

网络出版时间: 2021-11-25 8:29 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20211124.1046.013.html>

去乙酰化酶 SIRT6 通过激活 PI3K-AKT 通路 促进肾癌细胞增殖、迁移

李天宇¹ 汪 鑫² 张 森¹ 毕良宽² 王德光¹

摘要 目的 探讨去乙酰化酶 SIRT6 对肾癌细胞系 ACHN、786-O 的增殖及迁移的影响。方法 使用免疫组化检测 SIRT6 在肾癌及癌旁组织表达; 采用 Western blot 检测肾癌细胞株 SIRT6 及下游相关信号通路分子的表达水平; 采用 SIRT6-siRNA 转染和 SIRT6 特异性抑制剂 OSS_128167 处理 ACHN 细胞, 划痕实验和四甲基偶氮唑蓝法实验观察处理后的 ACHN 细胞的增殖及迁移能力, Western blot 检测下游相关信号通路的变化。结果 免疫组化和 Western blot 结果显示 SIRT6 在肾癌组织中的表达明显高于癌旁组织。与正常肾小管上皮细胞 HK-2 比较, 肾癌细胞系 ACHN 中 SIRT6 表达显著升高。使用 SIRT6-siRNA 转染 ACHN 后, SIRT6 的表达显著降低, 划痕实验和 MTT 显示 ACHN 细胞增殖和迁移能力降低。OSS_128167 处理肾癌细胞系后, SIRT6 的去乙酰化活性下降, 细胞增殖能力降低。结论 去乙酰化酶 SIRT6 能够通过下调 PI3K-AKT 通路从而抑制肾癌细胞的增殖、迁移, 可能成为药物治疗的潜在新靶点。

关键词 SIRT6; 肾癌细胞; ACHN; 786-O; OSS_128167; 迁移; 增殖

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1914-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.013

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是肾脏中最常见的恶性肿瘤^[1]。在过去的 10 年中, RCC 的发生率以每年 2% 的速度增长^[2]。转移和化疗耐药性是 RCC 的特征。由于缺乏有效的治疗方法, RCC 患者的中位生存时间仅为 6~12 个月, 而 5 年生存率不到 20%。最近的研究^[3]表明, 超过 90% 的肾癌相关死亡与 RCC 的转移有关。因此, 迫切需要确定

2021-09-07 接收

基金项目: 安徽医科大学第二附属医院国家自然科学基金孵化计划项目(编号: 2020GMFY04、2019GQFY05); 安徽省自然科学基金(编号: 2008085MH244、2008085QH426); 安徽医科大学校科研基金(编号: 2019xkj140、2017xkj028)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院¹ 肾脏内科、² 泌尿外科, 合肥 230601

作者简介: 李天宇, 男, 硕士研究生;

王德光, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wangdeguang@ahmu.edu.cn

新的治疗靶点。

SIRT6 是 NAD⁺ 依赖的去乙酰化酶 Sirtuins 家族成员之一, 在染色质信号传导和基因组维持中已确定作用。通过这些功能, SIRT6 可以预防与衰老相关的疾病, 包括代谢性疾病和癌症, 并可以延长小鼠的寿命^[4]。在 RCC 发展过程中, SIRT6 的表达是否发生变化及其对 RCC 细胞转移能力的调控尚不清楚。该研究通过 RCC 患者组织及细胞系, 观察 SIRT6 在 RCC 发展中的表达及其对 RCC 细胞增殖、迁移能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 RPMI-1640 培养基(美国 Hyclone 公司), 胎牛血清(美国 Gibco 公司); 转染试剂 jetPRIME transfection reagent(法国 Polyplus-transfection 公司), RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司), 小干扰 RNA(上海吉玛制药技术有限公司), Western blot SIRT6 抗体(英国 Abcam 公司), 免疫组化 SIRT6 抗体(美国 Proteintech 公司), 兔二步法试剂盒(北京中杉金桥公司), 兔源 H3、H3K9ac、GAPDH、Akt、p-Akt 抗体和山羊抗兔二抗(美国 Affinity 公司), 兔源 β-Tubulin(美国 Cell signaling technology 公司), 二甲基亚砜(美国 Sigma 公司), OSS_128167 粉末(美国 MCE 公司)。

