

研究论文

*SIRT2*对裸鼠原位肝癌生长和肺转移的影响及其机制研究

杨秋霞 周洪钟 任吉华 李宛蔚 陶娜娜 程胜桃 何琳 余海波 龚蕊 陈娟*
(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016)

摘要 该文旨在探讨沉默信息调节因子2(silent information regulator 2, *SIRT2*)基因敲低对裸鼠原位肝癌生长和肺部转移的影响。应用杀稻瘟菌素筛选构建稳定敲低*SIRT2*基因的SK-Hep-1细胞,应用定量逆转录PCR(qRT-PCR)和Western blot检测其敲低效率。将稳定敲*SIRT2*基因的细胞(*SIRT2*-shRNA-SK-Hep-1)和对照组细胞(shCont-SK-Hep-1)原位注入裸鼠肝脏,8周后处死裸鼠并取出肝脏和肺组织,比较两组裸鼠肝癌肿瘤的大小及肺转移结节的数量。应用Western blot和免疫组织化学检测两组裸鼠肝癌组织中*SIRT2*、p-AKT、AKT、p-GSK3 β 、GSK3 β 、active β -catenin和 β -catenin的蛋白质水平。结果显示,稳定敲低*SIRT2*基因的SK-Hep-1细胞系构建成功。裸鼠原位肝癌肺转移模型中,相比shCont-SK-Hep-1组,*SIRT2*-shRNA-SK-Hep-1组裸鼠原位肝癌体积减小($P < 0.05$),肺转移结节数量明显减少($P < 0.05$)。Western blot结果表明,敲低*SIRT2*基因的裸鼠组p-AKT、p-GSK3 β 、active β -catenin、 β -catenin蛋白质水平降低,GSK3 β 水平升高,AKT水平无差异;免疫组织化学结果表明,敲低*SIRT2*基因的裸鼠组p-AKT、p-GSK3 β 、 β -catenin蛋白质水平降低。本研究结果提示,在裸鼠原位肝癌肺转移模型中,敲低*SIRT2*基因可以通过激活AKT的表达影响GSK3 β / β -catenin信号通路,从而抑制人肝癌细胞的生长和肺转移。

关键词 肝细胞癌; 肝癌肺转移; 生长; *SIRT2*

Effects of *SIRT2* on Growth and Lung Metastasis of Orthotopic Liver Cancer in Nude Mice and Its Mechanism

Yang Qiuxia, Zhou Hongzhong, Ren Jihua, Li Wanyu, Tao Nana, Cheng Shengtao, He Lin,
Yu Haibo, Gong Rui, Chen Juan*

(Key Laboratory of Molecular Biology on Infection Diseases of Ministry of Education,
Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the effects of *SIRT2* on growth and lung metastasis of orthotopic liver cancer in nude mice. SK-Hep-1 cells with stable knockdown of *SIRT2* were screened with blasticidin and its knockdown efficiency was detected by qRT-PCR and Western blot. *SIRT2*-shRNA-SK-Hep-1 and shCont-SK-Hep-1 cells were respectively injected into the orthotopic liver of nude mice. The liver and lung tissues of nude mice were removed after 8 weeks of injection. The size of orthotopic liver cancer and the

收稿日期: 2017-08-16 接受日期: 2017-12-06

国家自然科学基金(批准号: 81472271、81672012)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68486780, E-mail: yixin_xinyuan@163.com

Received: August 16, 2017 Accepted: December 6, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81472271, 81672012)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68486780, E-mail: yixin_xinyuan@163.com

网络出版时间: 2018-03-09 15:27:23

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180309.1527.010.html>

number of lung metastatic nodules were compared between the two groups. Next, the protein levels of *SIRT2*, p-AKT, AKT, p-GSK3 β , GSK3 β , active β -catenin and β -catenin in nude mice were detected by Western blot and immunohistochemistry. The results showed SK-Hep-1 cell lines with stable knockdown of *SIRT2* were successfully established. Compared with shCont-SK-Hep-1 group, the volume of liver cancer in *SIRT2*-shRNA-SK-Hep-1 group was decreased ($P<0.05$) and the number of lung metastatic nodules in *SIRT2*-shRNA-SK-Hep-1 group was decreased significantly ($P<0.05$). Western blot showed that the protein levels of p-AKT, p-GSK3 β , active β -catenin, β -catenin in the *SIRT2* knockdown group were decreased, the protein level of GSK3 β was increased, the protein level of AKT was no difference. Immunohistochemistry showed that the protein levels of p-AKT, p-GSK3 β , β -catenin in the *SIRT2* knockdown group was decreased. The results indicated that *SIRT2* knockdown can inhibit the growth and lung metastasis of human hepatocarcinoma cells by activating AKT, subsequently influencing on GSK3 β / β -catenin signaling pathway in orthotopic liver cancer of nude mice.

