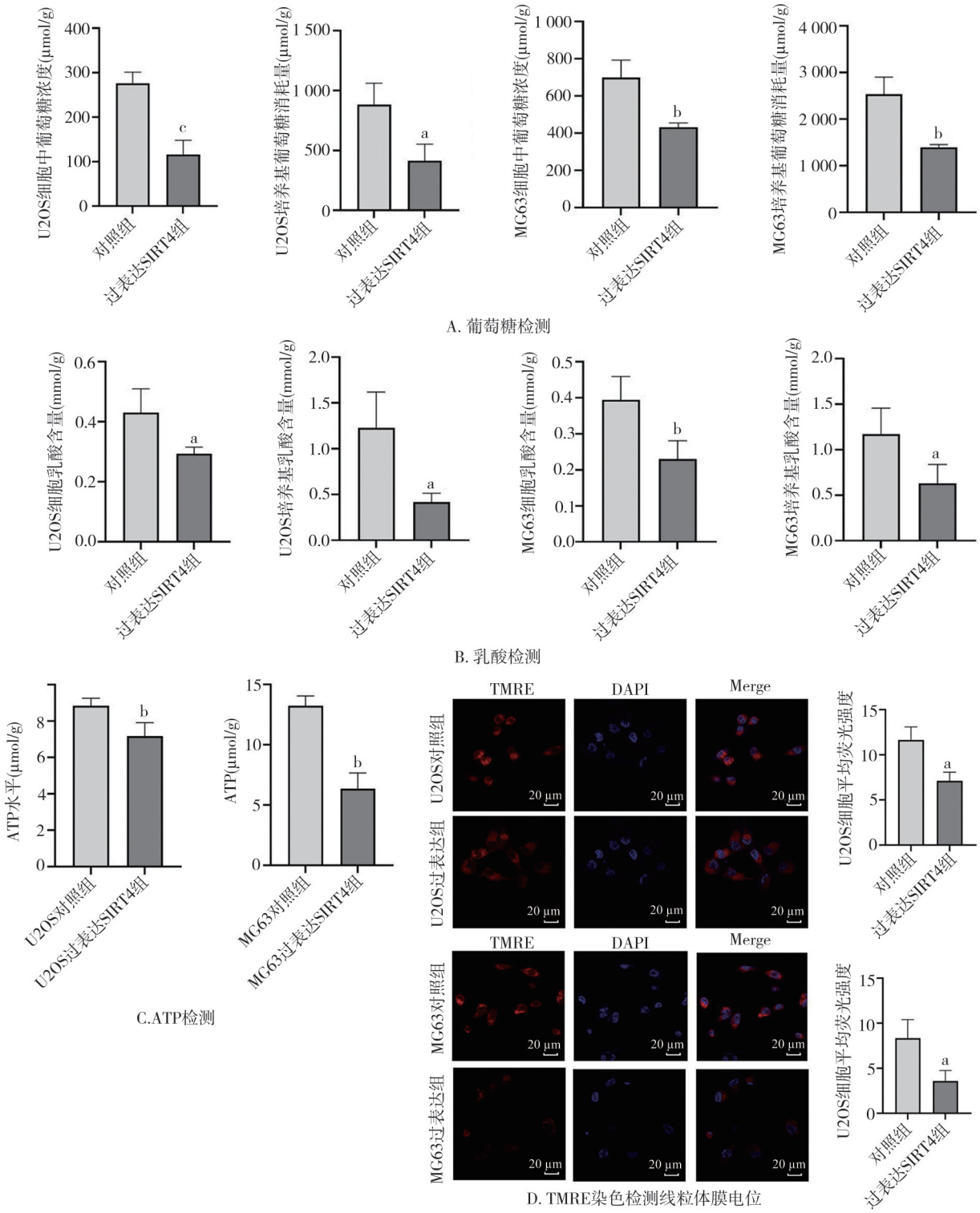


图6　过表达SIRT4促进U2OS、MG63细胞早期、晚期成骨分化

2.8　过表达SIRT4对骨肉瘤U2OS、MG63细胞能量代谢的影响

检测U2OS和MG63细胞的葡萄糖含量和培养基中的葡萄糖消耗量（图7A），证明过表达SIRT4组所消耗的葡萄糖较对照组减少（$P<0.05$、$P<0.01$、$P<0.001$）；检测U2OS和MG63细胞的乳酸含量和培养基中的乳酸含量（图7B），发现过表达SIRT4组所产生的乳酸较对照组减少（$P<0.05$、$P<0.01$）；检测U2OS和MG63细胞中的ATP（图7C），发现过表达SIRT4组产生的ATP较对照组更少（$P<0.01$）；通过TMRE染色检测线粒体膜电位（图7D），发现过表达SIRT4组的平均荧光强度较对照组更低（$P<0.05$）。以上结果提示，过表达SIRT4可能通过影响U2OS、MG63骨肉瘤细胞的能量代谢来逆转骨肉瘤的恶性生物学行为。



