网络出版时间:2023-11-30 10:55:40 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231129.1026.009

低氧条件下 SIRT3 调控 ROS 介导的氧化应激反应 对肺癌细胞凋亡的影响

黄 波^{1,2},丁 洁¹,郭红荣¹,王红娟¹,徐建群¹,郑 泉¹

摘要 目的 探讨低氧条件下去乙酰化酶 3(SIRT3) 通过活 性氧(ROS)对肺癌细胞氧化应激反应和低氧诱导因子 1α (HIF-1α)表达的影响及其机制。方法 将人非小细胞肺癌 A549 细胞暴露于低氧条件下培养 0、12、24、48 h; RT-PCR 和 Western blot 检测细胞中 HIF-1 a和 SIRT3 mRNA 和蛋白的表 达,确定最佳低氧诱导时间。将 A549 细胞分成 5 组:对照 组、低氧组、低氧 + ROS 抑制剂 N-乙酰半胱胺酸(NAC)组、 低氧 + SIRT3 过表达(SIRT3-OE)组和低氧 + SIRT3-OE + NAC 组; MTT 法检测细胞增殖情况; 流式细胞术检测细胞凋 亡情况;RT-PCR 和 Western blot 法检测各组细胞中 HIF-1α 和 SIRT3 mRNA 和蛋白的表达;流式细胞术检测各组细胞中 ROS含量;生化试剂盒检测各组细胞中丙二醛(MDA)、超氧 化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽(GSH)的含量。结果 最佳 低氧诱导时间为24 h。与对照组相比,低氧组细胞凋亡率、 细胞中 SIRT3 mRNA 和蛋白水平、SOD 和 GSH 含量均降低 (P<0.01),细胞增殖能力、细胞中 HIF-1α mRNA 和蛋白水 平、ROS 和 MDA 含量均升高(P < 0.01); 与低氧组相比,低 氧 + NAC 组和低氧 + SIRT3-OE 组细胞凋亡率、细胞中 SIRT3 mRNA 和蛋白水平、SOD 和 GSH 含量均升高(P < 0.05),细胞增殖能力、细胞中 HIF-1α mRNA 和蛋白水平、 ROS 和 MDA 含量均降低(P < 0.05);与低氧 + NAC 组相比, 低氧 + SIRT3-OE + NAC 组细胞凋亡率、细胞中 SIRT3 mRNA 和蛋白水平、SOD和GSH含量均升高(P<0.01),细胞增殖 能力、细胞中 HIF-1α mRNA 和蛋白水平、ROS 和 MDA 含量 均降低(P<0.01)。结论 低氧条件下 SIRT3 能够通过介 导 ROS 抑制肺癌细胞中的氧化应激反应和 HIF-1α 的表达 来促进细胞凋亡,抑制肺癌进展。

关键词 去乙酰化酶 3;肺癌;氧化应激;活性氧;低氧诱导 因子 1α

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)12-2045-07

- 基金项目:湖北省卫健委科研项目基金(编号:WJ2021F005);武汉市 卫健委医学科研项目基金(编号:WX21Q43);武汉中青年 医学骨干人才培养工程(编号:武卫通[2019]87号)
- 作者单位:¹武汉市第三医院/武汉大学附属同仁医院,武汉 430074 ²武汉东湖新技术开发区九峰街中心城社区卫生服务中 心,武汉 430070
- 作者简介:黄 波,男,副主任医师,责任作者,E-mail: doctorhuang82 @ 126. com

