

【基础研究】

通信作者:千新来(1966-),男,河南焦作人,博士,教授,研究方向:肿瘤分子病理及肿瘤生物治疗;E-mail:qxlfssws@163.com

liver tissue. **Results** On the 4th day of cell culture, the proliferation rate of Huh-sirt6 cells was significantly lower than that of Huh-GFP cells ($P < 0.05$). The expression levels of SIRT6 in the liver tissues of Wt mice and TgSIRT6 mice were 0.247 ± 0.055 and 1.178 ± 0.037 , respectively, and the expression levels of SIRT6 in the liver tissues of TgSIRT6 mice were higher than that of Wt mice ($P < 0.05$). No tumor was observed in the liver in the TgSIRT6 control group and Wt control group. The tumorigenic rate of male and female mice in the TgSIRT6-DEN group were 80% (8/10) and 33% (2/6), respectively. The tumorigenic rate of male and female mice in Wt-DEN group were 100% (8/8) and 83% (5/6). The number and maximum diameter of tumor in the TgSIRT6-DEN group in both male and female mice were smaller than those in Wt-DEN group ($P < 0.05$). HE staining showed that the tumor was hepatocellular carcinoma. **Conclusion** Overexpression of SIRT6 in hepatocytes can inhibit the formation of liver tumors induced by DEN.

Key words: diethyl nitrosamine; spontaneous hepatocellular carcinoma; SIRT6; transgenic mouse

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是原发性肝癌中的常见类型,其发病隐匿,大多数患者就诊时已失去最佳手术治疗时机^[1]。目前,肝癌在诊断、治疗等方面的报道较多,但其发病机制尚不清楚,寻找肝癌发生的分子靶标仍然是一个迫切需要解决的问题。二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 是一种在实验动物中广泛使用的致癌剂, DEN 诱导已是一个成熟的诱发肝脏自发性肿瘤的实验动物建模方法^[2]。Sirtuin 是沉默配型信息调控蛋白家族,在哺乳动物中有 7 个成员,分别为 SIRT1、SIRT2、SIRT3、SIRT4、SIRT5、SIRT6、SIRT7,其分别具有不同的功能和亚细胞定位^[3]。SIRT6 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 依赖型的组蛋白去乙酰基化酶,能够特异地去除组蛋白 H3 的赖氨酸 9 和赖氨酸 56 上的乙酰基团,通过对组蛋白的修饰,调控基因的表达^[4-5]。SIRT6 在 DNA 修复、凋亡、代谢和炎症反应中发挥重要作用。研究表明, SIRT6 通过抑制 Survivin 的表达来阻遏肝癌的起始发生^[6],且能抑制肝癌细胞的生长和增殖^[7-8]。而 SIRT6 在动物体内肝细胞中过表达是否能够抑制 HCC 的发生还未见报道。本研究应用突变诱发剂 DEN 诱导全身性过表达 SIRT6 转基因 (transgenic gene of SIRT6 overexpression in whole body, TgSIRT6) 小鼠产生肝脏肿瘤,观察 SIRT6 在肝细胞中过表达是否对肝癌的发生有抑制作用。

1 材料与方法

1.1 细胞、动物来源 人肝癌 Huh7 细胞系购自美国 ATCC 公司, Huh7-sirt6 细胞由新乡医学院肿瘤分子反转录实验室提供; 15 日龄清洁级无病原体 TgSIRT6 小鼠 21 只 (雄性 15 只, 雌性 6 只) 和 C57BL6/J 野生型 (wild type, Wt) 小鼠 19 只 (雄性

13 只, 雌性 6 只), 体质量 7 ~ 9 g, 均由新乡医学院分子代谢实验室提供; 饲养光照循环为 12 h/12 h, 温度为 20 ~ 22 °C, 自由摄食和饮水。所涉及的动物程序均按照国家有关的实验室动物护理和使用指南进行。

1.2 主要试剂与仪器 DEN 购自美国 Sigma 公司 (批号: N0756), 十二烷基磺酸钠 (sodium dodecyl sulphate, SDS)、苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 兔抗人 SIRT6 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司, 兔抗人 Actinin 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔二抗购自美国 Proteintech 公司, 硝酸纤维素膜购自美国 Millipore 公司, 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 购自索莱宝生物科技有限公司, 苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒、增强型化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒购自碧云天生物技术研究; 蛋白电泳槽购于美国 Bio-Rad 公司, 转膜槽购自上海天能科技公司, 高速离心机 (5424R) 购于德国 Eppendorf 公司。