1.2 病例资料 从安徽医科大学第二附属医院病理科调取术后 17 例患者的肾癌组织和癌旁组织切片, 肾癌组织类型皆为透明细胞癌, 同时患者已签署知情同意书。人肾癌细胞系 ACHN、786-O 细胞购自 ATCC, 使用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 RPMI-1640 培养基于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱培养。

1.3 细胞转染 转染选择在对数生长期的细胞, 按照说明书将 SIRT6-siRNA 转染到 ACHN、786-O 细胞中, 并在转染 48 h 后用于划痕实验或收集细胞蛋白等。

1.4 细胞加药处理 将 OSS_128167 粉末离心后溶于 DMSO 中, 并配制成用药浓度为 50、100、200

$\mu\text{mol/L}$ 培养基培养细胞 24 h 后进行 MTT 及划痕实验, 并收集细胞蛋白。

1.5 Western blot 免疫印迹法检测细胞蛋白表达

RIPA 法提取处理后的细胞总蛋白, 通过 SDS-PAGE 电泳分离并转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜, 二抗室温孵育 1 h, 随之 ECL 化学发光反应, 化学发光图像系统分析系统进行图片拍照, Image J 对图像进行半定量分析。

1.6 划痕实验 将对数生长期细胞接种于 6 孔板中, 待贴壁后用 1 ml 枪头从上到下用力划出一条痕迹, 拍照记录, 后续每隔 6 h 进行 1 次拍照, 直至 24 h 最后 1 次拍照, 测量划痕两侧细胞之间的面积用来计算 24 h 细胞愈合率。

1.7 四甲基偶氮唑蓝法检测细胞增殖活力 将细胞种于 96 孔板中, 每孔含有细胞 2 000 个, 并加入药物 OSS_128167 进行 24 h 刺激, 浓度分别为 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$, 每组做 10 个复孔。每孔加入 10 μl MTT 溶液, 继续在细胞培养箱中培养 4 h, 每孔再加入 10 μl Formazan 溶解液并适当混匀放入培养箱中继续孵育, 3 ~ 4 h 后显微镜下观察到紫色 Formazan 结晶全部溶解则移至酶标仪处测 570 nm 处吸光度。

1.8 免疫组织化学染色 将切片放置在枸橼酸盐缓冲液中, 加热至沸腾使温度维持在 90 ~ 100 °C、7 min, 再沸腾 1 次, PBS 缓冲液冲洗 3 次(每次 5 min), 内源性过氧化物酶阻断剂封闭 10 min, PBS 冲洗 3 次(每次 5 min), 4 °C 一抗孵育过夜, PBS 冲洗 3 次(每次 5 min), 显色增强剂孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次(每次 5 min), 酶标山羊抗兔 IgG 二抗孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次(每次 5 min), DAB 显色。

1.9 Transwell 迁移实验 将细胞消化后接种在含 200 μl 无血清培养基的小室中, 24 孔板里放入 800 μl 含 30% 小牛血清的培养基中, 放入培养箱 24 h, 取出并加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再加入 0.1% 结晶紫染色 8 min, PBS 清洗 3 次后用棉签轻擦小室上部, 放于显微镜下拍照。用 Image J 计算穿过小室的细胞数, 并进行统计学分析。

1.10 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学处理, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 正态性检验采用 Shapiro-Wilk 检验, 方差齐性检验采用 Brown-Forsythe 校正, 两独立样本之间采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。Transwell 的细胞数计算和划痕实验的细胞