Keywords hepatocellular carcinoma; lung metastasis; growth; *SIRT2*

肝细胞癌是常见的原发性恶性肿瘤,为全球第六大常见癌症之一^[1],其死亡率在恶性肿瘤中高居第二。在我国,原发性肝癌的发生率和死亡率也位居各种癌症的前列,且仍呈上升的趋势^[2]。据统计,肝癌是导致60岁以下男性癌症死亡的主要原因^[3],且具有预后差和复发率高的特点。多数肝癌患者在发现时已经发生肝内和肝外的转移,手术难度大,其中位生存期仅6~8月。因此,研究肝癌生长和转移的机制,对发展有效肝癌治疗策略具有重要意义。

沉默信息调节因子(silent information regulators, Sirtuins)家族是一种利用NAD⁺作为辅助因子的组蛋白/非组蛋白去乙酰化酶,其为SIRT2的同类物,Sirtuins在哺乳动物中共有7个成员,包括SIRT1~7。目前研究表明,Sirtuins家族在细胞生长、凋亡、衰老、代谢和昼夜调节等方面发挥着重要的作用,其中,我们前期研究发现,SIRT1、SIRT3和SIRT6都与肝癌的增殖、凋亡密切相关^[4-6]。而SIRT2在肿瘤中的作用也越来越得到人们的重视。研究发现,SIRT2在人神经胶质瘤^[7-8]、乳腺癌^[9]、头颈鳞状细胞癌^[10]、食管腺癌^[11]、浆液性卵巢癌^[12]、结肠癌^[13]、非小细胞肺癌^[14-16]中表达下调;但在急性髓性白血病^[17-18]、成神经细胞瘤^[19]、胰腺癌^[20]和肝癌^[21]中高表达。SIRT2主要位于细胞质中,在细胞周期的G₂/M期时由细胞质转移到细胞核中^[22-23]。SIRT2能够乙酰化多种非组蛋白和组蛋白,如非组蛋白 α -tubulin^[24]、Foxo1^[25]、Foxo3^[26]、p53^[27]和组蛋白3H56^[27]、4K16^[23]等。目前,有关SIRT2在肝癌中作用的报道非常少。本课题组在前期研究中提出,*SIRT2*基因在体外通过AKT/GSK3 β / β -catenin信号通路介导EMT转化从

而影响人肝癌的侵袭转移^[21],由于原发性肝癌具有器官倾向性,所以我们通过建立裸鼠人肝癌细胞肺转移模型,在体内验证SIRT2影响人肝癌细胞侵袭转移的机制。因此,进一步确定有效的体内治疗方法势在必行。

1 材料与方法

1.1 细胞系和试剂材料

人肝癌细胞系 SK-Hep-1 购于 ATCC (American Type Culture Collection) 并培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。靶向 SIRT2 的改良 pLentilox-3.7 慢病毒质粒来源于香港大学, shSIRT2 序列: 5'-GCC AAC CAT CTG TCA CTA CTT-3', shCont 序列: 5'-GCA ACA AGA TGA AGA GCA CCA A-3'。SIRT2 抗体(09-843)和 active β -catenin(clone 8E7, 05-665) 购于 Merck Millipore 公司。Ki-67 抗体(#9027)、p-AKT 抗体(#4060)、AKT 抗体(#2966)、p-GSK3 β 抗体(#9323)、GSK3 β 抗体(#9832)、 β -catenin 抗体(#8480)和 GAPDH 抗体(#97166)均购于 Cell Signaling Technology 公司。杀稻瘟菌素购于 Invitrogen 公司。免疫组织化学试剂盒购于 Vector 公司。裸鼠购于重庆医科大学动物中心。

1.2 构建稳定敲低 *SIRT2* 基因的肝癌细胞系

先接种 4×10^4 孔的 SK-Hep-1 细胞于 24 孔板中, 24 h 后依次加入浓度梯度为 0、1.00、2.50、3.75、5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的杀稻瘟菌素筛选培养基, 每日观察细胞生存情况, 确定细胞全部死亡的最低药物浓度为最低筛选浓度(2.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。接着, 在 6 孔板中接种 10×10^4 孔的 SK-Hep-1 细胞, 24 h 后感染 shCont 和

shSIRT6慢病毒质粒, 48 h后更换为上述最低筛选浓度培养基。每日观察细胞生存情况, 待一个细胞生长成为大小合适的单克隆细胞团, 挑选shCont和shSIRT2组各5个单克隆细胞团进行扩大培养, 检测敲低效率, 选取敲低效果最好的细胞进行后续实验。

1.3 裸鼠原位肝癌肺转移模型的建立

本模型在参考Yuan等^[28]和Xiao等^[29]的工作基础上进行。将3~4周大的10只雄性裸鼠随机分为2组, 分别在裸鼠肝脏注射 2×10^6 shSIRT2-SK-Hep-1和shCont-SK-Hep-1细胞, 待8周后将裸鼠处死, 取裸鼠肝脏和肺组织, 进行HE染色及免疫组织化学实验, 并对实验组与对照组裸鼠肝癌生长和肝癌肺转移情况进行分析。本动物实验经过相关的伦理委员会批准进行。

1.4 Western blot检测蛋白质水平

收集细胞或者约20 mg大小的裸鼠肝癌组织块, 加入适量含蛋白酶抑制剂的蛋白质裂解液, 将组织块用磁珠破碎、溶解, 并置于4 °C摇床充分裂解, 低温 $16\ 000 \times g$ 离心5 min去除沉淀; BCA法测量蛋白质浓度, 在30 μ g蛋白质体积中加入含5% β -ME的6 \times loading, 95 °C变性10 min; 用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 并转移至硝酸纤维素薄膜, 5%脱脂牛奶封闭1.5 h, 一抗4 °C摇床孵育过夜, 次日用含0.05% Tween 20的TBS-T洗膜5 min \times 3次, 室温孵育带有辣根过氧化物酶的二抗2 h, TBS-T洗膜5 min \times 3次, ECL(electronic chemiluminescence)显影。