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2023.12.009

肺癌是全球最常见的癌症之一,发病率和病死 率高[1]。低氧是肿瘤快速生长中过量氧消耗和血 管供应不足所导致的重要肿瘤微环境特征^[2]。低 氧诱导因子-1α(hypoxia inducible factor-1α, HIF-1α)的表达是低氧的标志,HIF-1α可通过调节肿瘤 细胞的血管生成和细胞周期进程等促进肿瘤进 展^[3]。去乙酰化酶 3(sirtuin 3, SIRT3) 被证实在非 小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组 织中高表达,与 NSCLC 的发生发展相关^[4]。有文 献^[5]报道 SIRT3 可通过抑制线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成抑制 HIF-1α 和肿瘤生 长,但在低氧条件下 SIRT3 是否可以通过调节 ROS 的生成从而影响肺癌细胞中的氧化应激和 HIF-1α 表达,目前尚未见报道。因此,该研究旨在探讨低氧 条件下 SIRT3 通过 ROS 对肺癌细胞中的氧化应激 反应和 HIF-1α 表达的影响及其机制,为肺癌的靶向 治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人非小细胞肺癌 A549 细胞购于 中国科学院上海细胞库。ROS 抑制剂 N-乙酰半胱 胺酸(n-acetylcysteine, NAC)(货号:HY-B0215)购 于美国 MCE 公司, F12K 培养基(货号: 21127-022) 购于美国 Gibco 公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒、 RIPA 细胞裂解液、MTT (货号: PC0020、R0010、 M1025)购于北京索莱宝科技有限公司,一抗 SIRT3、HIF-1a、GAPDH 和 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(货号: PAB35180、PAB37598、PAB36269、 SAB43714)购于武汉贝茵莱生物科技有限公司, SYBR FAST qPCR Master Mix(货号:KM4101)购于 美国 KAPA Biosystems 公司, TRIzol (货号: 15596026)购于美国 ambion 公司,逆转录试剂盒(货 号:6210A)购于日本 TAKARA 公司, DMSO(货号: D2650)购于美国 SIGMA 公司, AnnexinV-PE/7 AAD 凋亡检测试剂盒(货号:559763)购于美国 BD 公司,

²⁰²³⁻¹⁰⁻¹⁷ 接收

ROS 检测试剂盒(含 ROS 荧光探针 2',7'-二氯二氢 荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)(货号:S0033)购于上海碧云天 生物技术有限公司,丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(super oxide dimutese, SOD)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒(货号:A003-1-2、A001-3-2、A006-2-1)购于南京建成生物工程研究所。311型 CO₂ 恒温培养箱购自美国 Thermo 公司,AMR-100 酶标仪购自杭州奥盛仪器有限公司,NovoCyte 流式细胞仪购自美国 ACEA 公司, CFX-Connect 96 荧光定量 PCR 仪、mini protean 3 cell 电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及低氧细胞模型的构建 A549 细胞用含 10% 胎牛血清的 F12K 培养基培置于 37 ℃、 5% CO₂ 的培养箱中培养。细胞融合度达到 80% 以 上时,胰酶消化细胞,按 1:2 的比例传代培养。取 对数生长期的细胞接种至 6 孔板中,5×10⁵ 个细 胞/孔,每孔 2 ml,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。将细胞暴露于低氧(5%~8% O₂)条件下培养 0、12、24、48 h, RT-PCR 和 Western blot 检测低氧条 件下不同培养时间细胞中 HIF-1α 和 SIRT3 mRNA 和蛋白的表达,由此确定最佳低氧诱导时间。

1.2.2 构建 SIRT3 过表达慢病毒载体和稳转株 根据 SIRT3 的序列构建过表达慢病毒载体,转染至 肺癌细胞中,并筛选获得稳转株,以未转染的细胞和 转染空载的细胞为对照,RT-PCR 检测细胞中 SIRT3 mRNA 的表达,验证转染效率,显示慢病毒转染和稳 转株构建成功。