愈合率采用 Image J 进行定量或半定量分析。

2 结果

2.1 SIRT6 在人肾癌组织和肾癌细胞系中的表达

从 17 例病人中随机选取了 3 例肾透明细胞癌患者癌组织和癌旁组织, 免疫组化结果显示: 肾癌组织中 SIRT6 的表达明显升高, 而癌旁组织中 SIRT6 几乎不表达, 见图 1A。同时选取人肾癌细胞系 ACHN、786-O 和正常人肾小管上皮细胞 HK-2 检测 SIRT6 的表达。Western blot 结果显示, 与 HK-2 细胞比较, SIRT6 在肾癌细胞系 ACHN、786-O 中表达分别升高 1.43 倍($t = 8.409, P < 0.01$) 和 1.22 倍($t = 4.122, P < 0.05$), 见图 1B。

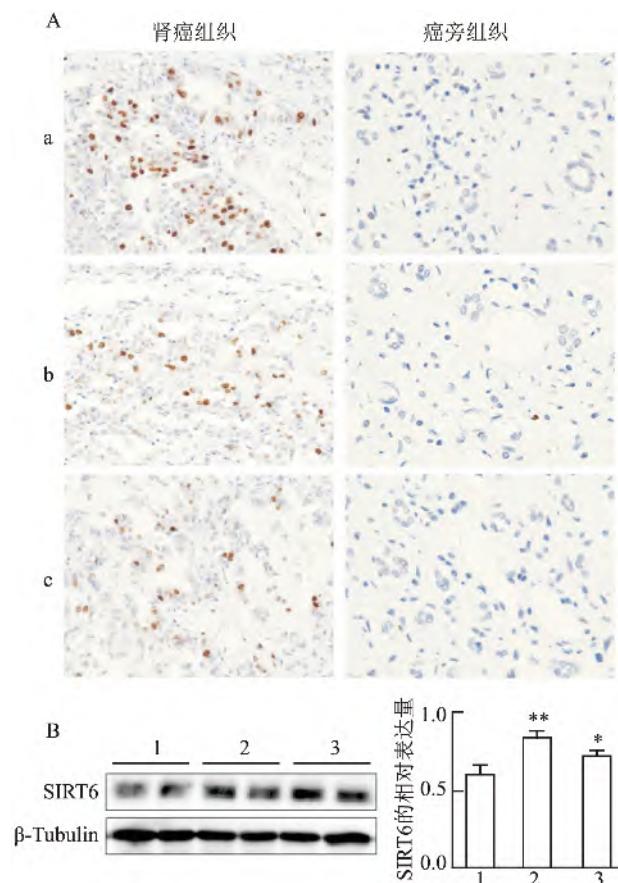


图 1 SIRT6 在肾癌中的表达变化

A: 免疫组化检测肾癌组织和癌旁组织中 SIRT6 的表达 $\times 100$; B: Western blot 分别检测 SIRT6 蛋白在正常肾小管上皮细胞 HK-2、肾癌细胞系 ACHN 和 786-O 中的表达; a、b、c: 17 例患者随机选取 3 例组化图; 1: HK-2 组; 2: ACHN 组; 3: 786-O 组; 与 HK-2 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 干扰 SIRT6 对 ACHN 细胞迁移能力的影响

使用 SIRT6-RNAi 干扰 ACHN 细胞。合成的 3 条

siRNA 片段用于进行 SIRT6 的干扰, Western blot 结果显示,与 Vector 组比较,SIRT6-siRNA1 能够显著降低 ACHN 细胞中 SIRT6 的表达 ($F = 72.01, P < 0.01$),故选用 siRNA1 进行后续实验,见图 2A。ACHN 细胞转染 SIRT6-siRNA 后,与 Vector 组比较,SIRT6 下游蛋白 H3K9 乙酰化水平显著升高 ($F = 10.89, P < 0.001$),而 H3 总蛋白表达没有明显变化,见图 2B。

划痕实验结果表明,与 Vector 组比较,SIRT6-siRNA 转染后 ACHN 细胞划痕愈合面积较小,提示其迁移能力明显减弱 ($F = 149.4, P < 0.01$)。Transwell 实验结果显示,与 Vector 组比较,转染 SIRT6-siRNA 转染后 ACHN 穿过小室的细胞数较少 ($F = 59.27, P < 0.01$) 迁移能力明显降低,见图 2C、D。