1.5 qRT-PCR检测mRNA水平

用Trizol(Invitrogen公司)裂解细胞, 提取细胞总RNA, 采用iScriptTM DNA Synthesis Kit(Bio-Rad公司)试剂盒将1 μ g RNA逆转录为cDNA; 以1 μ L cDNA为模板, 加入5 μ L SYBGreen(Roche Diagnostics公司)、上下游引物(10 μ mol/L)各0.2 μ L、3.6 μ L灭菌超纯水, 充分混匀后按照94 °C 20 s、60 °C 20 s、72 °C 15 s, 循环35次的条件进行qRT-PCR。以 β -actin为内参, 每个样品设置3个复孔, 目的基因相对表达水平以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法计算。SIRT2引物序列为F: 5'-CCG GCC TCT ATG ACA ACC TA-3', R: 5'-GGA GTA GCC CCT TGT CCT TC-3'; β -actin引物序列为F: 5'-CTC TTC CAG CCT TCC TTC CT-3', R: 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'。

1.6 HE染色

将小鼠肺部组织置于4%多聚甲醛中固定24~48 h,

制作成厚度为7~10 μ m的石蜡切片。将小鼠肺组织石蜡切片放于烤箱中, 85 °C放置30 min, 随即放入新鲜的二甲苯中脱蜡。再依次将切片置于无水乙醇I、无水乙醇II、95%乙醇、80%乙醇、70%乙醇和双蒸水中水化, 各为1 min。苏木素染色3 min, 分化液分化30 s, 伊红染色20 s, 然后流水冲洗。接着在70%乙醇、80%乙醇、95%乙醇、无水乙醇I、无水乙醇II、二甲苯I和二甲苯II中脱水透明, 各30 s。最后用中性树脂封片, 显微镜拍照观察。

1.7 免疫组织化学

将小鼠肝脏石蜡切片放于烤箱中, 85 °C放置30 min, 随即放入新鲜的二甲苯I 1 min、二甲苯II 1 min, 脱蜡后, 在无乙醇I、无水乙醇II、90%乙醇、70%乙醇和双蒸水中将切片水化, 各为1 min。于微波炉加热柠檬酸抗原修复液中进行抗原修复, 0.5% Triton通透10 min, 3%过氧化氢封闭内源性过氧化氢酶10 min, 封闭15 min。一抗4 °C孵育过夜, 二抗室温孵育1 h, SABC室温孵育1 h, DAB室温染色6~20 min, 镜下观察到有棕黄色颗粒时, 中止反应。苏木素复染3min, 流水冲洗。接着在70%乙醇、90%乙醇、无水乙醇I、无水乙醇II、二甲苯I、二甲苯II中脱水透明, 各30 s。最后用中性树脂封片, 显微镜拍照观察。

免疫组织化学结果判定根据Lavorato-Rocha等^[30]发表的文献, 显微镜下观察目的细胞的染色强度(I)和数量。染色强度评分: 0分为阴性, 1分为弱阳性, 2分为阳性, 3分为强阳性。HScore评分系统分值为细胞染色强度与该强度被染色细胞百分比(PC)的乘积的总和, 即 $HScore = \sum(I \times PC)$ 。HScore分值最大不超过300。

1.8 统计分析

运用SPSS 20.0软件进行统计学分析, 计量资料数据以mean \pm S.D.形式表示, 两组间比较采用配对t检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建稳定敲低SIRT2基因的SK-Hep-1细胞系

收集筛选的shCont-SK-Hep-1和shSIRT2-SK-Hep-1单克隆细胞, 分别应用qRT-PCR和Western blot检测细胞中SIRT2的mRNA和蛋白质水平。结果显示, 与shCont-SK-Hep-1细胞相比, shSIRT2-SK-Hep-1细胞中SIRT2的mRNA水平下降至13%, 差异具有统计

学意义($P < 0.01$, 图1A), 蛋白质水平也明显降低(图1B)。这说明, 稳定敲低*SIRT2*基因的SK-Hep-1细胞系构建成功。

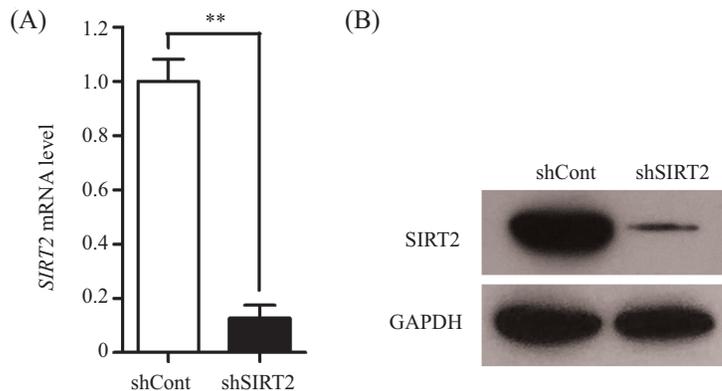
2.2 敲低*SIRT2*基因抑制裸鼠原位肝癌细胞的生长

把构建成功的2组细胞(shCont-SK-Hep-1和*SIRT2*-shRNA-SK-Hep-1)分别注入裸鼠肝脏原位, 8周后将裸鼠处死, 把裸鼠肝脏剥离出。结果显示, *SIRT2*-shRNA-SK-Hep-1组裸鼠原位肝癌体积与shCont-