1.2.3 细胞分组及处理 将 A549 细胞分成 5 组: 对照组、低氧组、低氧 + ROS 抑制剂 NAC 组、低氧 + SIRT3 过表达(SIRT3 overexpression, SIRT3-OE)组 和低氧 + SIRT3-OE + NAC 组。对照组细胞正常培 养;低氧组细胞暴露于低氧条件下培养 24 h;低氧 + NAC 组先用 20 mmol/L 的 NAC 诱导 24 h^[6],再暴露 于低氧条件下培养 24 h;低氧 + SIRT3-OE 组将 SIRT3 过表达慢病毒细胞稳转株在低氧条件下培养 24 h;低氧 + SIRT3-OE + NAC 组将 SIRT3 过表达慢 病毒细胞稳转株用 20 mmol/L 的 NAC 诱导 24 h,于 低氧条件下培养 24 h。处理完成后,取出细胞培养 板,加入 MTT 溶液,培养 4 h 后吸去上清液,加入 DMSO 溶解液,摇床低速振荡 10 min,结晶物充分溶 解后酶标仪检测 490 nm 处的吸光度值,以检测细胞 增殖情况。 1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 收集细胞,加入 预冷的 PBS 洗涤, PBS 重悬细胞,加入 10 μl Annexin V-FITC 和 7 AAD,混匀,4 ℃避光孵育 30 min,加入 PBS,上流式细胞仪检测。

1.2.5 RT-PCR 和 Western blot 法检测细胞中 HIF-1α和 SIRT3 mRNA 和蛋白的表达 收集细胞, TR-Izol 法提取细胞总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 进行 PCR 扩增, 引物序列表见表 1。以 GAPDH 为内参, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。提取细胞总 蛋白, BCA 法进行蛋白质定量, 上样电泳, 湿转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭, 加入一抗稀释液 (1:1000)室温孵育1h, 洗膜3次, 加入二抗稀释 液(1:20000)室温孵育1h, 洗膜3次, ECL 显影, TANON GIS 软件读取条带灰度值, 目的蛋白与内参 蛋白的比值即为目的蛋白的相对表达量。

表1 引物序列表

	-00 2 51 (07) 53-00	
基因名称	引物序列(5'-3')	
HIF-1a	F:TGCTTGGTGCTGATTTGTG	
	R:TGTCCTGTGGTGACTTGTCC	
SIRT3	F:AAGCCCAACGTCACTCAC	
	R:GCTCCCCAAAGAACACAA	
GAPDH	F:GGGAAACTGTGGCGTGAT	
	R:GAGTGGGTGTCGCTGTTGA	

1.2.6 流式细胞术检测细胞中 ROS 含量 用无血 清培养液稀释 DCFH-DA,使终浓度为 10 μmol/L。 收集 1.2.3 项各组细胞悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中,置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中孵育 20 min,待 DCFH-DA 和细胞充分接触后用无血清细胞培养液 洗涤细胞,PBS 重悬,上流式细胞仪检测。

1.2.7 生化试剂盒检测细胞中 MDA、SOD 和 GSH 的含量 收集 1.2.3 项各组细胞上清液,严格按照 试剂盒说明书步骤检测 MDA、SOD 和 GSH 的含量。 1.3 统计学处理 用 GraphPad Prism 8.0 进行统 计学分析,计量数据以平均值±标准差(x±s)表示, 多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采 用 LSD-t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧暴露不同时间对 **A549** 细胞中 **HIF-1**α和 **SIRT3 mRNA** 和蛋白表达的影响 与 0 h 相比,低 氧暴露 12 h 细胞中 HIF-1α mRNA 水平变化差异无 统计学意义(*t* = -1.78, *P*>0.05), HIF-1α 蛋白水 平升高(*t* = -5.36, *P*<0.01), SIRT3 mRNA 和蛋

· 2047 ·

自水平均降低($t_{mRNA} = -6.38$, $t_{\pm f_{\pm}} = 5.81$, 均 P < 0.01);低氧暴露 24 h 和 48 h 细胞中 HIF-1 α mRNA 和蛋白水平均升高($t_{mRNA(24 h)} = -6.92$, $t_{mRNA(48 h)} = -12.47$, $t_{\pm f_{\pm}(24 h)} = -7.51$, $t_{\pm f_{\pm}(48 h)} = -11.11$, 均 P < 0.01), SIRT3 mRNA 和 蛋白水平均降低($t_{mRNA(24 h)} = 10.95$, $t_{mRNA(48 h)} = 13.76$, $t_{\pm f_{\pm}(24 h)} = 11.95$, $t_{\pm f_{\pm}(48 h)} = 17.63$, 均 P < 0.01)。见图 1。因此最终确定最佳低氧诱导时间为 24 h。

