

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.13.003

缺氧微环境 SIRT1 亚细胞定位对结直肠癌细胞凋亡的影响及其机制研究*

崔竹青 余沈桐 杨 桐 周 汝 张 静[△]

(空军军医大学肿瘤生物学国家重点实验室、基础医学院病理学教研室暨西京医院病理科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探究缺氧微环境 SIRT1 亚细胞定位对结直肠癌细胞凋亡的影响及其分子机制。**方法:**将编码过表达野生型 SIRT1 以及核定位序列(nuclear localization sequence, NLS)突变型 SIRT1(SIRT1NLSmt)的慢病毒载体转染人类结肠癌 HCT116 细胞株,经嘌呤霉素筛选获得稳定过表达野生型 SIRT1 细胞株(LV-SIRT1 细胞)和细胞质定位的 NLS 突变型 SIRT1 细胞株(LV-SIRT1NLSmt 细胞),通过观察慢病毒载体编码的 SIRT1-GFP 融合蛋白的荧光定位,明确稳定转染细胞中外源性 SIRT1 的亚细胞定位。利用 real-time PCR、Western blot 法对分离提取的核-质蛋白进行检测,证实外源性 SIRT1 的表达和亚细胞定位情况。利用 CCK-8 细胞毒性实验、流式细胞术检测和 TUNEL 染色比较缺氧(1% O₂)处理前后 LV-SIRT1 和 LV-SIRT1NLSmt 细胞存活或凋亡情况,Western blot 法检测凋亡相关蛋白 p53、ac-p53 (K382)、Bcl-2、Bax、caspase-3 和 cleaved caspase-3 表达水平。**结果:**Western blot、real-time PCR 和免疫荧光染色结果显示稳定转染细胞均存在外源性 SIRT1 的过表达,NLS 突变可导致 SIRT1NLSmt 富集于细胞质中;与亲本细胞 HCT116 和 LV-SIRT1NLSmt 细胞相比,LV-SIRT1 细胞对缺氧的耐受能力最差、细胞凋亡水平最高,凋亡相关蛋白 p53、Bax、caspase-3、cleaved caspase-3 表达水平显著升高,ac-p53(K382)和 Bcl-2 表达水平显著下降,且 LV-SIRT1 细胞的胞核 ac-p53 下降最为显著。**结论:**在缺氧微环境中,细胞核定位的 SIRT1 通过影响 p53 的去乙酰化水平促进结直肠癌细胞凋亡。

关键词:结肠癌;缺氧;SIRT1;亚细胞定位;细胞凋亡

中图分类号:R-33;R735.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)13-2411-07

Effect and Its Mechanism of SIRT1 Subcellular Location on Apoptosis of Colorectal Carcinoma in Hypoxic Microenvironment*

CUI Zhu-qing, YU Shen-tong, YANG Tong, ZHU Ru, ZHANG Jing[△]

(State Key Laboratory of Cancer Biology, Department of Pathology, Basic Medical College and Xijing Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of subcellular localization of SIRT1 on apoptosis of colorectal carcinoma cells under hypoxic microenvironment and its molecular mechanism. **Methods:** Human colon carcinoma HCT116 cells overexpressing wild-type SIRT1 (LV-SIRT1 cells) and SIRT1 with nuclear localization sequences/NLSs (LV-SIRT1NLSmt cells) were obtained via transfection with lentiviral vectors carrying the corresponding coding sequences and screening with puromycin, respectively. The subcellular localizations of exogenous SIRT1 were observed by the fluorescence signals of SIRT1-GFP fusion proteins encoded by lentiviral vectors. The mRNA and protein expression levels of SIRT1 were analyzed by real-time PCR and Western blot assay. Both cytoplasmic and nuclear extractions were used to analyze the subcellular localization of exogenous SIRT1 by Western blot assay. CCK-8 cytotoxic assay, flow cytometry analysis and TUNEL staining were performed to compare the rates of cell survival or apoptosis among different cell groups after hypoxia (1% O₂) treatment. The expression levels of apoptosis-related proteins, p53, ac-p53 (K382), Bcl-2, Bax, caspase-3 and cleaved caspase-3, were analyzed by Western blot assay. **Results:** Both LV-SIRT1 and LV-SIRT1NLSmt cells had stable overexpression of exogenous SIRT1, while the mutation of NLSs led to the enrichment of SIRT1NLSmt in the cytoplasm. Compared with parental cells, HCT116, and LV-SIRT1NLSmt cells, LV-SIRT1 cells exhibited the worst tolerance to hypoxic treatment, the highest level of apoptosis, the most significantly increased protein expression levels of p53, Bax, caspase-3 and cleaved caspase-3, and the most significantly decreased protein expression levels of Bcl-2 and ac-p53 (K382). And there was the most significantly decreased ac-p53 protein expression level in the nucleus of LV-SIRT1 cells. **Conclusion:** Nuclear localization of SIRT1 promotes apoptosis in colorectal carcinoma cells by affecting the deacetylation level of p53 under hypoxic microenvironment.