SK-Hep-1组相比显著减小($P < 0.01$, 图2A和图2B)。应用免疫组织化学检测裸鼠原位肝癌中肿瘤标志物Ki67的蛋白质水平, 结果发现, 与shCont-SK-Hep-1组裸鼠原位肝癌相比, *SIRT2*-shRNA-SK-Hep-1组Ki67蛋白质表达水平降低(图3)。这些结果说明, 敲低*SIRT2*基因能够抑制人肝癌细胞的生长。

2.3 敲低*SIRT2*基因减少裸鼠原位肝癌肺组织转移

为了进一步确定敲低*SIRT2*基因是否影响肝癌

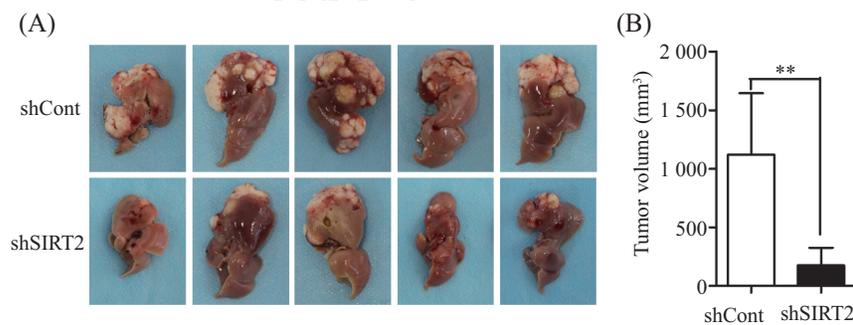


A: qRT-PCR检测稳定细胞系中*SIRT2*基因的mRNA水平, $**P < 0.01$; B: Western blot检测稳定细胞系中*SIRT2*蛋白质水平。

A: the mRNA level of *SIRT2* gene in stable cell lines detected by qRT-PCR, $**P < 0.01$; B: the protein level of *SIRT2* in stable cell lines detected by western blot.

图1 检测稳定细胞系中*SIRT2* mRNA和蛋白质水平

Fig.1 Detection of *SIRT2* mRNA and protein levels in stable cell lines

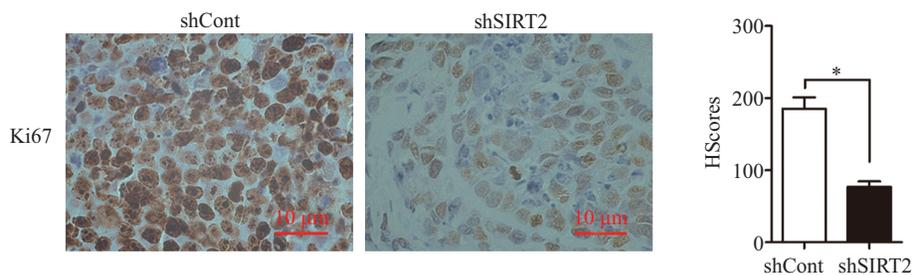


A: 注射8周后裸鼠原位肝癌的实体图; B: 裸鼠原位肝癌的体积, $**P < 0.01$ 。

A: the entity map of orthotopic liver cancer in nude mice at 8 weeks after injection; B: the volume of orthotopic liver cancer, $**P < 0.01$.

图2 敲低*SIRT2*基因对裸鼠原位肝癌体积的影响

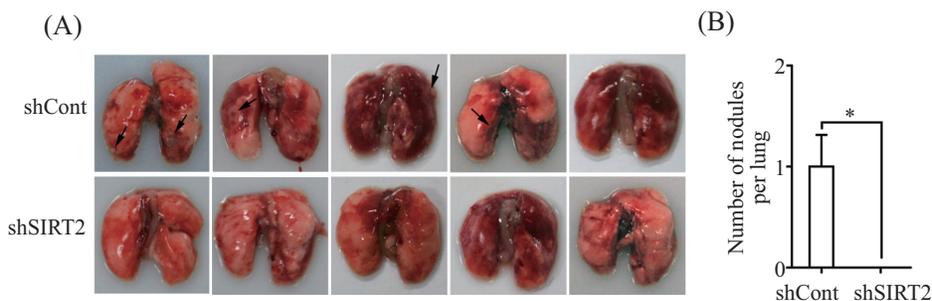
Fig.2 Effects of *SIRT2* gene knockdown on the volume of orthotopic liver cancer in nude mice



$*P < 0.05$.

图3 IHC检测敲低*SIRT2*基因对原位肝癌中Ki67蛋白质水平的影响

Fig.3 Effects of *SIRT2* gene knockdown on the protein level of Ki67 in orthotopic liver cancer detected by IHC

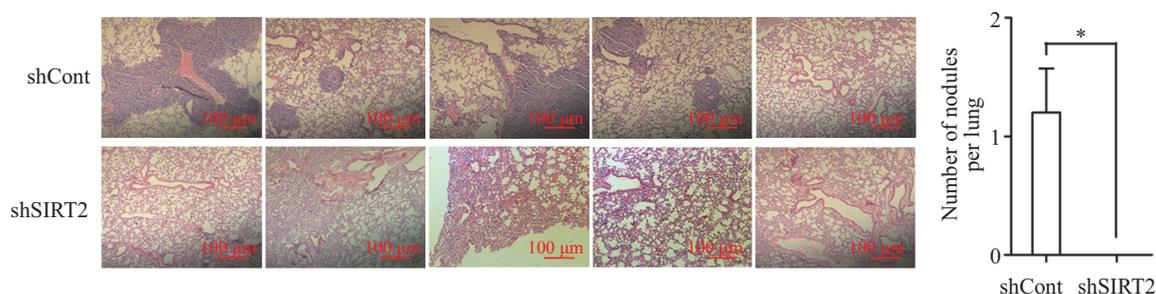


A: 注射8周后裸鼠原位肝癌肺转移的实体图(黑色箭头所指为肿瘤结节); B: 裸鼠原位肝癌肺转移结节的柱状图, * $P < 0.05$ 。

A: the entity map of lung metastasis of orthotopic liver cancer in nude mice at 8 weeks after injection (black arrows refer to tumor nodules); B: the number of lung metastasis nodules of orthotopic liver cancer, * $P < 0.05$.