注：a，与对照组比较，$P<0.05$；b，与对照组比较，$P<0.01$；c，与对照组比较，$P<0.001$

图7　过表达SIRT4影响U2OS、MG63细胞能量代谢

3　讨　论

骨肉瘤是最常见的恶性骨肿瘤，多发于儿童和青少年[14]，最常见的原发部位是长骨（例如股骨远端）、胫骨近端和肱骨近端干骺端[15-17]。新辅助化疗的出现使得无远处转移骨肉瘤患者的5年生存率约70%，而伴随远处转移5年生存率则低至30%[18]。有研究指出能够通过抑制JAK2/STAT3和WNT/β-catenin信号通路抑制骨肉瘤生长和转移[19]；通过调节

JAK2/STAT3 信号通路抑制骨肉瘤的发展[20]；激活 STING/IRF3/IFN-β 通路诱导骨肉瘤的免疫浸润[21]。骨肉瘤的发生与发展是一个极其复杂的过程，因此发现骨肉瘤新的治疗靶点势在必行。

SIRT4 是一类高度保守的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD^+）依赖性蛋白去乙酰化酶，主要位于线粒体中，在线粒体代谢和其他过程中发挥作用，比如谷氨酸代谢和糖代谢[5]。最近大量的研究已经证实了 SIRT4 在肿瘤发生发展中的意义[22-24]；在胰腺癌、胰腺导管腺癌、肾母细胞瘤、伯基特淋巴瘤的研究中表明，SIRT4 可以抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭，促进凋亡，同时通过影响线粒体调节细胞的能量代谢[10,25-27]。与其他发现一致，本研究结果表明 SIRT4 可以抑制骨肉瘤细胞的增殖、迁移等恶性生物学行为，同时本研究发现骨肉瘤细胞过表达 SIRT4 后 Id1 被抑制；而本课题组前期发现敲低 Id1 可以逆转骨肉瘤细胞的恶性生物学行为[28]。SIRT4 可能通过抑制 Id1 逆转骨肉瘤细胞的恶性生物学行为并促进其成骨分化。Id1 又名分化抑制因子，它可以抑制细胞分化，促进细胞增殖，调节细胞周期等[29-30]；在结肠癌和肺细胞癌的研究中表明 Id1 促进肿瘤细胞增殖和淋巴结转移[31]，同时在肺细胞癌中敲低 Id1 影响糖酵解的关键酶[32]；所以 SIRT4 通过调节 Id1 影响骨肉瘤细胞的恶性生物学行为的具体机制还需进一步探索。

越来越多的研究表明，能量代谢与肿瘤细胞的发生与发展有着密切的关系。例如通过抑制丙酮酸脱氢酶激酶 1（PDK1）活性降低线粒体膜电位，促进肺癌细胞凋亡[33]；通过影响细胞的糖酵解可以抑制肝细胞癌的恶性进展[34]，以及通过抑制能量代谢联合抗肿瘤药物来发挥抗肿瘤作用[35]，并且近期有研究表明通过抑制骨肉瘤细胞的糖酵解可以抑制骨肉瘤的进展[36]；本研究发现过表达 SIRT4 后骨肉瘤细胞的葡萄糖的消耗和乳酸分泌减少。葡萄糖的消耗主要涉及糖酵解和三羧酸循环。有研究指出 SIRT4 可以抑制丙酮酸脱氢酶[37]，而丙酮酸脱氢酶是三羧酸循环中的关键酶，所以 SIRT4 可能通过抑制三羧酸循环来抑制骨肉瘤细胞的恶性生物学行为；因此本研究检测了骨肉瘤细胞的总 ATP 和线粒体膜电位，结果表明骨肉瘤细胞的总 ATP 含量和线粒体膜电位均降低。ATP 主要通过糖酵解和三羧酸循环产生，线粒体是 ATP 主要产生部位，本研究结果中线粒体膜电位与 ATP 检测结果一致。本研究结果表明过表达 SIRT4 可以影响人骨肉瘤细胞的能量代谢，而 SIRT4 是否通过抑制 Id1 调节骨肉瘤细胞的能量代谢影响恶性生物学行为有待进一步研究。