Key words: Colorectal carcinoma; Hypoxia; SIRT1; Subcellular location; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.35 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)13-2411-07

* 基金项目:肿瘤生物学国家重点实验室自主研究课题(CBSKL2017Z21);国家自然科学基金项目(81572545)

作者简介:崔竹青(1993-),硕士研究生,主要研究方向:肿瘤微环境,E-mail:1992054363@qq.com

[△] 通讯作者:张静(1970-),博士生导师,教授,主要研究方向:肿瘤微环境和耐药,E-mail:jzhang@fmmu.edu.cn,电话:029-84773412

(收稿日期:2019-12-23 接受日期:2020-01-18)

前言

结直肠癌的发病率和死亡率位列全球恶性肿瘤的第三位^[1]。近些年,尽管针对肿瘤的个体化治疗及分子靶向治疗极大改善了结直肠癌患者的预后,但仍有至少 50% 的患者最终发生肿瘤复发和转移^[2]。因此,阐明影响结直肠癌发生和进展的相关分子机制具有重要的临床意义。

因肿瘤细胞异常增殖形成缺氧性微环境是实体瘤的重要特征之一,肿瘤的进展也常常能获益于缺氧性微环境并激活其主要效应物,如促血管生成因子等等,导致血管的异常形成和增生^[3],除此之外,缺氧性微环境还能够影响肿瘤细胞的生物学行为,甚至降低放射治疗、手术和某些化学治疗的疗效^[4]。

沉默信息调节因子 1 (silencing information regulator 1, SIRT1) 是一种在进化上高度保守的 III 型组蛋白 / 非组蛋白去乙酰化酶,参与调控多种底物的功能。普遍认为,SIRT1 在肿瘤发生和演进过程中起着 " 双刃剑 " 的作用,对肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移和耐药等均具有重要影响^[5]。SIRT1 最初被报道是一种核蛋白^[6,7],然而后续的研究发现,SIRT1 能够在细胞质和细胞核之间动态穿梭,该穿梭能力分别受两个核定位序列(nuclear localization sequences, NLSs)和两个核输出序列(nuclear export sequences, NESs) 的调控, 如果将两个 NLSs 或 NESs 同时突变,可导致 SIRT1 被限制于细胞质或细胞核中^[8]。

现有研究发现,核-质穿梭可能是 SIRT1 的一种调节机制,SIRT1 的亚细胞定位在成年小鼠的不同组织中也是有所不同的,可能在小鼠发育过程中发生变化并参与生理和病理性应激^[9],此外 SIRT1 的亚细胞定位可能也参与对细胞凋亡的调控^[8],我们课题组近期研究发现:缺氧能够通过 ERG1 (early growth response 1) SIRT1 NF- κ B 途径调控结直肠癌的侵袭和迁移^[10],细胞质定位的 SIRT1 能够通过阻遏上皮-间质转化,抑制卵巢癌细胞的迁徙和侵袭^[11]。因此,本研究拟利用人类结直肠癌细胞系 HCT116 作为研究对象,进一步探究缺氧性微环境 SIRT1 亚细胞定位对结直肠癌细胞凋亡的影响及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人类结肠癌细胞系 HCT116 购自美国 ATCC 细胞库;胎牛血清购自杭州四季青公司;编码 SIRT1 野生型及 NLS 突变型 SIRT1 及空载体 (Con136) 慢病毒载体由上海吉凯基因公司构建,SIRT1^{NLS} 突变位点设计详见本课题组已发表文献^[11];兔抗人 SIRT1 (Western blot 检测)、ac-p53 (K382)、Bax、Bcl-2、caspase-3、cleaved caspase-3 以及鼠抗人 p53 和 β -Actin 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;兔抗人 Lamin B 和 GFP 抗体购自武汉三鹰公司;鼠抗人 β -Tubulin 和 SIRT1 (免疫荧光染色) 抗体分别购自天津三箭、美国 Santa Cruz 公司;山羊抗兔或鼠 IgG FITC 标记二抗分别购自北京康为世纪和索莱宝公司;RIPA 细胞裂解液和 BCA 蛋白定量试剂盒为北京康为世纪公司产品;TUNEL 试剂盒购自美国 Roche 公司;CCK-8 细胞毒性检测试剂盒购自美国 APEX BIO 公司;PrimeScript[®] RT Master Mix Perfect Real Time (RR036A)、TB Green[™] Premix Ex Taq[™] II (RR820A) 均购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 HCT116 细胞置于含有 10% 胚胎牛血清、100 U/mL 青链霉素的 McCoy's 5A 培养基 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养。缺氧处理的细胞在 Billups-Rothenburg 小室 (美国 Billups-Rothenburg 公司) 内进行培养,该小室内含有 95% N₂ 和 5% CO₂ 的混合气体,并利用流量计对泵入的气体进行流量监测,确保小室内的氧气浓度维持在 1%,并置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中进行培养。

1.2.2 慢病毒转染和筛选 取对数生长期的 HCT116 细胞按照 2 $\times$ 10⁴/孔接种于 6 孔板中,培养至细胞密度约 50% 时换用无血清培养液,加入 LV-SIRT1、LV-SIRT1NLSmt 或 Con136 慢病毒包装液 (MOI=100),培养 12 h 后更换完全培养基,利用 4 μ g/mL 嘌呤霉素进行筛选培养。

1.2.3 细胞全蛋白提取和 Western blot 检测 用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次以除尽残留培养基,向每个 6 cm 培养皿中加入 150 μ L RIPA 和 1.5 μ L PMSF,收集细胞至新的 EP 管中,超声裂解后冰上放置 15 min,12000 rpm 离心 15 min,收集上清蛋白至新的 EP 管中,使用 BCA 法进行蛋白定量,其余蛋白加入 5 Loading Buffer 热变性。取 30 μ g 上样进行 SDS-PAGE 电泳,后转膜至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,4 $^{\circ}$ C 一抗 (稀释到各抗体相应浓度) 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,用辣根过氧化物酶标记的抗兔或抗鼠二抗室温孵育 2 h,ECL 法进行曝光显影和图像采集。