2.2 低氧条件下过表达 SIRT3 对 A549 细胞增殖 的影响 与对照组(0.90±0.02)相比,低氧组 (1.26±0.02)细胞增殖能力升高(t = -16.28, P < 0.01);与低氧组比较,低氧 + NAC 组(0.88±0.03) 和低氧 + SIRT3-OE 组(0.97±0.01)细胞增殖能力 均降低($t_{\text{K}\ensuremath{\P}\ensuremath{\P}\ensuremath{NAC}\ensuremath{\P}\ensuremath{\Pi}\e$

2.3 低氧条件下过表达 SIRT3 对 A549 细胞凋亡的影响 与对照组(8.59% ±0.51%)相比,低氧组(3.98% ±0.33%)细胞凋亡率降低(t = 3.45, P < 0.05);与低氧组比较,低氧 + NAC 组(15.50% ± 1.04%)和低氧 + SIRT3-OE 组(16.55% ±0.43%) 细胞 凋 亡 率 均 升 高 (t_{低氧+NAC组} = -8.62, t_{低氧+SIRT3-OE组} = -9.41,均P < 0.01);与低氧 + NAC 组相比,低氧 + SIRT3-OE + NAC 组(25.90% ± 3.43%)细胞凋亡率升高(t = -7.78, P < 0.01)。见图 3。

2.4 低氧条件下过表达 SIRT3 对 A549 细胞中 HIF-1α表达的影响 与对照组相比,低氧组细胞中

HIF-1α mRNA 和蛋白表达水平升高(t_{mRNA} = -14.32, $t_{蛋白} = -20.21$, 均 P < 0.01), SIRT3 mR-NA 和蛋白表达水平降低(*t*_{mRNA} = 22.89, *t*_{蛋白} = 16.41, 均 P < 0.01); 与低氧组相比, 低氧 + NAC 组 和低氧 + SIRT3-OE 组细胞中 HIF-1α mRNA 和蛋白 表达水平降低(*t*_{mRNA(低氧+NAC组)} = - 7.21, $t_{\text{mRNA}(\text{Kmmmax} + \text{SIRT3-OE4})} = 8.44, t_{\text{Kmmmax} + \text{NAC4}} = 5.60,$ $t_{\text{蛋白}(\text{Ksq+SIRT3-OE}_{\pm})} = 9.00, 均 P < 0.01)$, SIRT3 mRNA 和蛋白表达水平升高($t_{mRNA(K_{a}+NAC_{a})}$ = -4.49, $t_{\text{mRNA}(\text{Kmm} + \text{SIRT3-OE}4)} = - 5.34, t_{\text{Kmm} + \text{NAC}4} =$ -6.21, $t_{\text{GE}(\text{KS}_{+} + \text{SIRT3-OE}_{4})} = -9.08$, $\square P < 0.01$); 与低氧 + NAC 组相比,低氧 + SIRT3-OE + NAC 组细 胞中 HIF-1 α mRNA 和蛋白表达水平降低(t_{mRNA} = 5.70, *t*_{蛋白} = 7.65, 均 *P* < 0.01), SIRT3 mRNA 和蛋 白表达水平升高($t_{mRNA} = -8.20$, $t_{gen} = -8.57$, 均 *P* < 0.01)。见图4。