综上所述，过表达 SIRT4 抑制骨肉瘤细胞增殖、迁移和侵袭，抑制骨肉瘤细胞体内成瘤能力，促进骨肉瘤细胞凋亡及早晚期成骨分化，调节骨肉瘤细胞能量代谢。而 SIRT4 能否通过抑制 Id1 调节骨肉瘤细胞的能量代谢进而影响恶性生物学行为还需进一步研究，从而为骨肉瘤的治疗提供新的思路和方法。

参 考 文 献

[1] Cho WH, Song WS, Jeon DG, et al. Differential presentations, clinical courses, and survivals of osteosarcomas of the proximal humerus over other extremity locations[J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(3): 702-708.

[2] Cole S, Gianferante DM, Zhu B, et al. Osteosarcoma: a Surveillance, Epidemiology, and End Results program-based analysis from 1975 to 2017[J]. Cancer, 2022, 128(11): 2107-2118.

[3] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.

[4] Zhu YM, Yan YF, Principe DR, et al. SIRT3 and SIRT4 are mitochondrial tumor suppressor proteins that connect mitochondrial metabolism and carcinogenesis[J]. Cancer Metab, 2014, 2: 15.

[5] Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells[J]. Cell, 2006, 126(5): 941-954.

[6] Laurent G, German NJ, Saha AK, et al. SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase[J]. Mol Cell, 2013, 50(5): 686-698.

[7] Huang GY, Cheng J, Yu FD, et al. Clinical and therapeutic significance of sirtuin-4 expression in colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2016, 35(5): 2801-2810.

[8] Jeong SM, Xiao CY, Finley LW, et al. SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism[J]. Cancer Cell, 2013, 23(4): 450-463.

[9] Wan W, Li YN, Zhou CY, et al. SIRT4 expression in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Pharmazie, 2020, 75(12): 646-650.

[10] Jeong SM, Lee AN, Lee J, et al. SIRT4 protein suppresses tumor formation in genetic models of Myc-induced B cell lymphoma[J]. J Biol Chem, 2014, 289(7): 4135-4144.

[11] Cai GH, Ge ZH, Xu YQ, et al. SIRT4 functions as a tumor sup-

pressor during prostate cancer by inducing apoptosis and inhibiting glutamine metabolism[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 12208.

[12] Zhu YY, Wang GY, Li XB, et al. Knockout of SIRT4 decreases chemosensitivity to 5-FU in colorectal cancer cells[J]. Oncol Lett, 2018, 16(2): 1675-1681.

[13] Xing JL, Li J, Fu L, et al. SIRT4 enhances the sensitivity of ER-positive breast cancer to tamoxifen by inhibiting the IL-6/STAT3 signal pathway[J]. Cancer Med, 2019, 8(16): 7086-7097.

[14] Delgrosso E, Scocozza F, Cansolino L, et al. 3D bioprinted osteosarcoma model for experimental boron neutron capture therapy (BNCT) applications: preliminary assessment[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2023, 111(8): 1571-1580.

[15] Brown HK, Schiavone K, Gouin F, et al. Biology of bone sarcomas and new therapeuticdevelopments[J]. Calcif Tissue Int, 2018, 102(2): 174-195.

[16] Dong ZH, Liao ZP, He YL, et al. Advances in the biological functions and mechanisms of miRNAs in the development of osteosarcoma [J]. Technol Cancer Res Treat, 2022, 21: 15330338221117386.

[17] Xie DL, Wang ZQ, Li J, et al. Targeted delivery of chemotherapeutic agents for osteosarcoma treatment[J]. Front Oncol, 2022, 12: 843345.

[18] Panez-Toro I, Muñoz-García J, Vargas-Franco JW, et al. Advances in osteosarcoma[J]. Curr Osteoporos Rep, 2023, 21(4): 330-343.

[19] Huang H, Han Y, Chen ZJ, et al. ML264 inhibits osteosarcoma growth and metastasis via inhibition of JAK2/STAT3 and WNT/β-catenin signalling pathways[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(10): 5652-5664.