1.2.4 胞质-核蛋白分离提取 用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次以除尽残留培养基,加入适量体积预冷 Buffer A (10 mM HEPES、10 mM KCl、0.1 mM EDTA、0.1 mM EGTA),收集细胞至 EP 管中,垂直搅拌器 4 $^{\circ}$ C 旋转 20 min,4 $^{\circ}$ C、14000 rpm 离心 3 min,收取上清液,即为胞质组分;滤纸吸干剩余液体,加入 3 体积预冷 Buffer B (20 mM HEPES、0.4 M NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA),超声裂解,4 $^{\circ}$ C、14000 rpm 离心 15 min,收集上清液,此为胞核组分。

1.2.5 real-time PCR 利用 PrimeScript[®] RT Master Mix Perfect Real Time 提取总 RNA 进行反转录后,使用 TB Green[™] Premix Ex Taq[™] II (RR820A) 进行 real-time PCR 反应。以 β -Actin 为内参,通过 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算目的基因的相对表达量。引物序列具体如下: β -Actin, F 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3', R 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'; SIRT1, F 5'-GCAGATTAGTAGGCGGCTTG-3', R 5'-TCATCCTCCATGGTTCTTC-3'。

1.2.6 免疫荧光染色 待细胞贴壁生长后,用预冷 4% 多聚甲醛固定 15 min,0.2% Triton X-100 室温孵育 15 min,分别加入抗 SIRT1 或 GFP 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 洗涤 5 min 3 次后,加入与相应 FITC 标记的二抗,避光孵育 1 h,PBS 洗涤 5 min 3 次,加入即用型 DAPI 工作液室温孵育 5 min,PBS 洗涤后,荧光显微镜下观察并采集图像。

1.2.7 流式细胞术细胞凋亡检测 待细胞培养至密度 70%~80% 后,胰酶消化细胞,吹打成单细胞悬液,PBS 洗涤细胞后,加入预冷的结合缓冲液重悬细胞至浓度为 10⁵~10⁶/mL,加入适量 Annexin V-FITC 和 PI 并轻轻混匀,避光冰孵 10 min,流式细胞仪检测。

1.2.8 CCK-8 细胞毒性实验 利用完全培养基将细胞稀释成 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 以每孔 $100 \mu\text{L}$ 将细胞均匀铺至 96 孔板中, 次日待细胞完全贴壁后, 缺氧处理 0 h、6 h、12 h、24 h; 弃去原培养液后, 每孔加入含 10% CCK-8 的无血清培养基, 孵育 2 h, 用酶标仪测定 450 nm 波长下的 OD 值, 以 0 h 组 OD 值的均数作为 100%, 计算各实验组细胞的存活率。

1.2.9 TUNEL 细胞凋亡检测 待细胞贴壁后, 用预冷 4% 多聚甲醛固定 1 h, PBS 冲洗后, 0.2% Triton X-100 冰孵 10 min, PBS 冲洗后, 加入 TUNEL routine mixture, 37°C 避光孵育 60 min, PBS 洗涤 5 min 3 次, 加入即用型 DAPI 工作液, 室温孵育 5 min。PBS 洗涤后, 荧光显微镜下观察并采集图像。

1.3 统计学方法

利用 SPSS 22.0 软件进行分析, 统计图由 Graphpad Prism (Version 5.0) 软件制作。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组数据的组间比较采用 student's *t* 检验, 两组以上数据的组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 时具有统计学意义。

2 结果

2.1 稳定表达 SIRT1 结直肠癌细胞株鉴定

对慢病毒转染及筛选后细胞进行 real-time PCR (图 1A) 检测, 结果证实与亲本细胞 (HCT116) 相比, LV-SIRT1 细胞和 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞均存在 SIRT1 mRNA 的过表达。由于我们所用的慢病毒表达载体能够将外源性基因与 GFP 进行融合表达, 因此可以通过检测 SIRT1-GFP 或 GFP 蛋白间接了解外源性 SIRT1 的表达情况, 通过对细胞总蛋白进行 Western blot 检测 (图 1B), 我们初步证实 LV-SIRT1 细胞和 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞均存在外源性 SIRT1 蛋白的过表达; 对分离提取的胞质、胞核蛋白分别进行 Western blot 检测 (图 1C), 结果进一步证实 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞中外源性 SIRT1 主要分布于细胞质内, 说明突变 NLSs 序列能够阻遏 SIRT1 的核-质穿梭, 使其在细胞质中富集。为了更直观地观察外源性 SIRT1 在转染细胞的亚细胞定位情况, 我们利用抗 SIRT1 和抗 GFP 抗体分别对细胞内总 SIRT1 和外源性 SIRT1 进行了免疫荧光染色观察, 如图 1D 和 1E 所示, 尽管外源性 SIRT1 (红色荧光) 在 LV-SIRT1 和 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞的胞核和胞质内均有阳性表达, 但在 LV-SIRT1 细胞主要富集于细胞核, 在 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞主要集中在细胞质。

2.2 SIRT1 亚细胞定位影响缺氧微环境下的结直肠癌细胞凋亡

将 LV-SIRT1、LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞及其亲本细胞 (HCT116) 分别置于缺氧小室内培养 24 h, 利用 CCK-8 细胞毒性实验检测三种细胞株对缺氧的耐受能力 (图 2A), 结果发现与亲本细胞相比, LV-SIRT1 细胞最不耐受缺氧 ($P < 0.01$), 而 LV-SIRT1^{NLSmt} 无统计学差异 ($P > 0.05$); 细胞凋亡流式细胞术检测结果显示 (图 2B), LV-SIRT1 细胞较亲本细胞凋亡比例显著增高 ($P < 0.01$), 而 LV-SIRT1^{NLSmt} 凋亡细胞比例较亲本细胞相比无统计学差异 ($P > 0.05$); TUNEL 检测结果 (图 2C) 进一步证实 LV-SIRT1 细胞的凋亡小体比例在三组细胞株中最多 ($P < 0.0001$)。以上结果均提示 SIRT1 亚细胞定位能够影响缺氧微环境下的结直肠癌细胞凋亡, 细胞核定位的 SIRT1 促进结直肠癌细胞的凋亡。