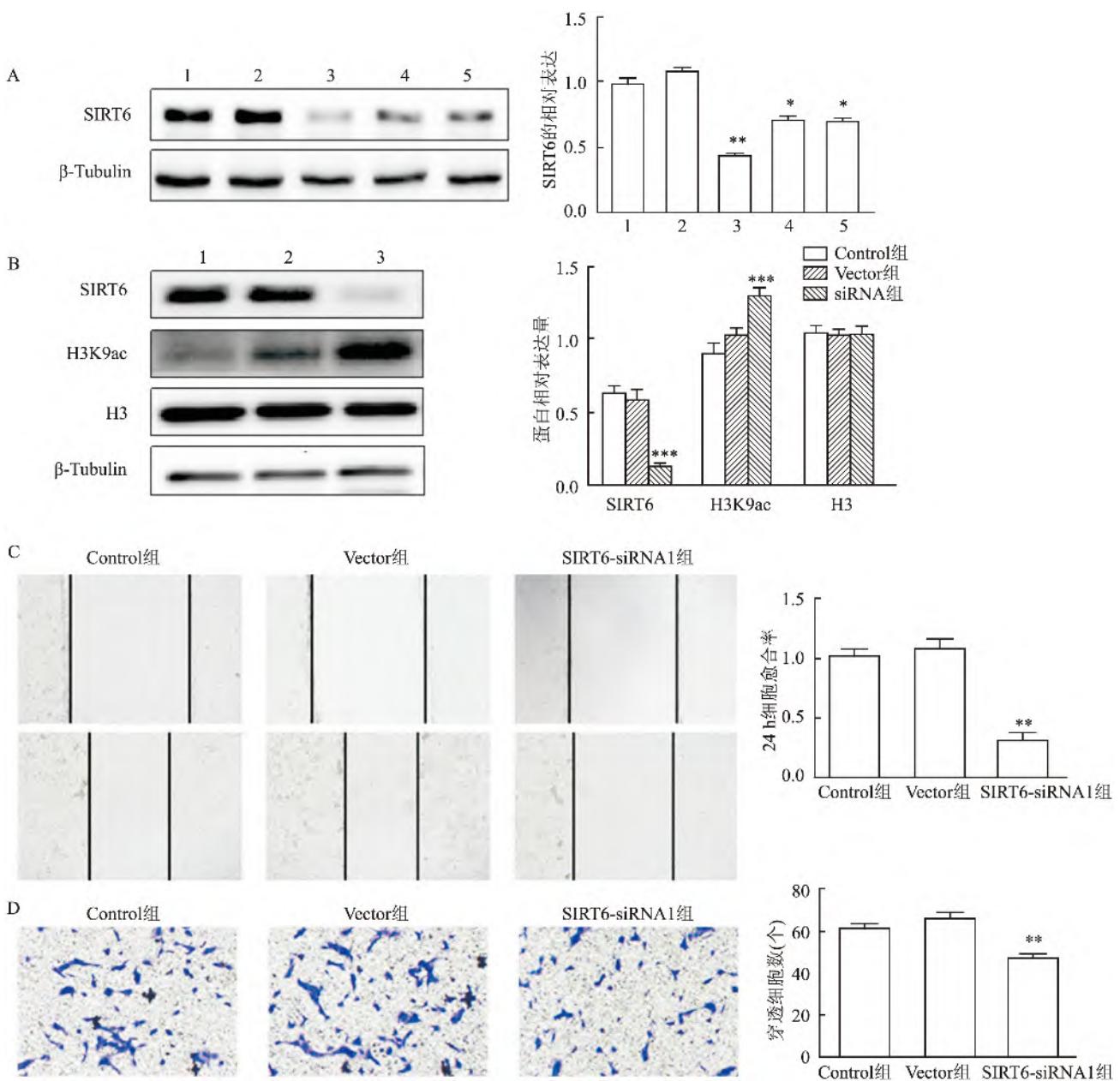


图 2 SIRT6-siRNA 对 ACHN 的影响

A: Western blot 检测 3 种 SIRT6-siRNA 转染 ACHN 后对 SIRT6 蛋白的表达; B: Western blot 检测 SIRT6-siRNA 转染 ACHN 后对 SIRT6 和 H3K9ac 蛋白的表达; C: 划痕实验检测 SIRT6-siRNA 转染对 ACHN 细胞迁移能力的改变 $\times 100$; D: Transwell 实验检测 SIRT6-siRNA 转染对 ACHN 细胞迁移能力的改变 $\times 100$; 1: Control 组; 2: Vector 组; 3: siRNA1 组; 4: siRNA2 组; 5: siRNA3 组; 与 Vecotr 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.3 SIRT6 特异性抑制剂 OSS_128167 对肾癌细胞增殖能力的影响 Western blot 结果显示,与 DMSO 组比较,随着 OSS_128167(50、100、200 $\mu\text{mol/L}$) 浓度的增加($F = 96.27, P < 0.001$),在 ACHN 细胞中乙酰化 H3K9 蛋白表达逐渐升高,而对 SIRT6 蛋白和 H3 总蛋白表达无影响(图 3A)。