图4 敲低SIRT2基因对裸鼠原位肝癌肺转移的影响

Fig.4 Effects of SIRT2 knockdown on lung metastases of orthotopic liver cancer in nude mice



* $P < 0.05$.

图5 HE染色检测裸鼠原位肝癌肺转移结节数量

Fig.5 The number of lung metastases nodules of orthotopic liver cancer in nude mice detected by haematoxylin and eosin staining

的转移, 在处死裸鼠取出肝脏的同时剥离肺组织。通过肺组织大体图片和HE染色均发现, 敲低SIRT2基因的裸鼠组其转移性肺结节的数量少于对照组(图4和图5), 进一步提示敲低SIRT2能抑制人肝癌细胞肺转移, 减弱人肝癌细胞恶性程度。

2.4 SIRT2在裸鼠体内通过AKT/GSK3 β / β -catenin信号通路调节人肝癌细胞转移

我们之前的研究发现, SIRT2在体外通过AKT/GSK3 β / β -catenin信号通路影响人肝癌细胞的转移^[2], 那么SIRT2在体内是否也是通过该信号通路发挥作用的? 我们将剥离出的裸鼠肝癌组织充分碾磨裂解并提取总蛋白, 应用Western blot检测SIRT2、p-AKT、AKT、p-GSK3 β 、GSK3 β 、active β -catenin、 β -catenin的蛋白质水平。结果发现, 敲低SIRT2基因后, p-AKT、p-GSK3 β 、active β -catenin、 β -catenin蛋白质水平降低, GSK3 β 表达水平升高, AKT水平无差异(图6)。同时, 应用免疫组织化学检测发现, 敲低SIRT2基因后, SIRT2-shRNA-SK-Hep-1组p-AKT、p-GSK3 β 、 β -catenin蛋白质水平较shCont-SK-Hep-1组降低(图7)。这些结果与之前研究的结果一致, 说

明敲低SIRT2基因通过AKT/GSK3 β / β -catenin信号通路抑制人肝癌细胞转移。

3 讨论

研究发现, SIRT2是一个去乙酰化酶, 其在肿瘤形成过程中发挥的作用具有争议性。一方面, SIRT2在多种肿瘤中发挥抗肿瘤的作用。Du等^[12]发现, SIRT2在浆液性卵巢癌中的表达降低, 而SIRT2表达的降低能够增加细胞周期依赖激酶4的表达, 促进细胞增殖, 并且SIRT2的低表达可以促进SOC细胞转移。Li等^[16]发现, SIRT2在非小细胞肺癌组织和细胞系中低表达, 过表达SIRT2后可以抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡。Zhang等^[13]发现, SIRT2在结肠癌中低表达, 过表达SIRT2会阻碍SW480细胞的增殖和转移。另一方面, SIRT2也可以发挥促肿瘤的作用。Zuo等^[31]发现, SIRT2与HDAC6协同作用, 并促进膀胱癌细胞转移。Xu等^[32]研究表明, SIRT2激活G6PD产生NADPH, 并可以促进白血病细胞增殖。这些结果说明, SIRT2在不同恶性肿瘤中具有表达和功能特异性。我们在前期体外研究发现, SIRT2可以促进