2.3 细胞核定位的 SIRT1 通过调控 p53 影响细胞凋亡

为了探讨缺氧微环境下 SIRT1 参与结直肠癌细胞凋亡的调控机制, 我们利用 Western blot 对缺氧 24 h 的三组细胞株进行了 p53、ac-p53 (K382, SIRT1 去乙酰化 p53 的特异性位点) 及相关凋亡蛋白 Bcl-2、Bax、caspase-3 和 cleaved caspase-3 表达水平的检测 (图 3A、3B), 在缺氧条件, LV-SIRT1 细胞和 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞较亲本细胞的 p53、Bax、caspase-3、cleaved caspase-3 表达水平增加, 且上述蛋白的表达水平在 LV-SIRT1 细胞中增高最为显著; LV-SIRT1 细胞和 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞较亲本细胞的 ac-p53 和 Bcl-2 表达水平显著下降, 其中 ac-p53 表达水平的变化以 LV-SIRT1 细胞下降最为显著。通过对分离提取的胞质、胞核蛋白分别进行 Western blot 检测 (图 3C) 发现, 在缺氧条件下, 尽管 HCT116、LV-SIRT1 和 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞的胞核 ac-p53 表达水平均显著下降, 但 LV-SIRT1 细胞 ac-p53 表达水平较 LV-SIRT1^{NLSmt} 和 HCT116 显著更为下降。根据以上结果, 我们推测细胞核定位的 SIRT1 通过去乙酰化 ac-p53, 抑制 p53 功能, 从而促进细胞凋亡。

3 讨论

凋亡是细胞对生理或病理性应激所产生的反应, 属于一种特定的程序性死亡过程, 通过一系列基因的激活、表达以及调控等, 机体能够适应其周围环境变化或减缓应激引发损伤, 维持细胞存活与死亡之间的平衡, 对维持细胞基因组完整性以及修复损伤的 DNA 片段都起到至关重要的作用^[12]。细胞凋亡的失衡被认为是肿瘤的重要特征之一^[13], 恶性肿瘤常具有异常的细胞凋亡信号改变, 以利于细胞增殖、转移^[14,15]和增加对抗瘤治疗的抵抗^[16], 因此对肿瘤细胞的凋亡机制的研究显得尤为重要。

结直肠癌属于实体瘤, 缺氧微环境对肿瘤的生物行为具有重要的影响。SIRT1 是一种重要的 III 型组蛋白 / 非组蛋白去乙酰化酶, 能够通过与底物相互作用而影响蛋白的生物学功能, 在肿瘤的发生和演进中发挥重要作用^[17]。我们课题组最近报道缺氧抑制结直肠癌细胞 SIRT1 mRNA 和蛋白表达, 其机制涉及 EGR1 对 SIRT1 转录过程的调控, 并可能通过 SIRT1 NF- κ B MMPs 通路, 促进结直肠癌细胞的侵袭和迁移^[10]。

尽管 SIRT1 调控细胞凋亡及相关靶分子研究已有较多文献报道, 但研究结论存在争议。有研究表明 SIRT1 能够抑制细胞凋亡, 例如: SIRT1 促进 MC3T3-E1 成骨细胞的自噬进而保护细胞免受氧诱导的凋亡, 其机制可能涉及 SIRT1-FoxO1-Rab7 轴和 SIRT1-FoxO3-Bin3 轴^[18]; SIRT1 通过去乙酰化与蛋白激酶 B 结合的半胱天冬酶 3,9 位点赖氨酸残基, 降低其信号通路的活性, 发挥抗凋亡作用^[19]; SIRT1 通过影响 ERK1/2 通路抑制人类颗粒细胞的凋亡^[20]。然而也有文献报道 SIRT1 具有促凋亡作用, 例如肝细胞癌中存在 p53 miR-34a SIRT1 信号反馈环并促进细胞凋亡。鉴于 SIRT1 的主要功能是使组蛋白和某些非组蛋白 (如转录因子 p53 等) 去乙酰化, 因此, 有学者推测 SIRT1 的不同亚细胞定位可能会影响其功能, 这也有助于解释 SIRT1 所具有的双重作用^[21]。在本研究中, 我们发现过表达 SIRT1 能够促进结直肠癌细胞凋亡, 且细胞核定位的 SIRT1 对细胞凋亡的促进作用较为显著, 细胞核过表达 SIRT1 的细胞 ac-p53 明显降低, 进一步提示 SIRT1 的亚细胞定位能够影响缺氧微环境下的细胞凋亡, 其机制可能涉及 p53 相关凋亡的信号通路。

