



· 论 著 ·

siRNA抑制骨肉瘤U2OS细胞系中SIRT6的表达及其生物学作用研究

余 天¹, 李 娟², 张伟凯³, 张 帆³

1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院眼科, 湖北 武汉 430030 ;
2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院干细胞研究与应用中心, 湖北 武汉 430022 ;
3. 华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科, 湖北 武汉 430030

[摘要] 背景与目的: sirtuin6(SIRT6)蛋白是对人体细胞生长、代谢调控及应激反应等具有重要作用的一种核蛋白,常在细胞核中发挥多种调控作用。但该蛋白在骨肉瘤中的作用还不清楚,本研究通过下调人骨肉瘤U2OS细胞系中SIRT6的表达,观察其对U2OS细胞的作用。方法:设计合成SIRT6的siRNA序列,通过LipofectamineTM2000转染U2OS细胞系,通过蛋白质印迹法(Western blot)检测SIRT6蛋白的表达情况,利用流式细胞术检测细胞凋亡,细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)法检测细胞增殖,Transwell法检测细胞侵袭和迁移能力,CCK-8法分析对紫杉醇的敏感性。结果:成功构建SIRT6 siRNA序列,Western blot检测转染后24、48和72 h的蛋白水平,实验组较对照组明显降低。流式细胞术检测细胞凋亡也显示实验组凋亡增加($P<0.05$)。Transwell法检测结果显示,实验组侵袭与迁移能力较对照组下降($P<0.05$)。CCK-8法检测细胞生长情况,可见经紫杉醇处理后实验组生长较对照组下降明显,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:下调骨肉瘤U2OS细胞中SIRT6的表达可以抑制骨肉瘤细胞侵袭,促进凋亡,并增强骨肉瘤细胞对紫杉醇的化疗敏感性。

[关键词] SIRT6; 骨肉瘤; siRNA

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2018.10.001

中图分类号: R738.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2018)10-0721-05

Influence of down-regulation of SIRT6 expression by small interfering RNA on U2OS osteosarcoma cell line YU Tian¹, LI Juan², ZHANG Weikai³, ZHANG Fan³ (1. Department of Ophthalmology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China; 2. Centre for Stem Cell Research and Application, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China; 3. Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China)

Correspondence to: ZHANG Fan E-mail: doctorzhphd@yeah.net

[Abstract] **Background and purpose:** Sirtuin 6 (SIRT6) is an important histone modifying protein that is implicated in diverse physiological processes, as well as aging-associated diseases, and regulates DNA repair, energy metabolism and target gene expression. However, the role of SIRT6 in human osteosarcoma has not been fully understood. This study investigated the effect of the small interfering RNA (siRNA)-mediated SIRT6 knockdown on the survival and invasion. **Methods:** The siRNA against SIRT6 was constructed and transfected into U2OS cell line with LipofectamineTM 2000. The expression of SIRT6 was detected by Western blot. Flow cytometry was used to detect the cell apoptosis. Proliferation of cells was assayed using the cell counting kit-8 (CCK-8) method. The Transwell test was used to detect the invasion and migration ability of U2OS cells. And the viability in taxol was detected using CCK-8 method. **Results:** Compared with the control group, the protein level was significantly decreased in the experimental group at 24, 48 and 72 hours after transfection with SIRT6 siRNA. Flow cytometry detection showed the apoptotic rate

基金项目: 国家自然科学基金(81202093)。

通信作者: 张 帆 E-mail: doctorzhphd@yeah.net

increased significantly in the experimental group ($P<0.05$). Cell invasion and migration ability in the experimental group decreased significantly ($P<0.05$). In addition, the experimental group showed decreased growth after exposure to taxol compared with the control group ($P<0.05$). **Conclusion:** Down-regulation of SIRT6 expression may decrease invasion and migration, promote apoptosis, and enhance the sensitivity to Taxol in U2OS osteosarcoma cell line.

[Key words] SIRT6; Osteosarcoma; siRNA

骨肉瘤是最常见的来源于骨的恶性肿瘤,并且常好发于儿童及青年人的干骺端。尽管新辅助化疗在骨肉瘤治疗中得到了广泛应用,但预后仍不理想,尤其是对于肿瘤转移和复发的患者。Sirtuins (SIRT1~SIRT7) 蛋白家族是一类NAD⁺依赖的组蛋白去乙酰化酶和腺苷二磷酸 (adenosine diphosphate, ADP)-核糖基转移酶,参与机体的寿命调节、应激及炎症反应等病理生理过程。近年来研究发现, SIRT6蛋白在不同肿瘤中发挥不同作用^[1-2]。Sebastián等^[3]认为体内SIRT6缺乏可以促进肿瘤的生长和侵袭; Kugel等^[4]认为SIRT6可以抑制胰腺癌的生长; Bhardwaj等^[5]发现SIRT6可以使PKM2去乙酰化从而减少核定位信号抑制癌基因的功能。另一些研究却认为SIRT6具有促进肿瘤生成的作用, Ming等^[6]发现人类鳞状细胞癌中SIRT6表达明显增高, Ran等^[7]认为SIRT6可以通过染色质重排从而促进肿瘤发生。但该蛋白在骨肉瘤中的作用仍不明确。本研究运用RNA干扰 (RNA interference, RNAi) 的方法抑制SIRT6在人骨肉瘤细胞系U2OS中的表达, 观察对骨肉瘤U2OS细胞系的生长、凋亡和侵袭性的影响, 探讨SIRT6在骨肉瘤中的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和转染