2.5 低氧条件下过表达 SIRT3 对 A549 细胞中 ROS 含量的影响 与对照组(5.80% ±1.85%)相 比,低氧组(47.43% ±4.01%)细胞中 ROS 含量升 高(t = -18.67, P < 0.01);与低氧组相比,低氧 + NAC 组(35.77% ±2.58%)和低氧 + SIRT3-OE 组 (29.67% ±1.57%)细胞中 ROS 含量均降低 ($t_{$ ($t_{$ ($x_{$ ($x_{}+NAC$)</sub>]} = 5.23, $t_{$ ($x_{}=x_{}+SIRT3-OE$)]] = 7.96,均 P < 0.01);与低氧 + NAC 组相比,低氧 + SIRT3-OE + NAC 组(19.80% ±2.95%)细胞中 ROS 含量降低(t = 7.16, P < 0.01)。见图 5。

2.6 低氧条件下过表达 SIRT3 对 A549 细胞中
 MDA、SOD 和 GSH 含量的影响 与对照组相比,
 低氧组细胞中 MDA 含量升高(t = -18.44, P < C



 0 h
 12 h
 24 h
 48 h
 ku

 HIF-1α
 110
 110

 SIRT3
 28

 GAPDH
 36

图 1 低氧暴露不同时间细胞中 HIF-1α和 SIRT3 mRNA 和蛋白表达水平的比较

A: RT-PCR 检测 HIF-1α mRNA 的表 达; B: RT-PCR 检测 SIRT3 mRNA 的表达; C: Western blot 检测 HIF-1α 和 SIRT3 蛋白 表达条带图; D: 各组细胞中 HIF-1α 蛋白表 达水平的比较; E: 各组细胞中 SIRT3 蛋白 表达水平的比较; 与 0 h 比较: ** P < 0.01



图 2 各组细胞增殖能力的比较

a:对照组;b:低氧组;c:低氧 + NAC 组;d:低氧 + SIRT3-OE 组; e:低氧 + SIRT3-OE + NAC 组;与对照组比较:**P < 0.01;与低氧组 比较:^{##}P < 0.01;与低氧 + NAC 组比较:[△]P < 0.01 0.01),SOD 和 GSH 含量降低($t_{SOD} = 14.79$, $t_{GSH} = 20.94$, 均 P < 0.01);与低氧组相比,低氧 + NAC 组 和低氧 + SIRT3-OE 组细胞中 MDA 含量降低($t_{Kq+NAC41} = 7.62$, $t_{Kq+SIRT3-OE41} = 11.74$, 均 P < 0.01), SOD ($t_{Kq+NAC41} = -6.44$, $t_{Kq+SIRT3-OE41} = -8.65$, 均 P < 0.01)和 GSH 含量升高($t_{Kq+NAC41} = -7.19$, $t_{Kq+SIRT3-OE41} = -12.76$,均 P < 0.01);与低氧 + NAC 组相比,低氧 + SIRT3-OE + NAC 组细胞中 MDA 含量降低(t = 9.37, P < 0.01), SOD 和 GSH 含量升高($t_{Kq} = -10.14$,均 P < 0.01)。见图 6。



a: 对照组; b: 低氧组; c: 低氧 + NAC 组; d: 低氧 + SIRT3-OE 组; e: 低氧 + SIRT3-OE + NAC 组; 与对照组比较: * P < 0.05; 与低氧组比较: #P < 0.01; 与低氧 + NAC 组比较: ^{△△}P < 0.01

e

e

d



 $\begin{array}{c} C \\ \text{HIF-1}\alpha \end{array} \begin{array}{c} a & b & c & d & e \\ \text{HIF-1}\alpha \end{array} \begin{array}{c} 110 \\ \text{SIRT3} \end{array} \begin{array}{c} 28 \\ \text{GAPDH} \end{array} \begin{array}{c} 28 \\ 36 \end{array}$

图 4 各组细胞中 HIF-1 α 和 SIRT3 的 mRNA 和蛋白表达水平的比较

A:RT-PCR 检测 HIF-1α mRNA 的表达; B: RT-PCR 检测 SIRT3 mRNA 的表达; C:Western blot 检测 HIF-1α和 SIRT3 蛋白表达条带图; D:各组细 胞中 HIF-1α 蛋白表达水平的比较; E:各组细胞 中 SIRT3 蛋白表达水平的比较; a:对照组; b:低氧 组; c:低氧 + NAC 组; d:低氧 + SIRT3-OE 组; e:低 氧 + SIRT3-OE + NAC 组; 与对照组比较: ** P <0.01; 与低氧组比较: ** P <0.01; 与低氧 + NAC 组 比较: ^{ΔΔ}P <0.01