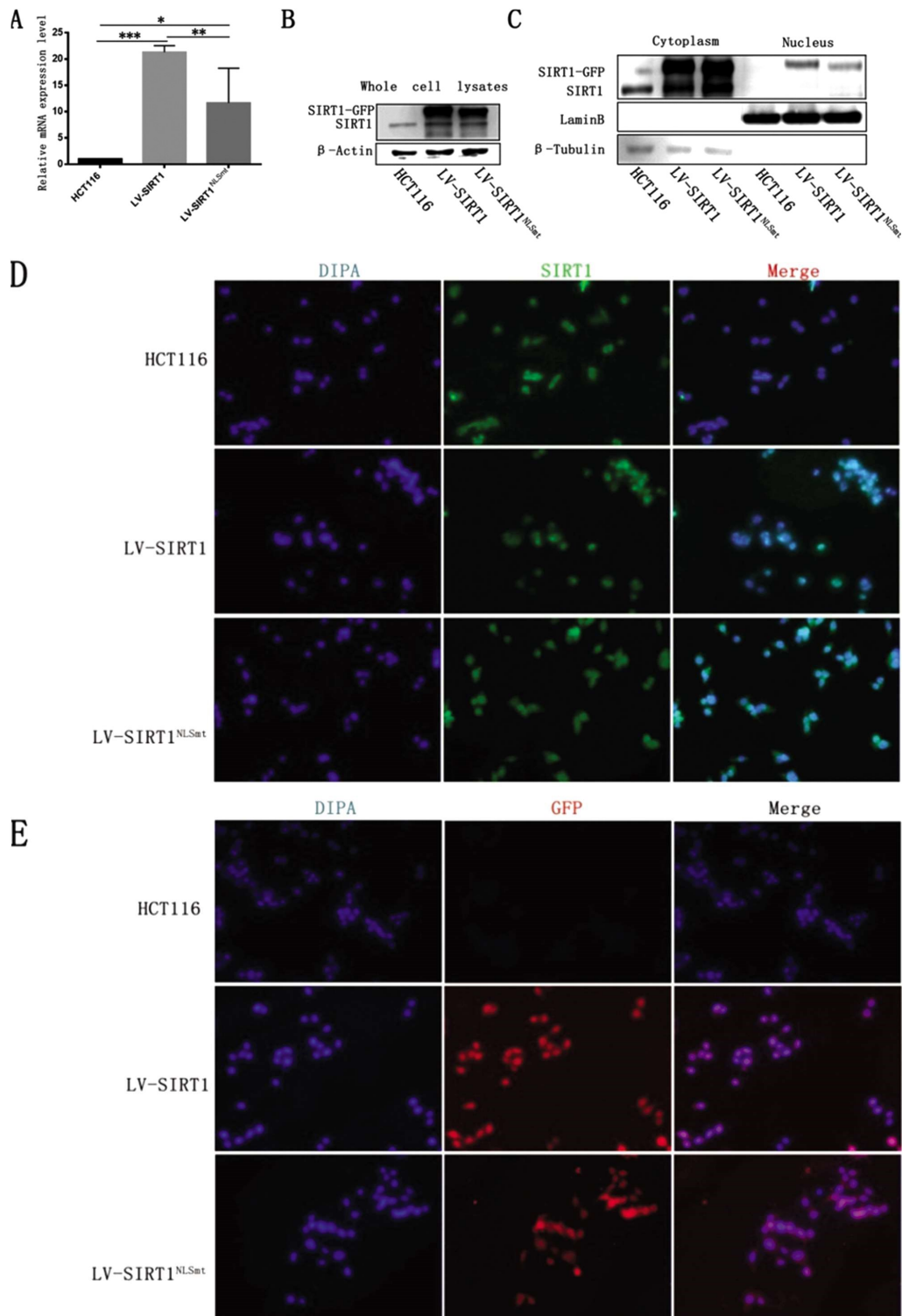


图1 过表达 SIRT1 和 SIRT1^{NLSmt} 的结直肠癌 HCT116 细胞 SIRT1 亚细胞定位和表达分析

A. real-time PCR 检测亲本细胞 HCT116、LV-SIRT1 和 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞中 SIRT1 mRNA 表达水平 (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$)。B. Western blot 检测 HCT116、LV-SIRT1 和 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞总蛋白 SIRT1 表达水平。C. Western blot 检测 HCT116、LV-SIRT1 和 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞的细胞核和细胞质 SIRT1 表达水平。D. 免疫荧光染色检测 HCT116、LV-SIRT1 和 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞的 SIRT1 表达情况。E. 免疫荧光染色检测 HCT116、LV-SIRT1 和 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞的 GFP 表达情况。(D 和 E, 放大倍数 400 倍)。

Fig. 1 Analyses of SIRT1 subcellular location and expression in colorectal carcinoma HCT116 cells overexpressing SIRT1 (LV-SIRT1 cells) or NLS-mutated SIRT1 (LV-SIRT1^{NLSmt} cells).

A. SIRT1 mRNA levels as measured by real-time PCR in the parental (HCT116), LV-SIRT1 and LV-SIRT1^{NLSmt} cells. (* $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$). B. Western blot analyses of SIRT1 expression in HCT116, LV-SIRT1 and LV-SIRT1^{NLSmt} cells. C. SIRT1 protein expression in cytoplasmic and nuclear extracts from HCT116, LV-SIRT1 and LV-SIRT1^{NLSmt} cells. D. Immunofluorescence staining of SIRT1 in HCT116, LV-SIRT1 and LV-SIRT1^{NLSmt} cells. E. Immunofluorescence staining of GFP in HCT116, LV-SIRT1 and LV-SIRT1^{NLSmt} cells. (D and F, original magnification $\times$ 400)