1.3 细胞培养 将利用 293T 细胞构建稳定细胞系 Huh7-sirt6 细胞株和 Huh7-GFP 细胞株从液氮罐中取出, 立即放入 37 °C 的水浴锅中迅速摇晃促进融化, 待其融化后将细胞放入离心机, 室温 $1\,500\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min, 在超净台内将液体弃去, 加入含 $100\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素、 $100\text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素和体积分数 10% 胎牛血清的高糖达尔伯克改良伊戈尔培养基, 在 37 °C、含体积分数 5% CO₂ 的湿润培养箱中培养 24 ~ 48 h。

1.4 细胞计数试剂盒 (Cell count kit 8, CCK-8) 检测过表达 SIRT6 对肝癌细胞体外增殖的影响 将

Huh7-sirt6 细胞和 Huh7-GFP 细胞按照每孔 3.5×10^3 个接种于 96 孔板,每种细胞各设 5 个复孔;第 1~4 天,每天在预定时间更换新鲜培养基 100 μL ,并加入 10 μL 的 CCK-8 溶液;酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度值,吸光度值越高,表明细胞增殖能力越强。

1.5 Western blot 法检测 TgSIRT6 小鼠肝脏组织中 SIRT6 的表达 选取TgSIRT6小鼠和 Wt 小鼠各 1 只,颈椎脱臼法处死,无菌条件下迅速解剖小鼠,取肝脏放入液氮,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,用于组织总蛋白的提取。取适量配制好的组织裂解液,加入体积分数 1% PMSF($100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、体积分数 1% 蛋白酶抑制剂和质量分数 0.2% SDS,充分混匀置于冰上备用。分别称取小鼠肝脏组织约 100 mg,冰浴条件下组织匀浆器充分匀浆后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定所提取的组织蛋白浓度。样品浓度测定后,所有样品取相同质量至新的 EP 管中,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution,PBS)补足至相同体积,在样品中加入 1/4 样本体积的 $5\times$ loading buffer,震荡混匀后置于金属浴中, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min。根据待检测样品 SIRT6 蛋白分子量大小,配制适合的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和转膜,脱脂牛奶封闭 1 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床一抗孵育过夜,室温二抗孵育 1 h。ECL 发光、压片、显影。一抗 SIRT6 稀释倍数 1:1 000,内参一抗 Actinin 稀释倍数 1:3 000,二抗为 HRP 标记的山羊抗兔和 HRP 标记的山羊抗鼠,稀释倍数均为 1:5 000。使用 Image J 软件分析条带的灰度值。

1.6 动物分组与处理 将小鼠分为 TgSIRT6-DEN 组 16 只(雄性 10 只,雌性 6 只)、Wt-DEN 组 14 只(雄性 8 只,雌性 6 只)、TgSIRT6 对照组 4 只(雄性)和 Wt 对照组 4 只(雄性)。TgSIRT6-DEN 组和 Wt-DEN 组小鼠腹腔注射 DEN $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,TgSIRT6 对照组和 Wt 对照组小鼠腹腔注射相同剂量的生理盐水,注射后给予正常饲料及饮水。

1.7 小鼠肝脏肿瘤发生情况观察 给药后 48 周,颈椎脱臼法处死 4 组小鼠,打开腹腔迅速取肝脏,观察肝脏颜色、大小、质地及有无癌变结节,记录肝脏肿瘤的大小、数量。

1.8 小鼠肝脏肿瘤组织苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色 取肝脏肿瘤组织,用 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的多聚甲醛固定,梯度乙醇脱水,石蜡包埋后,采用手动推拉式切片机常规切片,进行 HE 染色,显微镜下观察。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 20.0 软件进行统计分

析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2 组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