[20] Zhu WT, Zeng XF, Yang H, et al. Resveratrol loaded by folate-modified liposomes inhibits osteosarcoma growth and lung metastasis via regulating JAK2/STAT3 pathway[J]. Int J Nanomed, 2023, 18: 2677-2691.

[21] Wu W, Zhang ZH, Jing DD, et al. SGLT2 inhibitor activates the STING/IRF3/IFN-β pathway and induces immune infiltration in osteosarcoma[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(6): 523.

[22] Zhao S, Wang JM, Yan J, et al. BAG3 promotes autophagy and glutaminolysis via stabilizing glutaminase[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(4): 284.

[23] Yalçın GD, Colak M. SIRT4 prevents excitotoxicity via modulating glutamate metabolism in glioma cells[J]. Hum Exp Toxicol, 2020, 39(7): 938-947.

[24] Cui Y, Bai YB, Yang JN, et al. SIRT4 is the molecular switch mediating cellular proliferation in colorectal cancer through GLS mediated activation of AKT/GSK3β/CyclinD1 pathway[J]. Carcinogenesis, 2021, 42(3): 481-492.

[25] Hu QS, Qin Y, Ji SR, et al. UHRF1 promotes aerobic glycolysis and proliferation via suppression of SIRT4 in pancreatic cancer[J]. Cancer Lett, 2019, 452: 226-236.

[26] Ping DN, Pu XF, Ding GP, et al. Sirtuin4 impacts mitochondrial homeostasis in pancreatic cancer cells by reducing the stability of AlkB homolog 1 via deacetylation of the HRD1-SEL1L complex[J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2023, 1866(2): 194941.

[27] Wang YM, Guo YM, Gao JZ, et al. Tumor-suppressive function of SIRT4 in neuroblastoma through mitochondrial damage[J]. Cancer Manag Res, 2018, 10: 5591-5603.

[28] 仇 超, 康 权, 迭小红, 等. Id1基因对人骨肉瘤细胞恶性逆转向成骨分化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(4): 344-349.
Qiu C, Kang Q, Die XH, et al. Effect of Id1 gene on reversing malignant biological behaviors and inducing osteogenic differentiation of human osteosarcoma cells[J]. J Third Mil Med Univ, 2016, 38(4): 344-349.

[29] Roschger C, Cabrele C. The Id-protein family in developmental and cancer-associated pathways[J]. Cell Commun Signal, 2017, 15(1): 7.

[30] Singh SK, Singh S, Gadomski S, et al. Id1 ablation protects hematopoietic stem cells from stress-induced exhaustion and aging[J]. Cell Stem Cell, 2018, 23(2): 252-265.

[31] Lin ZK, Liu Y, Xu T, et al. STAT3-mediated promoter-enhancer interaction up-regulates inhibitor of DNA binding 1 (*ID1*) to promote colon cancer progression[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(12): 10041.

[32] Sharma BK, Kolhe R, Black SM, et al. Inhibitor of differentiation 1 transcription factor promotes metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma cells[J]. FASEB J, 2016, 30(1): 262-275.

[33] Xu X, Hou YQ, Lin SM, et al. Sodium selenite inhibits proliferation of lung cancer cells by inhibiting NF-κB nuclear translocation and down-regulating PDK1 expression which is a key enzyme in energy metabolism expression[J]. J Trace Elem Med Biol, 2023, 78: 127147.

[34] Xing BY, Shen CY, Yang QL, et al. miR-144-3p represses hepatocellular carcinoma progression by affecting cell aerobic glycolysis via FOXK1[J]. Int J Exp Pathol, 2023, 104(3): 117-127.

[35] Kimura K, Chun JH, Lin YL, et al. *Tetra*-O-methyl-nordihydroguaiaretic acid inhibits energy metabolism and synergistically induces anticancer effects with temozolomide on LN229 glioblastoma tumors implanted in mice while preventing obesity in normal mice that consume high-fat diets[J]. PLoS One, 2023, 18(5): e0285536.

[36] Weng YP, Duan WH, Yu XC, et al. MicroRNA-324-3p inhibits osteosarcoma progression by suppressing PGAM1-mediated aerobic glycolysis[J]. Cancer Sci, 2023, 114(6): 2345-2359.

[37] Mathias RA, Greco TM, Oberstein A, et al. Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity[J]. Cell, 2014, 159(7): 1615-1625.

（责任编辑：李青颖）