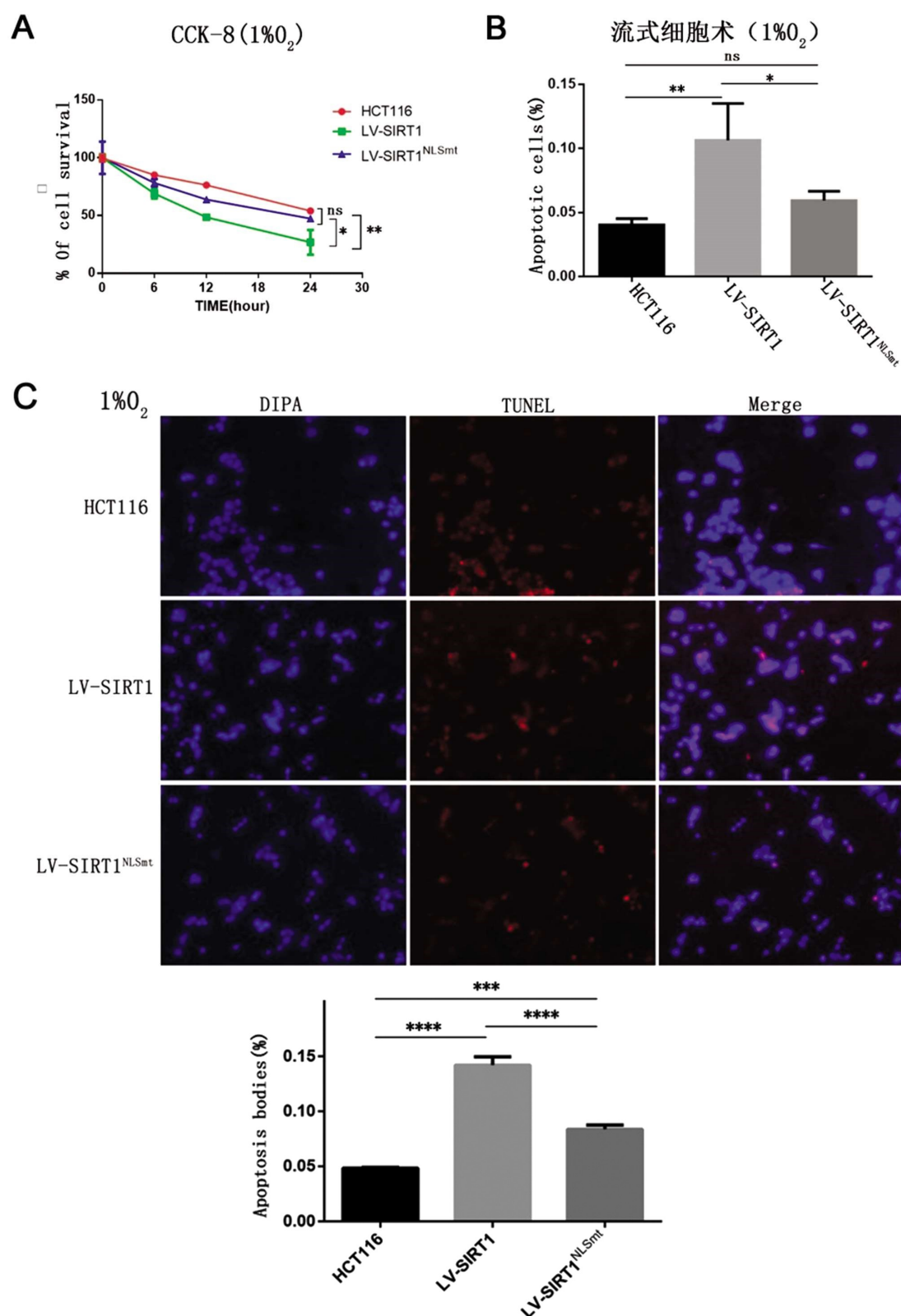


图2 SIRT1亚细胞定位对缺氧微环境下结直肠癌细胞的影响

A. CCK-8 实验检测 HCT116、LV-SIRT1 和 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞缺氧 24 h 的细胞存活率。B. 流式细胞术检测 HCT116、LV-SIRT1 和 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞缺氧 24 h 的细胞凋亡情况。C. TUNEL 染色检测 HCT116、LV-SIRT1 和 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞缺氧 24 h 的细胞凋亡情况(上方,放大倍数 400 倍),统计学分析结果见下方。(ns,无统计学意义;* $P<0.05$;** $P<0.01$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)

Fig. 2 Effect of SIRT1 subcellular localization on colorectal carcinoma cells under hypoxic microenvironment

A. The viabilities of HCT116, LV-SIRT1 and LV-SIRT1^{NLSmt} cell after 24 h hypoxic treatment were analyzed by CCK-8 experiment.

B. The cell apoptosis of HCT116, LV-SIRT1 and LV-SIRT1^{NLSmt} cell after 24 h hypoxic treatment were analyzed by flow cytometry. C. The cell apoptosis of HCT116, LV-SIRT1 and LV-SIRT1^{NLSmt} cell after 24 h hypoxic treatment were analyzed by TUNEL staining (top panel, original magnification $\times 400$).

The statistical results were shown at bottom panel (ns, not significant; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$).