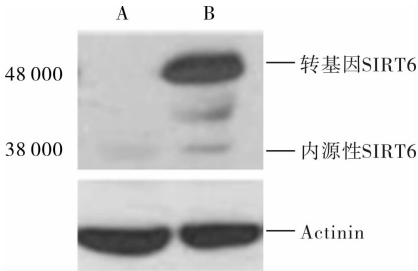
2 结果

2.1 过表达 SIRT6 对肝癌细胞体外增殖的影响 结果见表 1。细胞培养第 1~3 天,Huh-SIRT6 细胞增殖能力与 Huh-GFP 细胞比较差异无统计学意义($P>0.05$);细胞培养第 4 天,Huh-SIRT6 细胞增殖速度显著低于 Huh-GFP 细胞,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 Huh-GFP 细胞和 Huh-SIRT6 细胞体外增殖能力比较
Tab.1 Effects of overexpression of SIRT6 on proliferation of hepatocellular carcinoma cells in vitro ($\bar{x}\pm s$)

细胞	n	细胞增殖			
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
Huh-GFP	5	0.277 \pm 0.014	0.428 \pm 0.033	0.604 \pm 0.065	0.777 \pm 0.108
Huh-SIRT6	5	0.271 \pm 0.023	0.418 \pm 0.024	0.564 \pm 0.047	0.656 \pm 0.074
t		0.587	0.681	1.361	2.420
P		0.568	0.509	0.199	0.032

2.2 Wt 小鼠和 TgSIRT6 小鼠肝脏组织中 SIRT6 的表达 结果见图 1。SIRT6 在肝脏组织中有较好的表达,表达量约为内源性 SIRT6 的 5 倍,Wt 小鼠和 TgSIRT6 小鼠肝脏组织中 SIRT6 的表达量分别为 0.247 ± 0.055 和 1.178 ± 0.037 ,TgSIRT6 小鼠肝脏组织中 SIRT6 的表达量高于 Wt 小鼠,差异有统计学意义($P<0.05$)。

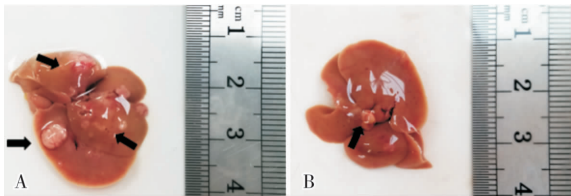


A: Wt 小鼠; B: TgSIRT6 小鼠。

图 1 Wt 和 TgSIRT6 小鼠肝脏组织中 SIRT6 的表达 (Western blot)

Fig. 1 Expression of SIRT6 in liver tissues of Wt and TgSIRT6 mice (Western blot)

2.3 2 组小鼠肝脏肿瘤的大小和数量 给药后 48 周肉眼观察,TgSIRT6-DEN 组和 Wt-DEN 组雄鼠肝脏表面可见多发灰白结节(图 2)。TgSIRT6 对照组和 Wt 对照组小鼠肝脏中未见肿瘤。TgSIRT6-DEN 组雄鼠和雌鼠的致癌率分别为 80% (8/10) 和 33% (2/6),Wt-DEN 组雄鼠和雌鼠的致癌率分别为 100% (8/8) 和 83% (5/6)。TgSIRT6-DEN 组雄鼠和雌鼠肿瘤数量及最大肿瘤直径均小于 Wt-DEN 组,差异有统计学意义($P<0.05$);见表 2。



A: Wt-DEN 组;B: TgSIRT6-DEN 组;箭头所指为肿瘤。

图2 TgSIRT6-DEN 组和 Wt-DEN 组小鼠肝脏大体观

Fig.2 General view of mouse liver in the TgSIRT6-DEN group and Wt-DEN group

表2 TgSIRT6-DEN 组和 Wt-DEN 组小鼠肝脏肿瘤数量和肿瘤直径比较

Tab.2 Comparison of the number and diameter of liver tumors between TgSIRT6-DEN group and Wt-DEN group

($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	肿瘤数量	肿瘤直径/mm
TgSIRT6-DEN 组			
雄鼠	10	6.331 ± 0.122	7.216 ± 0.158
雌鼠	6	1.157 ± 0.462	1.215 ± 0.316
Wt-DEN 组			
雄鼠	8	10.373 ± 0.312 ^a	11.248 ± 0.113 ^a
雌鼠	6	3.179 ± 0.251 ^b	3.209 ± 0.174 ^b

注:与 TgSIRT6-DEN 组雄鼠比较^a*P* < 0.05;与 TgSIRT6-DEN 组雌鼠比较^b*P* < 0.05。

2.4 小鼠肝肿瘤组织形态 结果见图3。镜下可以发现肿瘤细胞为圆形或多角形,细胞质丰富,核仁明显,核比较大,并且呈现深染,呈巢状或者条索状排列,排列成3~4层厚的小梁或细胞索,可见很少血窦样腔隙,提示为肝细胞癌。