MTT 结果显示,不同浓度的 OSS_128167(50、100、200 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 后,与 DMSO 组比较,ACHN 的增殖活力随着用药浓度提高而显著降低($F = 43.39, P < 0.001$)(图 3B)。

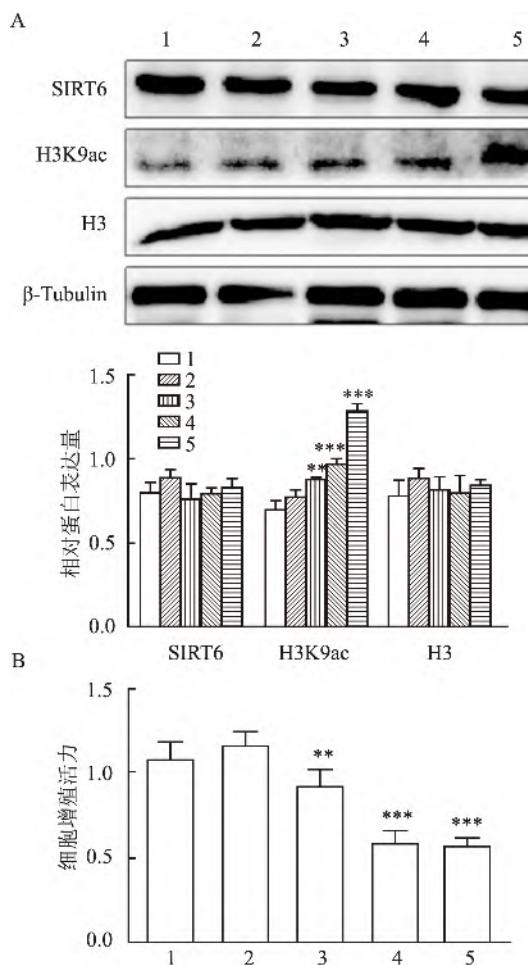


图 3 OSS_128167 对 ACHN 细胞 SIRT6、H3K9ac 表达和增殖活力的影响

A: Western blot 检测 OSS_128167 处理 ACHN 后对 SIRT6 和 H3K9ac 蛋白的表达; B: MTT 检测 OSS_128167 处理 ACHN 后的细胞增殖活力; 1: Control 组; 2: DMSO 组; 3: 50 $\mu\text{mol/L}$ OSS_128167 组; 4: 100 $\mu\text{mol/L}$ OSS_128167 组; 5: 200 $\mu\text{mol/L}$ OSS_128167 组; 与 DMSO 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.4 SIRT6 特异性抑制剂 OSS_128167 对肾癌细胞 ACHN 中 PI3K、AKT 表达的影响 Western blot 结果显示,与 DMSO 组比较,不同浓度 OSS_128167