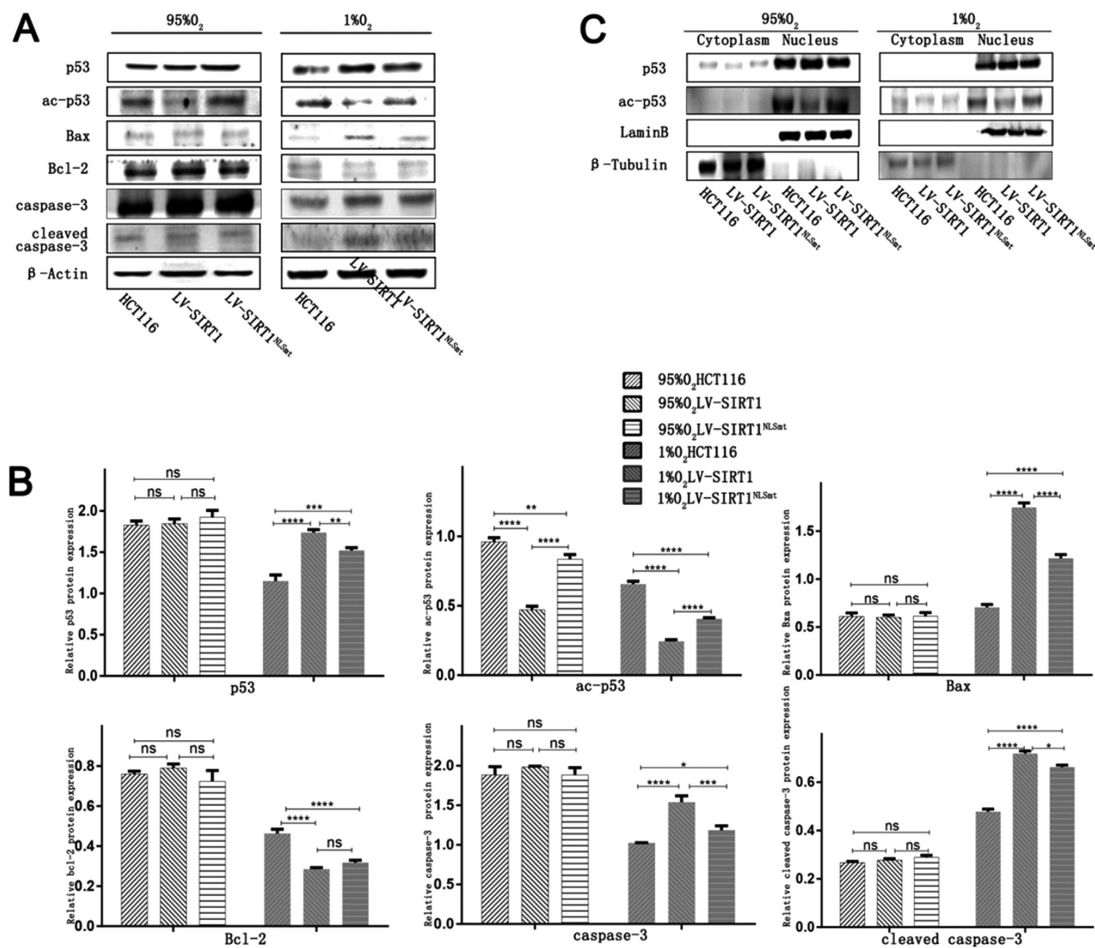


图 3 SIRT1 亚细胞定位对缺氧微环境下结直肠癌细胞凋亡相关蛋白及去乙酰化 p53 蛋白的影响

A. Western blot 检测 HCT116、LV-SIRT1 和 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞缺氧 24 h 后凋亡相关蛋白和 p53 乙酰化蛋白的表达水平。B. Western blot 结果的统计学分析(ns,无统计学意义;* $P<0.05$;** $P<0.01$ *** $P<0.001$ **** $P<0.0001$)。C. Western blot 检测 HCT116、LV-SIRT1 和 LV-SIRT1^{NLSmt} 细胞缺氧 24 h 后细胞浆和细胞核内 SIRT1、p53 乙酰化蛋白的表达水平。

Fig. 3 Effect of SIRT1 subcellular localization on colorectal carcinoma cells under hypoxic microenvironment

A. The expression levels of cell apoptotic proteins and acetylated p53 in HCT116, LV-SIRT1 and LV-SIRT1^{NLSmt} cell after 24 h hypoxic treatment were analyzed by Western blot analyses. B. Statistical analyses of the results (ns, not significant; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$). C. The expression levels of SIRT1 and acetylated p53 in cytoplasmic and nuclear extracts from HCT116, LV-SIRT1 and LV-SIRT1^{NLSmt} cells after 24 h hypoxic treatment.

p53 是一种核转录因子,属于肿瘤抑制因子,调控细胞转录、DNA 合成和修复、细胞周期停滞和凋亡等过程^[22,23]。对 p53 的调控主要发生在翻译后修饰水平(如乙酰化、磷酸化和泛素化修饰等),在 DNA 损伤应答过程中,p53 的乙酰化水平与其活性呈正相关^[24]。

抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 隶属于 Bcl-2 蛋白家族^[25],Bcl-2 与 Bax 的水平能够影响细胞凋亡^[26]。p53 自细胞质易位到线粒体、破坏 Bcl-2/Bax 比值,可导致细胞色素 C 释放,激活介导的诱导半胱氨酸蛋白酶和其他促凋亡因子^[27,28]。caspase-3 属于半胱氨酸蛋白酶家族成员,在调节细胞凋亡中起着重要作用^[29],过表达 Bcl-2 或 Bax 蛋白能控制细胞色素 C 的释放及其下游 caspase-3 蛋白酶的活化,从而导致细胞的存活或死亡^[30],而 caspase 依赖性信号通路的激活是通过其蛋白前体的裂解来实现的,由 caspase-9 或 caspase-8 引发 caspase-3 的下游激活,最终导致细胞凋亡^[31]。在本研究中我们发现, LV-SIRT1 细胞较亲本细胞 HCT116 和 LV-SIRT1^{NLSmt} 对缺氧耐受能力