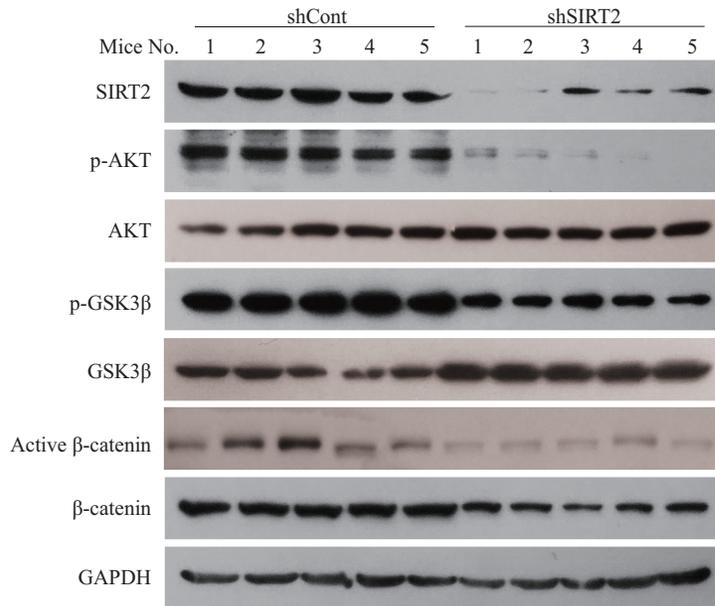
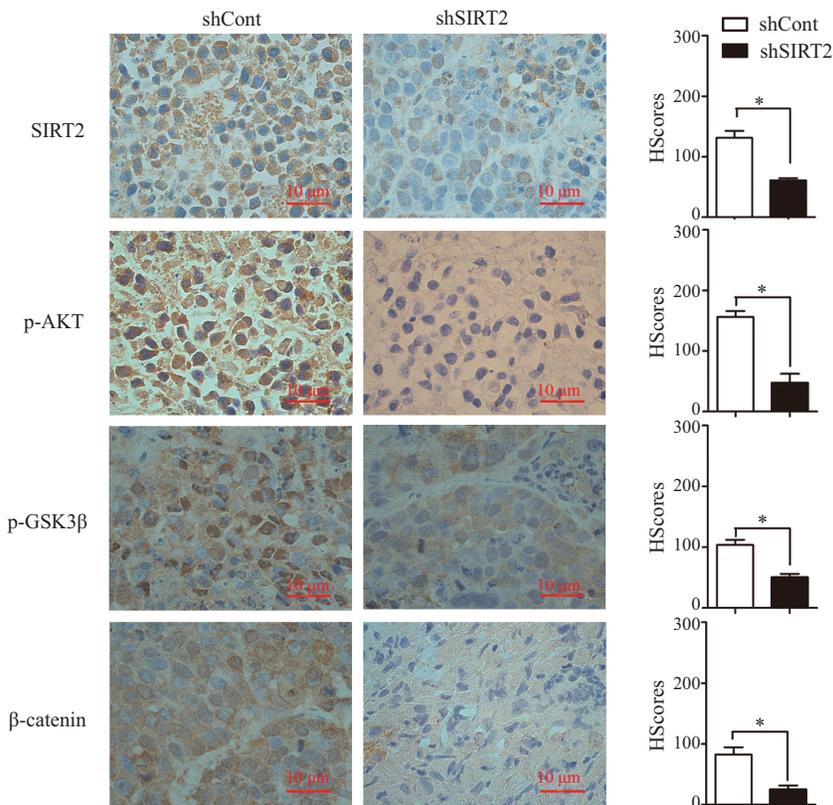


图6 Western blot检测敲低*SIRT2*对裸鼠原位肝癌中p-AKT、AKT、p-GSK3β、GSK3β、active β-catenin和β-catenin蛋白质水平的影响

Fig.6 Effects of *SIRT2* knockdown on protein levels of p-AKT, AKT, p-GSK3β, GSK3β, active β-catenin and β-catenin detected by Western blot



* $P < 0.05$.

图7 IHC检测敲低*SIRT2*对裸鼠原位肝癌中p-AKT、p-GSK3β和β-catenin蛋白质水平的影响

Fig.7 Effects of *SIRT2* knockdown on expression levels of p-AKT, p-GSK3β and β-catenin detected by IHC

人肝癌细胞的增殖和转移^[21], 因此, 我们将进一步在此基础上验证在裸鼠体内, 敲低*SIRT2*基因是否影响

人肝癌细胞的生长和转移。首先, 我们成功构建了稳定敲低*SIRT2*基因的SK-Hep-1细胞系, 并将*SIRT2*-

shRNA-SK-Hep-1组和shCont-SK-Hep-1组细胞注入裸鼠肝脏建立裸鼠原位肝癌肺转移模型, 每组各5只, 8周后处死裸鼠。本次裸鼠原位肝癌肺转移模型的建模成功率为100%, 与SIRT2-shRNA-SK-Hep-1组裸鼠相比, shCont-SK-Hep-1组裸鼠精神差、食欲减少, 有明显腹水等肝癌临床表现出现, 随后观察到敲低SIRT2基因后裸鼠组肝癌组织体积明显小于对照组, 且裸鼠肝癌肺转移能力显著弱于对照组。这说明, 高表达SIRT2是引起人肝癌细胞恶性发展的因素之一。同时, 提示在裸鼠体内, 敲低SIRT2基因能够抑制人肝癌细胞的生长和肺部转移能力, 这与前期体外研究发现在人肝癌细胞中敲低SIRT2基因抑制人肝癌细胞生长和迁移侵袭能力的结果是一致的。

肝细胞癌转移是影响肝癌治疗效果的重要原因, 其作用机制是多年来一直关注的重点。其中, 肝细胞癌的侵袭转移与Wnt/GSK3 β / β -catenin信号通路密切相关。多篇研究发现, 多种信号分子通过调控Wnt/GSK3 β / β -catenin信号通路来影响人肝癌细胞的侵袭转移。Liu等^[33]发现, SGK2通过调控GSK3 β / β -catenin信号通路促进人肝癌细胞迁移和侵袭。Guo等^[34]发现, miRNA-500a通过直接结合SFPR2和GSK3 β , 激活Wnt/ β -catenin信号通路从而促进肝癌细胞迁移侵袭。Qin等^[35]发现, 黄芪甲苷通过AKT/GSK3 β / β -catenin信号通路阻止EMT转化, 从而抑制肝癌细胞转移。Wu等^[36]发现, 在裸鼠肝癌皮下移植瘤中, 花椒属植物提取物通过加强GSK3 β 来减弱 β -catenin表达, 从而减弱HA22T细胞的转移能力。这些结果说明, β -catenin在肝癌侵袭转移中发挥了重要的作用。此外, 有研究表明, β -catenin的S33、S37、T41位点磷酸化受GSK3 β 的调控^[37], Dishevelled存在的条件下, 可以激活AKT结合到Axin-GSK3 β 复合物上, 使GSK3 β 失活, 从而增加游离的去磷酸化 β -catenin^[38]; 去磷酸化的 β -catenin为活化状态, 可进入核内与转录因子结合, 促进基因的转录表达^[39], 从而调节细胞增殖分化; 并且有文献报道, SIRT2可以直接与 β -catenin结合, 从而抑制Wnt信号通路应答辐射引起的压力^[40]。以上研究提示, SIRT2可能与 β -catenin信号通路密切相关。在我们之前的机制研究中也发现, 在人肝癌细胞中, SIRT2激活AKT和GSK3 β 的磷酸化, 活化 β -catenin, 从而调控GSK3 β / β -catenin信号通路引起EMT^[21]。进一步, 在本研究的裸鼠人肝癌肺转移模型中, 应用Western