(50、100、200 $\mu\text{mol/L}$) 处理 ACHN 细胞后,随着浓度的升高,p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达逐渐降低($F = 84.66, P < 0.001$; $F = 23.39, P < 0.001$),而 PI3K、Akt 蛋白的表达没有明显变化,见图 4。

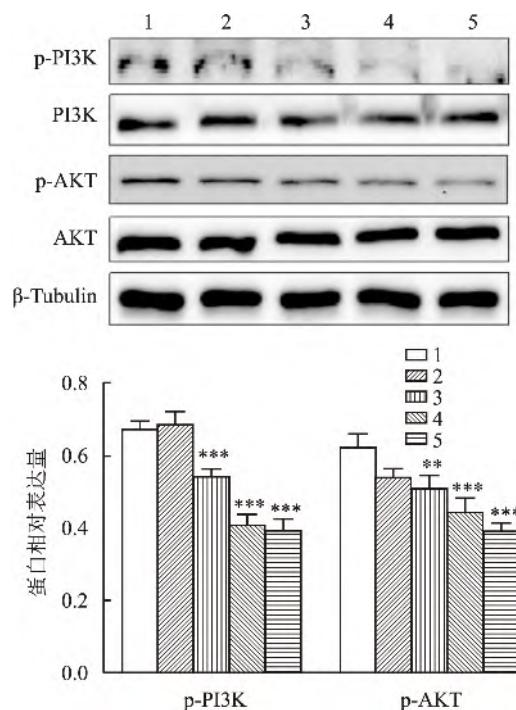


图 4 OSS_128167 对 PI3K/AKT 信号通路的影响

Western blot 检测 OSS_128167 处理 ACHN 后对 PI3K、AKT 蛋白的表达; 1: Control 组; 2: DMSO 组; 3: 50 $\mu\text{mol/L}$ OSS_128167 组; 4: 100 $\mu\text{mol/L}$ OSS_128167 组; 5: 200 $\mu\text{mol/L}$ OSS_128167 组; 与 DMSO 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

3 讨论

肾癌的发病机制较为复杂,尚未能完全明确,且面临治疗方法敏感性较差,肿瘤耐药等问题,因此,确定新的肾癌治疗靶点和药物是当前肾癌研究的关键。

Sirtuins 家族包含 7 个 NAD⁺ 依赖性酶(SIRTs1-7),它们涉及衰老、代谢和癌症等多种途径,因此,其被认为是细胞活动的主要调节剂。SIRT6 作为家族成员之一,对 SIRT6 的研究从最初的衰老和长寿的调控到近几年在肿瘤,多样化的功能使其能够参与基因组的稳定性、DNA 修复、癌症及代谢的调节,由于这些过程与癌症的发生发展具有密切的联系^[5]因此,SIRT6 也被认为是癌症研究中较有吸引力的靶标。

SIRT6 在各种癌症中失调,SIRT6 在肿瘤发生中的作用取决于肿瘤的类型和背景。在胰腺癌、乳

腺癌、原发性黑色素瘤、非小细胞肺癌中^[6-9] SIRT6 在这些表达升高的癌症中可能代表了一种对抗肿瘤进展的补偿机制,在多发性骨髓瘤中 SIRT6 表达的增加,可以增强 H3K9 的脱乙酰基作用并抑制 MAPK/ERK 的转录,从而抑制肿瘤细胞的增殖^[10]。这些研究^[11]表明,细胞中 SIRT6 活性的调节随肿瘤类型和癌症分期而变化,反映 SIRT6 在癌细胞生物学中的复杂机制和多效作用。

在以往的研究中,肾癌中 SIRT6 表达水平尚有争议:肾癌的免疫组化显示 SIRT6 表达升高,且 SIRT6 抑制通过阻滞肾癌细胞 786-O 的 G₁/S 期来抑制肿瘤生长^[12],而在另外的研究^[13]中,肾癌组织的免疫组化提示 SIRT6 的表达显著低于正常组织。在该研究中,结果显示 SIRT6 在肾癌组织中的表达高于癌旁组织,提示 SIRT6 的异常表达可能在肾癌进展中发挥调控作用。SIRT6-siRNA 干扰 ACHN 细胞后,随后通过细胞划痕实验和 Transwell 实验表明了 SIRT6 蛋白的下降能抑制肾癌细胞迁移。由于药物的毒性和耐药性,治疗肾癌的手段选择有限。