最差,细胞凋亡水平最高,p53、Bax、caspase-3、cleaved caspase-3 表达水平显著升高,ac-p53(K382)和 Bcl-2 表达水平显著下降,且 LV-SIRT1 细胞的胞核 ac-p53 下降最为显著,据此推测,在缺氧微环境中,SIRT1 可能通过改变 p53 去乙酰化水平进而影响结直肠癌细胞凋亡。

综上所述,我们研究结果发现过表达 SIRT1 促进缺氧微环境下结直肠癌细胞的凋亡,且细胞核定位的 SIRT1 对细胞凋亡的促进作用更显著,其机制涉及 SIRT1 对 p53 K382 的去乙酰化作用。由于缺氧性肿瘤微环境对结直肠癌的发生和进展有着重要作用,该实验结果为未来临床治疗结直肠癌提供了可能的靶点。

参考文献(References)

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2019 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2019, 69(1): 7-34
- [2] Siegel R L, Miller K D, Fedewa S A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017[J]. Ca A Cancer Journal for Clinicians, 2017, 67(3): 104-117

- [3] Petrova V, Melino G, Amelio I. The hypoxic tumour microenvironment[J]. *Oncogenesis*, 2018, 7(1): 10
- [4] Hoogsteen I J, Marres H a M, Kogel A J, et al. The hypoxic tumour microenvironment, patient selection and hypoxia-modifying treatments[J]. *Clinical Oncology*, 2007, 19(6): 385-396
- [5] Song N Y, Surh Y J. Janus-faced role of SIRT1 in tumorigenesis[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2012, 1271(1): 10-19
- [6] Mcburney M W, Xiaofeng Y, Karen J, et al. The mammalian Sir2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis[J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2003, 23(1): 38-54
- [7] Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, et al. Predominant expression of Sir2 α , an NAD-dependent histone deacetylase, in the embryonic mouse heart and brain[J]. *FEBS Lett*, 2004, 556(1-3): 0-286
- [8] Masaya T, Jun S, Tetsuji M, et al. Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(9): 6823-6832
- [9] Moynihan K A, Grimm A A, Plueger M M, et al. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice[J]. *Cell Metabolism*, 2005, 2(2): 105-117
- [10] Yu S, Zhou R, Yang T, et al. Hypoxia promotes colorectal cancer cell migration and invasion in a SIRT1-dependent manner[J]. *Cancer Cell International*, 2019, 19(1): 116
- [11] Yang T, Zhou R, Yu S, et al. Cytoplasmic SIRT1 inhibits cell migration and invasion by impeding epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 459(1-2): 157-169
- [12] Halazonetis T D, Gorgoulis V G, Jiri B. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development[J]. *Science*, 2008, 319(5868): 1352-1355
- [13] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674
- [14] Fulda S. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer [J]. *Int J Cell Biol*, 2009, 2010(22): 370835
- [15] Plati J, Bucur O F, R. Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010, 104(4): 1124-1149
- [16] Gimenez-Bonafe P, Tortosa A, Perez-Tomas R. Overcoming Drug Resistance by Enhancing Apoptosis of Tumor Cells [J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2009, 9(3): 320-340
- [17] Tao L, Pei Y, Liu, Marshall G M. The critical role of the class III histone deacetylase SIRT1 in cancer [J]. *Cancer Research*, 2009, 69(5): 1702-1705
- [18] Gu X, Han D, Chen W, et al. SIRT1-mediated FoxOs pathways protect against apoptosis by promoting autophagy in osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to sodium fluoride [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(40): 65218-65230
- [19] Zhou L, Wang S I, Moon Y J, et al. Overexpression of SIRT1 prevents hypoxia induced apoptosis in osteoblast cells [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 16(3): 2969
- [20] Han Y, Luo H, Wang H, et al. SIRT1 induces resistance to apoptosis in human granulosa cells by activating the ERK pathway and inhibiting NF- κ B signaling with anti-inflammatory functions [J]. *Apoptosis An International Journal on Programmed Cell Death*, 2017, 22(10): 1-13
- [21] Bai W, Zhang X. Nucleus or cytoplasm? The mysterious case of SIRT1's subcellular localization [J]. *Cell Cycle*, 2016, 15 (24): 3337-3338
- [22] Fiona M Z, Slee E A, Xin L. A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9(9): 702
- [23] Pratheeshkumar P, Girija K. Oleanolic acid induces apoptosis by modulating p53, Bax, Bcl-2 and caspase-3 gene expression and regulates the activation of transcription factors and cytokine profile in B16F1[J]. *Journal of Environmental Pathology Toxicology & Oncology Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology & Cancer*, 2011, 30(1): 21-31
- [24] Kruse J P, Gu W. Modes of p53 Regulation: Cell [J]. *Cell*, 2009, 137(4): 609-622
- [25] Farrow S N, Brown R. New members of the Bcl-2 family and their protein partners [J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1996, 6(1): 45-49
- [26] Basu A, Halder S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death [J]. *Molecular Human Reproduction*, 1998, 4(12): 1099-1109
- [27] Changjiang W, Yuan L, Dan X, et al. Specific cleavage of Mcl-1 by caspase-3 in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(11): 10491
- [28] Salvesen G S. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2002, 9(1): 3-5
- [29] Köhler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 265(1): 97-110
- [30] Luca S, Korsmeyer S J. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 304(3): 437-444
- [31] Fischer U, JäNicke R U, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates[J]. *Cell Death Differentiation*, 2003, 10(1): 76