blot和免疫组织化学技术检测均发现, 敲低SIRT2后, 裸鼠肝癌组织p-AKT、p-GSK3 β 、active β -catenin、 β -catenin蛋白质水平均下降, 这提示SIRT2在裸鼠体内也是通过AKT/GSK3 β / β -catenin信号通路影响人肝癌细胞转移的, 这一发现有利于为肝癌的治疗提供新的靶点。

参考文献 (References)

- 1 Ferenci P, Fried M, Labrecque D, Bruix J, Sherman M, Omata M, *et al.* Hepatocellular carcinoma (HCC): a global perspective. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44(4): 239-45.
- 2 Chen W, Zheng R, Baade PD, Zhang S, Zeng H, Bray F, *et al.* Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(2): 115-32.
- 3 Wang R, Chen XZ, Zhang MG, Tang L, Wu H. Incidence and mortality of liver cancer in mainland China: changes in first decade of 21st century. *Hepato-Gastroenterol* 2015; 62(137): 118-21.
- 4 Chen J, Zhang B, Wong N, Lo AW, To KF, Chan AW, *et al.* Sirtuin 1 is upregulated in a subset of hepatocellular carcinomas where it is essential for telomere maintenance and tumor cell growth. *Cancer Res* 2011; 71(12): 4138-49.
- 5 Song CL, Tang H, Ran LK, Ko BC, Zhang ZZ, Chen X, *et al.* Sirtuin 3 inhibits hepatocellular carcinoma growth through the glycogen synthase kinase-3 β /BCL2-associated X protein-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2016; 35(5): 631-41.
- 6 Ran LK, Chen Y, Zhang ZZ, Tao NN, Ren JH, Zhou L, *et al.* SIRT6 overexpression potentiates apoptosis evasion in hepatocellular carcinoma via BCL2-associated X protein-dependent apoptotic pathway. *Clin Cancer Res* 2016; 22(13): 3372-82.
- 7 Hiratsuka M, Inoue T, Toda T, Kimura N, Shirayoshi Y, Kamitani H, *et al.* Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309(3): 558-66.
- 8 Inoue T, Hiratsuka M, Osaki M, Yamada H, Kishimoto I, Yamaguchi S, *et al.* SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. *Oncogene* 2007; 26(7): 945-57.
- 9 Kim HS, Vassilopoulos A, Wang RH, Lahusen T, Xiao Z, Xu X, *et al.* SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity. *Cancer Cell* 2011; 20(4): 487-99.
- 10 Lai CC, Lin PM, Lin SF, Hsu CH, Lin HC, Hu ML, *et al.* Altered expression of SIRT gene family in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumor Biol* 2013; 34(3): 1847-54.
- 11 Ong CA, Shapiro J, Nason KS, Davison JM, Liu X, Ross-Innes C, *et al.* Three-gene immunohistochemical panel adds to clinical staging algorithms to predict prognosis for patients with esophageal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2013; 31(12): 1576-82.
- 12 Du Y, Wu J, Zhang H, Li S, Sun H. Reduced expression of SIRT2 in serous ovarian carcinoma promotes cell proliferation through disinhibition of CDK4 expression. *Mol Med Rep* 2017; 15(4): 1638-46.
- 13 Zhang LL, Zhan L, Jin YD, Min ZL, Wei C, Wang Q, *et al.*