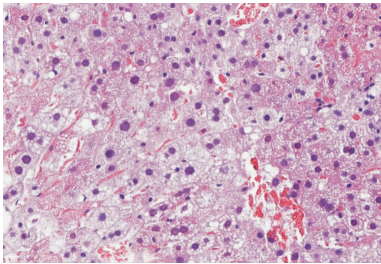


图3 小鼠肝脏肿瘤 HE 染色(10 × 20)

Fig.3 HE staining of liver tumors in mice(10 × 20)

3 讨论

肝癌发病迅速,转移性强,临床治疗效果不理想,患者预后差,这与其多种发病因素如肝炎病毒感染、化学致癌因素等有关^[9-11]。肝癌模型的成功建立是研究肝癌的基础条件,有效的模型也可使研究更有效率。DEN 具有较强的肝脏毒性作用,其作为致癌物与人原发性肝癌在病因学上存在着一定的相似性,其诱发的小鼠肝癌为 HCC,与人肝癌的发生过程也较为相似,适用于肝癌发生、发展的机制研

究。利用该实验模型寻找有效的分子靶点,对 HCC 的早期诊断以及探索有效的治疗策略,提高患者的生存率和生存质量具有重要意义。

SIRT6 作为 Sirtuin 家族的成员,具有去乙酰基化酶活性和二磷酸腺苷核糖基转移酶活性,因而具有很广泛的生物学功能。肿瘤和基因组的不稳定性、炎症、增殖以及糖酵解等有着非常重要的联系,而 SIRT6 在基因组稳定、调节炎症反应、抑制糖酵解等方面有着非常重要的作用,这也是 SIRT6 在癌症方面被广泛研究的原因之一^[12]。

SIRT6 被认为是一个抑癌基因,目前有如下几方面的证据:(1) SIRT6 缺失的细胞中,糖酵解过程明显增强,基本不利用三羧酸循环提供能量,这与肿瘤细胞的 Warburg 效应类似^[13]; (2) SIRT6 对 DNA 修复过程中的重要蛋白 CtIP 有去乙酰基化的作用,能够去除 CtIP 的乙酰基团,激活 CtIP,从而促进断裂的 DNA 得到有效修复^[14]; (3) SIRT6 能与端粒部位的染色质特异性结合,去除该区域 H3K9 位点的乙酰基团,维持端粒的稳定性; (4) SIRT6 能和核因子 κB 共同结合与炎症相关因子的启动子区域,通过去乙酰基化组蛋白,抑制炎症相关因子的表达^[15]; (5) 人类的 SIRT6 基因位于染色体的19p13.3 区域,根据癌症基因组剖析计划和美国国家癌症研究所数据库中的数据证明 19p13.3 是许多肿瘤易发生突变的区域^[16]。在患有肺癌的雄性小鼠中, KANFI 等^[17] 研究发现,与野生型小鼠相比, SIRT6 基因过表达小鼠寿命延长 11.7%,提示在癌症的进展中 SIRT6 基因可以发挥抑癌作用。同时,有许多研究表明, SIRT6 基因在胰腺癌、鳞状细胞癌中表达上调,表示 SIRT6 基因是一个潜在的肿瘤促进因子^[18-19]。以上研究结果表明,在不同肿瘤组织中 SIRT6 表达不同,其可在肿瘤发生、发展中通过多种途径发挥不同的作用,然而其具体的作用机制有待进一步深入进行研究。然而目前关于 SIRT6 在癌症中的作用尚存有争议,大部分研究认同 SIRT6 可以发挥抑制肿瘤的作用,同时也有相关研究表明,在使用吉西他滨对胰腺癌患者进行治疗时,在抑制 SIRT6 的同时,可以降低 CAPAN-1 细胞活性,表明 SIRT6 也有致癌的可能性,同时说明 SIRT6 在不同的肿瘤、致癌原因及致癌微环境中可能具有不同的功能,还需要进一步深入研究^[20-21]。