OSS_128167 作为 SIRT6 的特异性抑制剂已经被以往的研究^[14]证明,SIRT6 作为 NAD⁺ 依赖性去乙酰化酶,OSS_128167 与 NAD⁺ 的烟酰胺(NAM)部分的结合位点非常接近。抑制剂部分占据了肽底物结合位点,随后阻止了活性组氨酸朝向 NAD⁺ 定向以进行反应。OSS_128167 可以通过抑制 SIRT6 的活性而不影响 SIRT6 蛋白表达而提高 SIRT6 的特异性下游靶标 H3K9 的乙酰化水平^[5]。细胞增殖实验所示,SIRT6 的活性可被 OSS_128167 所抑制并且降低肾癌细胞的增殖。进一步的药物代谢动力学研究仍有必要,以确定 OSS_128167 单独使用或与其他药物联合使用的剂量和不良反应。

PI3K/AKT 是一种众所周知的重要信号转导途径,在各种癌症的发生和发展中发挥着不可或缺的作用。PI3K/AKT 作为经常被激活的癌症驱动因子,在遗传上比其他生长因子信号途径靶向更多的途径组成成分和更多的肿瘤类型。在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中报道 SIRT6 在 PI3K/AKT 信号通路中富集,shSIRT6 可抑制 PI3K/AKT 通路的磷酸化激活,该研究中 SIRT6 活性被 OSS_128167 抑制后出现 PI3K/AKT 磷酸化的抑制^[15],说明 SIRT6 诱导的 PI3K/AKT 信号通路的激活可能是肾癌发展的重要分子机制,但需要进一步研究来证明 SIRT6 调控该

通路的生物学机制和信号串扰。

参考文献

- Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69–90.
- 王翰. STAG2 基因在肾癌的表达及功能研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 1(53): 93–9.
- Kim D Y, Karam J A, Wood C G. Role of metastasectomy for metastatic renal cell carcinoma in the era of targeted therapy [J]. World J Urol, 2014, 32(3): 631–42.
- Luisa T, Wei Z, Katrin F C. SIRT6: novel mechanisms and links to aging and disease [J]. Trends Endocrinol Metab, 2017, 3(28): 168–85.
- Morigi M, Perico L, Benigni A. Sirtuins in renal health and disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2018, 29(7): 1799–809.
- Bauer I, Grozio A, Lasigliè D, et al. The NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT6 promotes cytokine production and migration in pancreatic cancer cells by regulating Ca²⁺ responses [J]. J Biol Chem, 2012, 287(49): 40924–37.
- Choe M, Brusgård J L, Chumsri S, et al. The RUNX2 transcription factor negatively regulates SIRT6 expression to alter glucose metabolism in breast cancer cells [J]. J Cell Biochem, 2015, 116(10): 2210–26.
- Zhang C, Yu Y, Huang Q, et al. SIRT6 regulates the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma via the ERK1/2 signalling pathway [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(2): 1575–82.
- Garcia-Peterson L M, Ndiaye M A, Singh C K, et al. SIRT6 histone deacetylase functions as a potential oncogene in human melanoma [J]. Genes Cancer, 2017, 8(9–10): 701–12.
- Cea M, Cagnetta A, Adamia S, et al. Evidence for a role of the histone deacetylase SIRT6 in DNA damage response of multiple myeloma cells [J]. Blood, 2016, 9(127): 1138–50.
- Lerner B, Gertler A A, Cohen H Y. The complex role of SIRT6 in carcinogenesis [J]. Carcinogenesis, 2016, 37(2): 108–18.
- Ding Y, Wu S, Huo Y, et al. Inhibition of Sirt6 suppresses tumor growth by inducing G₁/S phase arrest in renal cancer cells [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2019, 12(7): 2526–35.
- Jeh S U, Park J J, Lee J S, et al. Differential expression of the sirtuin family in renal cell carcinoma: aspects of carcinogenesis and prognostic significance [J]. Urol Oncol, 2017, 35(12): 675–e9–15.
- Liu X, Yang Z, Li H, et al. Chrysophanol alleviates metabolic syndrome by activating the SIRT6/AMPK signaling pathway in brown adipocytes [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 12(73): 2020.
- Yang J, Li Y, Zhang Y, et al. Sirt6 promotes tumorigenesis and drug resistance of diffuse large B-cell lymphoma by mediating PI3K/Akt signaling [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 142.