图 5 各组细胞中 ROS 含量的比较

a:对照组;b:低氧组;c:低氧 + NAC 组;d:低氧 + SIRT3-OE 组;e:低氧 + SIRT3-OE + NAC 组;与对照组比较:^{**} P < 0.01;与低氧组比较:^{##}P < 0.01;与低氧 + NAC 组比较:^{△△}P < 0.01



图 6 各组细胞中 MDA、SOD 和 GSH 含量的比较

A:各组细胞中 MDA 含量的比较; B:各组细胞中 SOD 含量的比较; C:各组细胞中 GSH 含量的比较; a:对照组;b:低氧组;c:低氧 + NAC 组;d:低氧 + SIRT3-OE 组;e:低氧 + SIRT3-OE + NAC 组;与对照组比较:**P < 0.01;与低氧组比较:^{##}P < 0.01;与低氧 + NAC 组比较:^{△△}P < 0.01

3 讨论

研究^[7]表明, SIRT3 在 NSCLC 中具有抑癌作 用。本研究结果显示,低氧条件下过表达 SIRT3 能 够促进肿瘤细胞凋亡,并抑制肿瘤细胞增殖,提示 SIRT3 具有肿瘤抑制作用,与前人研究结果一 致^[7-8]。肿瘤微环境在维持 NSCLC 的发生和发展 中具有重要作用。炎症细胞浸润、血管、可溶性因子 和低氧状态等构成了 NSCLC 中的肿瘤微环境,其中 低氧是肺癌肿瘤最常见的微环境特征,能够影响癌 细胞的转移和代谢^[2]。肿瘤细胞对低氧的适应主 要受 HIF 的调节, HIF 可随着细胞氧水平的降低而 增加^[9]。低氧时 HIF-1α 水平的升高,可以调节细 胞代谢,诱导存活分子的产生、促进新生血管的形 成,使肿瘤细胞在低氧条件下存活和转移,从而促进 肿瘤生长、侵袭和转移^[3]。研究^[10]表明, HIF-1α的 表达受 SIRT3 介导的去乙酰化调控。本研究结果显 示,低氧条件下过表达 SIRT3 能够抑制 HIF-1α的表 达,与前期研究^[11]结果一致,提示低氧条件下 SIRT3 能够通过抑制 HIF-1α 的表达来抑制肿瘤进 展。

研究^[12]发现,SIRT3 在调节线粒体功能和 ROS

· 2050 ·

产生中也发挥重要作用。ROS 是一种非常重要的 生物活性物质,可通过诱导脂质过氧化或破坏细胞 内蛋白质和核酸诱导细胞坏死或凋亡,被认为是治 疗癌症的重要药物^[13]。在癌细胞中, ROS 信号传导 在细胞的存活、转录、蛋白质翻译以及肿瘤的形成和 发展中起着重要作用。高水平的 ROS 有助于癌细 胞增殖、DNA改变、凋亡、转移和血管生成^[14]。本 研究结果显示,低氧条件下过表达 SIRT3 能够抑制 ROS 的增加,表明 SIRT3 对 ROS 具有抑制作用。此 外还检测了低氧条件下过表达 SIRT3 对 A549 细胞 中氧化应激相关指标 MDA、SOD 和 GSH 的影响,其 中 MDA 是脂质过氧化氢的最终产物,是 ROS 的指 示物:SOD 是一种将 O²⁻催化还原为过氧化氢的酶: GSH 可以催化过氧化氢和其他过氧化物的还原,具 有抗氧化作用^[15]。结果显示,过表达 SIRT3 能够降 低 MDA 水平,升高 SOD 和 GSH 水平。为明确低氧 条件下 SIRT3 调控 ROS 的机制,用 ROS 抑制剂 NAC 处理 A549 细胞,结果显示,与 NAC 单独处理 相比, NAC 联合过表达 SIRT3 后细胞 ROS 水平降 低, MDA 水平降低, SOD 和 GSH 水平升高, 表明 SIRT3 能够通过抑制 ROS 来抑制氧化应激反应, NAC 联合过表达 SIRT3 细胞中 HIF-1α 的表达降 低,细胞凋亡率升高。