- SIRT2 mediated antitumor effects of shikonin on metastatic colorectal cancer. *Eur J Pharmacol* 2017; 797: 1-8.
- 14 Li Z, Xie QR, Chen Z, Lu S, Xia W. Regulation of SIRT2 levels for human non-small cell lung cancer therapy. *Lung Cancer* 2013; 82(1): 9-15.
- 15 Xu W, Jiang K, Shen M, Qian Y, Peng Y. SIRT2 suppresses non-small cell lung cancer growth by targeting JMJD2A. *Biol Chem* 2015; 396(8): 929-36.
- 16 Li Z, Huang J, Yuan H, Chen Z, Luo Q, Lu S. SIRT2 inhibits non-small cell lung cancer cell growth through impairing Skp2-mediated p27 degradation. *Oncotarget* 2016; 7(14): 18927-39.
- 17 Xu H, Li Y, Chen L, Wang C, Wang Q, Zhang H, *et al.* SIRT2 mediates multidrug resistance in acute myelogenous leukemia cells via ERK1/2 signaling pathway. *Int J Oncol* 2016; 48(2): 613-23.
- 18 Deng A, Ning Q, Zhou L, Liang Y. SIRT2 is an unfavorable prognostic biomarker in patients with acute myeloid leukemia. *Sci Rep-UK* 2016; 6: 27694.
- 19 Kyrylenko S, Kyrylenko O, Suuronen T, Salminen A. Differential regulation of the Sir2 histone deacetylase gene family by inhibitors of class I and II histone deacetylases. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60(9): 1990-7.
- 20 Liu PY, Xu N, Malyukova A, Scarlett CJ, Sun YT, Zhang XD, *et al.* The histone deacetylase SIRT2 stabilizes Myc oncoproteins. *Cell Death Differ* 2013; 20(3): 503-14.
- 21 Chen J, Chan AW, To KF, Chen W, Zhang Z, Ren J, *et al.* SIRT2 overexpression in hepatocellular carcinoma mediates epithelial to mesenchymal transition by protein kinase B/glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling. *Hepatology* 2013; 57(6): 2287-98.
- 22 Dryden SC, Nahhas FA, Nowak JE, Goustin AS, Tainsky MA. Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Mol Cell Biol* 2003; 23(9): 3173-85.
- 23 Serrano L, Martinez-Redondo P, Marazuela-Duque A, Vazquez BN, Dooley SJ, Voigt P, *et al.* The tumor suppressor SirT2 regulates cell cycle progression and genome stability by modulating the mitotic deposition of H4K20 methylation. *Gene Dev* 2013; 27(6): 639-53.
- 24 North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 2003; 11(2): 437-44.
- 25 Jing E, Gesta S, Kahn CR. SIRT2 regulates adipocyte differentiation through FoxO1 acetylation/deacetylation. *Cell Metab* 2007; 6(2): 105-14.
- 26 Wang F, Nguyen M, Qin FX, Tong Q. SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell* 2007; 6(4): 505-14.
- 27 Jin YH, Kim YJ, Kim DW, Baek KH, Kang BY, Yeo CY, *et al.* Sirt2 interacts with 14-3-3 beta/gamma and down-regulates the activity of p53. *Biochem Bioph Res Co* 2008; 368(3): 690-5.
- 28 Yuan JH, Yang F, Wang F, Ma JZ, Guo YJ, Tao QF, *et al.* A long noncoding RNA activated by TGF-beta promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2014; 25(5): 666-81.
- 29 Xiao S, Chang RM, Yang MY, Lei X, Liu X, Gao WB, *et al.* Actin-like 6A predicts poor prognosis of hepatocellular carcinoma and promotes metastasis and epithelial-mesenchymal transition. *Hepatology* 2016; 63(4): 1256-71.
- 30 Lavorato-Rocha AM, Anjos LG, Cunha IW, Vassallo J, Soares FA, Rocha RM. Immunohistochemical assessment of PTEN in vulvar cancer: best practices for tissue staining, evaluation, and clinical association. *Methods* 2015; 77/78: 20-4.
- 31 Zuo Q, Wu W, Li X, Zhao L, Chen W. HDAC6 and SIRT2 promote bladder cancer cell migration and invasion by targeting cortactin. *Oncol Rep* 2012; 27(3): 819-24.
- 32 Xu SN, Wang TS, Li X, Wang YP. SIRT2 activates G6PD to enhance NADPH production and promote leukaemia cell proliferation. *Sci Rep-UK* 2016; 6: 32734.
- 33 Liu J, Zhang G, Lv Y, Zhang X, Ying C, Yang S, *et al.* SGK2 promotes hepatocellular carcinoma progression and mediates GSK-3beta/beta-catenin signaling in HCC cells. *Tumor Biol* 2017; 39(6): 1010428317700408.
- 34 Guo Y, Chen L, Sun C, Yu C. MicroRNA-500a promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma by activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Biomed Pharmacother* 2017; 91: 13-20.
- 35 Qin CD, Ma DN, Ren ZG, Zhu XD, Wang CH, Wang YC, *et al.* Astragaloside IV inhibits metastasis in hepatoma cells through the suppression of epithelial-mesenchymal transition via the Akt/GSK-3beta/beta-catenin pathway. *Oncol Rep* 2017; 37(3): 1725-35.
- 36 Wu HC, Lay IS, Shibu MA, Ho TJ, Cheng SM, Lin CH, *et al.* Zanthoxylum avicennae extract enhances GSK-3beta to attenuate beta-catenin via phosphatase 2A to block metastatic effects of HA22T cells and hepatocellular carcinoma xenografted nude mice. *Environ Toxicol* 2017; 32(9): 2133-43.
- 37 Sadot E, Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Shnizer D, Lando Z, Zharhary D, *et al.* Regulation of S33/S37 phosphorylated beta-catenin in normal and transformed cells. *J Cell Sci* 2002; 115(Pt 13): 2771-80.
- 38 Fukumoto S, Hsieh CM, Maemura K, Layne MD, Yet SF, Lee KH, *et al.* Akt participation in the Wnt signaling pathway through Dishevelled. *J Biol Chem* 2001; 276(20): 17479-83.
- 39 Usongo M, Li X, Farookhi R. Activation of the canonical WNT signaling pathway promotes ovarian surface epithelial proliferation without inducing beta-catenin/Tcf-mediated reporter expression. *Dev Dyn* 2013; 242(3): 291-300.
- 40 Nguyen P, Lee S, Lorang-Leins D, Trepel J, Smart DK. SIRT2 interacts with beta-catenin to inhibit Wnt signaling output in response to radiation-induced stress. *Mol Cancer Res* 2014; 12(9): 1244-53.