Deacetylase SIRT6 promotes proliferation and migration of renal cancer cells by activating PI3K-AKT pathway

Li Tianyu¹, Wang Xin², Zhang Sen¹, et al

(¹Dept of Nephrology, ²Dept of Urology, The Second Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract **Objective** To investigate the effect of SIRT6 on the proliferation and migration of renal cancer cell lines ACHN and 786-O. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of SIRT6 in renal cell carcinoma and adjacent tissues; Western blot was used to detect the expression levels of kidney cancer cell line SIRT6 and related downstream signaling pathway molecules; SIRT6-siRNA transfection and SIRT6 specific inhibitor OSS_128167 were used to treat ACHN cells, Scratch test and Tetramethylazazole blue test were used to observe the proliferation and migration ability of treated ACHN cells, and Western blot was used to detect changes in downstream related signal pathways. **Results** The results of immunohistochemistry and Western blot showed that the expression of SIRT6 in renal cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues. Compared with normal renal tubular epithelial cells HK-2, the expression of SIRT6 in renal cancer cell line ACHN significantly increased. After transfection of ACHN with SIRT6-siRNA, the expression of SIRT6 was significantly reduced. Scratch test and MTT showed that the proliferation and migration ability of ACHN cells was reduced. After OSS_128167 treatment of renal cancer cell lines, the deacetylation activity of SIRT6 decreased, and the cell proliferation ability decreased. **Conclusion** The SIRT6 deacetylase can inhibit the proliferation and migration of renal cancer cells by down-regulating the PI3K-AKT pathway, and may become a potential new target for drug therapy.

Key words SIRT6; renal carcinoma cell; ACHN; 786-O; OSS_128167; migration; proliferation

(上接第1913页)

OSCC. The expression of sigma-1 receptor was down-regulated by transfection of specific siRNA. Then the proliferation, migration and invasion of OSCC cells after transfection were detected by CCK-8 and Transwell assay, and the expression level of voltage-gated sodium ion channels subtype Nav1.5 in OSCC cells was detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** Immunohistochemical analysis showed that the expression of sigma-1 receptor was higher in OSCC tissues than that in normal tissues. Western blot revealed that the sigma-1 receptor was expressed in all four OSCC cell lines. The results of GEPIA database analysis showed that the expression level of sigma-1 receptor was negatively correlated with the overall survival rate of patients with OSCC. Immunocytochemistry and confocal microscopy showed that the sigma-1 receptor was mainly localized in the plasma membrane in CAL-27 cells. CCK-8 analysis showed that the down-regulated expression of sigma-1 receptor reduced the proliferation of CAL-27 cells through its specific siRNA. Transwell analysis showed that the reduced expression of sigma-1 receptor significantly inhibited the migration and invasion of CAL-27 cells. In addition, down-regulation of sigma-1 receptor expression was found to inhibit the protein and mRNA expression levels of Nav1.5. **Conclusion** sigma-1 receptor participates in the occurrence and development of OSCC, promotes the proliferation, migration and invasion of OSCC cells, and may be involved in the progression of OSCC by regulating the Nav1.5.

Key words oral squamous cell carcinoma; sigma-1 receptor; voltage-gated sodium ion channels; Nav1.5