参考文献

- Schabath M B, Cote M L. Cancer progress and priorities: lung cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2019, 28 (10): 1563-79.
- [2] Jing X, Yang F, Shao C, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1):157.
- [3] Malekan M, Ebrahimzadeh M A, Sheida F. The role of hypoxiainducible factor-1 alpha and its signaling in melanoma[J]. Biomed

Pharmacother, 2021, 141:111873.

- [4] Xiong Y, Wang L, Wang S, et al. SIRT3 deacetylates and promotes degradation of P53 in PTEN-defective non-small cell lung cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2018, 144(2):189-98.
- [5] Bell E L, Emerling B M, Ricoult S J, et al. SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1α and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production [J]. Oncogene, 2011, 30(26):2986-96.
- [7] 孙 军,王 炯, 闫雪波,等. 非小细胞肺癌组织中 MnSOD、 SIRT3 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2018,34 (8):860-4.
- [8] Xiao K, Jiang J, Wang W, et al. Sirt3 is a tumor suppressor in lung adenocarcinoma cells[J]. Oncol Rep, 2013, 30(3):1323-8.
- [9] Infantino V, Santarsiero A, Convertini P, et al. Cancer cell metabolism in hypoxia: role of HIF-1 as key regulator and therapeutic target[J]. Int J Mol Sci,2021,22(11):5703.
- [10] Zhou B, Lei J H, Wang Q, et al. Cancer-associated fibroblast-secreted miR-421 promotes pancreatic cancer by regulating the SIRT3/H3K9Ac/HIF-1α axis[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2022, 38(11):1080-92.
- [11] 王艳辉, 金 玉, 任 丽. 线粒体 SIRT3 在肿瘤发生和治疗中 作用的研究进展[J]. 天津医科大学学报, 2021, 27(5):541-4,553.
- [12] Jin Y, Gu W, Chen W. Sirt3 is critical for p53-mediated ferroptosis upon ROS-induced stress[J]. J Mol Cell Biol,2021,13(2): 151-4.
- [13] Salaroglio I C, Belisario D C, Akman M, et al. Mitochondrial ROS drive resistance to chemotherapy and immune-killing in hypoxic non-small cell lung cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2022,41(1):243.
- [14] 陈艳雅,黄丽珊,招锦兰,等.金诺芬对卵巢癌细胞活性的影响及其分子机制[J].安徽医科大学学报,2023,58(4):541-6.
- [15] Zhao L, Qi Y, Xu L, et al. MicroRNA-140-5p aggravates doxorubicin-induced cardiotoxicity by promoting myocardial oxidative stress via targeting Nrf2 and Sirt2[J]. Redox Biol,2018,15: 284 -96.

The effect of SIRT3 on lung cancer cell apoptosis by regulating ROS-mediated oxidative stress under hypoxic conditions

Huang Bo^{1, 2}, Ding Jie¹, Guo Hongrong¹, Wang Hongjuan¹, Xu Jianqun¹, Zheng Quan¹

(¹Wuhan Third Hospital/Tongren Hospital of Wuhan University, Wuhan 430074;

²Wuhan East Lake High – Tech Development Zone Jiufeng Street Center City Community Health Service Center, Wuhan 430070)