本研究通过在 Huh 细胞中过表达 SIRT6,检测 SIRT6 对肝癌细胞体外增殖能力的影响,结果表明, SIRT6 过表达可明显降低体外肝癌细胞的生长速

度。本研究发现,在 DEN 的诱变下,TgSIRT6 实验组小鼠和 Wt 实验组小鼠肝脏表面均可见多发大灰白结节,即肝脏肿瘤;而 TgSIRT6 对照组和 Wt 对照组小鼠肝脏中未观察到肿瘤。与 Wt-DEN 组比较,TgSIRT6-DEN 组小鼠肝脏肿瘤的发生率降低,肿瘤数量和大小均有下降。本研究在生理水平上进一步验证了 SIRT6 具有抑制肝细胞肿瘤发生的作用,但其机制未进行深入探讨,下一步还需要继续探索 SIRT6 对抑制肝脏肿瘤发生的作用机制,研究相关信号通路及靶基因,为肝癌的治疗提供新的靶点。

参考文献:

[1] 梁长华,毛华杰,梁盼,等. 原发性肝癌 320 排容积 CT 灌注参数值与肿瘤体积及肝功能 Child-Pugh 分级的相关性[J]. 新乡医学院学报,2018,35(1):65-68.

[2] TOLBA R, KRAUS T, LISDTKE C, et al. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice[J]. *Lab Anim-uk*. 2015,49(1 Suppl):59-69.

[3] FINKEL T, DENG C X, MOSTOSLAVSKY R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins [J]. *Nature*, 2009, 460(7255):587-591.

[4] MICHISHITA E, MCCORD R A, BERBER E, et al. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin [J]. *Nature*, 2008, 452(7186):492-496.

[5] MICHISHITA E, MCCORD R A, BOXER LD, et al. Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H3 lysine K56 by human SIRT6[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(16):2664-2666.

[6] MIN L, JI Y, BAKIRI L, et al. Liver cancer initiation is controlled by AP-1 through SIRT6-dependent inhibition of survivin[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(11):1203-1211.

[7] LIN Z, YANG H, TAN C, et al. USP10 antagonizes c-Myc transcriptional activation through SIRT6 stabilization to suppress tumor formation. [J]. *Cell Rep*, 2013, 5(6):1639-1649.

[8] RAN L K, CHEN Y, ZGANG Z Z, et al. SIRT6 overexpression potentiates apoptosis evasion in hepatocellular carcinoma via bcl2-associated x protein-dependent apoptotic pathway. clinical cancer research; an official journal of the american[J]. *Assoc Cancer Res*, 2016, 22(13):3372-3382.

[9] 任同良. 微波消融与手术切除治疗原发性肝癌疗效比较[J].

新乡医学院学报,2017,34(11):991-993.

[10] BOSCH F X, RIBES J, DIAZ M, et al. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(5 Suppl 1):S5-S16.

[11] EL-SERAG H B, and RUDOLPH K L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7):2557-2576.

[12] KUGEL S, MOSTOSLAVSKY R. Chromatin and beyond: the multitasking roles for SIRT6[J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(2):72-81.

[13] ZHONG L, D'URSO A, TOIBER D, et al. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha [J]. *Cell*, 2010, 140(2):280-293.

[14] KAIDI A, WEINERT B T, CHOUDHARY C, et al. Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation[J]. *Science*, 2010, 329(5997):1348-1353.

[15] KAWAHARA T L, MICHISHITA E, ADLER A S, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span [J]. *Cell*, 2009, 136(1):62-74.

[16] MAHLKNECHT U, HO A D, VOELTER-MAHLKNECHT S. Chromosomal organization and fluorescence in situ hybridization of the human Sirtuin 6 gene[J]. *Int J Oncol*, 2006, 28(2):447-456.

[17] KANFI Y, NAIMAN S, AMIR G, et al. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice [J]. *Nature*, 2012, 483(7388):218-221.

[18] LU J, SUN D, LIU Z, et al. SIRT6 suppresses isoproterenol-induced cardiac hypertrophy through activation of autophagy [J]. *Transl Res*, 2016, 172:96-112.

[19] BAUER I, GROZIO A, LASIGLIE 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 Inorg Chem*, 2012, 287(49):40924-40937.

[20] MINL L, JI Y, BAKIRI L, et al. Liver cancer initiation is controlled by AP-1 through SIRT6-dependent inhibition of survivin [J]. *Nature Cell Biol*, 2012, 14(11):1203-1211.

[21] SEBASTIAN C, ZWAANS B M, SILBERMAN D M, et al. The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism [J]. *Cell*, 2012, 151(6):1185-1199.

(本文编辑:杨 博)