Abstract Objective To investigate the effect of sirtuin 3(SIRT3) on the oxidative stress response and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression in lung cancer cells through reactive oxygen species(ROS) under hypoxic conditions and its mechanism. *Methods* Human non-small cell lung cancer A549 cells were exposed to hypoxia for 0 h, 12 h, 24 h and 48 h. The mRNA and protein expressions of HIF-1 α and SIRT3 were detected by RT-PCR (下转第 2057 页)

each group, and dual luciferase reporter gene assay was performed to validate the targeting relationship between miR-125b and VEGF. **Results** qRT-PCR and ELISA showed that compared with the negative control group, the mRNA and protein expressions of VEGF, CD31, vWF, Collagen IV, and LN significantly decreased after miR-125b mimic transfection (P < 0.05), while the mRNA and protein expressions of VEGF, CD31, vWF, Collagen IV, and LN were significantly increased after transfection with miR-125b mimics (P < 0.05); fluorescent probe detection showed that compared with the negative control group, the average fluorescence of intensity expression NO decreased significantly (P < 0.05), while the average fluorescence intensity expression of NO increased significantly after miR-125b inhibitor transfection (P < 0.05); the number of fenestrations on the surface of human liver sinusoidal endothelial cells significantly increased after miR-125b mimic transfection (P < 0.05), while the number of fenestrations on the surface of human liver sinusoidal endothelial cells decreased significantly after miR-125b inhibitor transfection (P < 0.05); angiogenesis assay showed that compared with the negative control group, the number of angiogenesis significantly decreased after miR-125b mimic transfection (P < 0.05), while the number of angiogenesis significantly increased after miR-125b inhibitor transfection (P < 0.05); dual luciferase reporter gene assay showed that compared with negative control group, the expression of relative fluorescence intensity after transfection of miR-125b mimics in VEGF wild-typ significantly decreased (P < 0.05), while the expression of relative fluorescence intensity after transfection of miR-125b mimics in VEGF mutant significantly decreased (P > 0.05). Con*clusion* miR-125b can inhibit liver angiogenesis and thus play an anti-fibrosis role, which can provide a new reference for the prevention and treatment of chronic liver disease and the development of new drugs. Key words miR-125b; angiogenesis; liver fibrosis; VEGF; hepatic sinusoid endothelial cell

(上接第2050页)

and Western blot to determine the optimal time of hypoxia induction. A549 cells were divided into 5 groups: control group, hypoxia group, hypoxia + ROS inhibitor n-acetylcysteine (NAC) group, hypoxia + (SIRT3 overexpression) SIRT3-OE group and hypoxia + SIRT3-OE + NAC group. Cell proliferation was detected by MTT assay. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. The mRNA and protein expressions of HIF-1 a and SIRT3 in each group were detected by RT-PCR and Western blot. ROS content in each group was detected by flow cytometry. The contents of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) in the cells of each group were detected by biochemical kits. *Results* The optimal induction time of hypoxia was 24 h. Compared with the control group, the apoptosis rate, SIRT3 mRNA and protein levels, SOD and GSH contents in the hypoxia group significantly decreased (P < 0.01), the cell proliferation ability, HIF-1 α mRNA and protein levels, ROS and MDA content in cells significantly increased (P < 0.01). Compared with the hypoxia group, the apoptosis rate, SIRT3 mR-NA and protein levels, SOD and GSH contents in the hypoxia + NAC and hypoxia + SIRT3-OE groups increased (P <0.05), the cell proliferation ability, HIF-1 α mRNA and protein levels, ROS and MDA content in cells decreased (P < 0.05). Compared with the hypoxia + NAC group, the apoptosis rate, SIRT3 mRNA and protein levels, SOD and GSH contents in the hypoxia + SIRT3-OE + NAC group significantly increased (P < 0.01), the cell proliferation ability, HIF-1 α mRNA and protein levels, ROS and MDA content in cells significantly decreased (P <0.01). Conclusion Under hypoxic conditions, SIRT3 can promote cell apoptosis and inhibit lung cancer progression by mediating ROS to inhibit oxidative stress response and HIF-1 α expression in lung cancer cells. Key words sirtuin 3; lung cancer; oxidative stress; reactive oxygen species; hypoxia inducible factor-1 α