人骨肉瘤U2OS细胞系由本实验室常规保存。该细胞系培养于DMEM培养基 (美国Hyclone公司), 并添加10%胎牛血清 (美国Hyclone公司) 和抗生素 (美国Sigma-Aldrich公司)。置于37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养。

SIRT6 siRNA序列为: 5'-CGAGGAUGUCGGUGAAUUA-3', 由广州市锐博生物科技有限公司合成, 阴性对照购自广州市锐博生物科技有限公司。质粒通过Lipofectamine™2000系统

(美国Invitrogen公司) 转染入骨肉瘤细胞中。转染SIRT6 siRNA组为实验组, 转染阴性对照siRNA为对照组。

1.2 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测

分别在转染24、48和72 h后将6孔板在冰面上用预冷磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 清洗细胞3次, 加入预冷的RIPA裂解液150 μL, 超声波破碎细胞, 12 000 r/min离心15 min, 取上清液, 用BCA法测定蛋白浓度, 取50 μg蛋白行10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 电转移印迹到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 脱脂奶粉封闭, 加入抗体温育2 h, 洗涤, 添加二抗 (美国KPL公司) 按1:3 000稀释, 并采用ECL法 (美国Thermo公司) 检测。结果经灰度扫描分析, 以SIRT6/β-actin相对蛋白表达水平表示。

1.3 采用Annexin V-FITC/PI法检测细胞凋亡

转染48 h后收集细胞, 加入80%乙醇于4℃用PBS漂洗3次, 加入RNase溶液静置1 h, 加入碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染液室温避光染色30 min, 采用流式细胞术检测细胞凋亡, 方法按试剂盒说明书进行, 采用Cellquest软件分析。以上实验重复3次。

1.4 细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测细胞增殖

收集对数生长期细胞, 调整细胞密度, 每孔达到 1×10^3 个, 加入胎牛血清, 24 h后加入细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) (上海炎彬化工科技有限公司) 20 μL, 培养箱温育4 h后以490 nm波长测定吸光度 (D) 值, 以24、48和72 h为横坐标绘制生长曲线。

1.5 Transwell法检测细胞迁移和侵袭能力

利用Transwell小室 (美国Corning公司) 检测

骨肉瘤细胞侵袭和迁移能力，其中铺有基质胶的上室用于检测细胞侵袭能力，无基质胶的用于检测细胞迁移。上室加入骨肉瘤细胞及无血清DMEM溶液，下室加入600 μL含20%胎牛血清溶液诱导细胞侵袭和迁移。培养48 h后进行Giemsa染色，镜下随机选择5个200倍视野，显微镜下细胞计数，每组设3个复孔，计算其平均值。

1.6 统计学处理

数据由SPSS 13.0统计软件处理，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较应用t检验和方差分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SIRT6-siRNA抑制骨肉瘤U2OS细胞系中SIRT6基因的表达

分别在转染细胞后24、48和72 h，行Western blot检测U2OS细胞系中SIRT6的表达。结果显示，24 h后实验组SIRT6蛋白的表达被显著抑制，与对照组相比下降约84%，72 h后仍较对照组减少约49%（图1）。提示SIRT6-siRNA抑制骨肉瘤细胞SIRT6蛋白的表达效果显著。

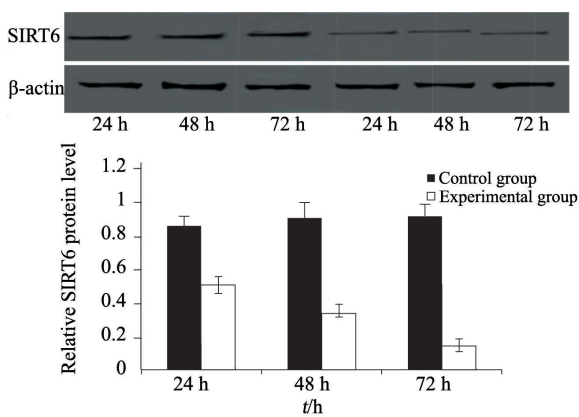


图1 Western blot检测U2OS细胞SIRT6蛋白的相对表达

Fig. 1 SIRT6 protein relative expression in U2OS cells detected by Western blot

2.2 下调SIRT6的表达对骨肉瘤U2OS细胞系增殖的影响

通过CCK-8法检测结果绘制的生长曲线显

示，实验组较对照组曲线略有降低，但差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ，图2）。

2.3 使用流式细胞仪检测细胞凋亡

转染24 h后使用Annexin V-FITC双染流式细胞术行凋亡检测，实验组平均值为（13.84 ± 1.18）%，较对照组〔（5.67 ± 0.72）%〕凋亡增加了约3倍（图3）。说明抑制骨肉瘤U2OS细胞系SIRT6的表达后，细胞凋亡增加，两组之间差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。

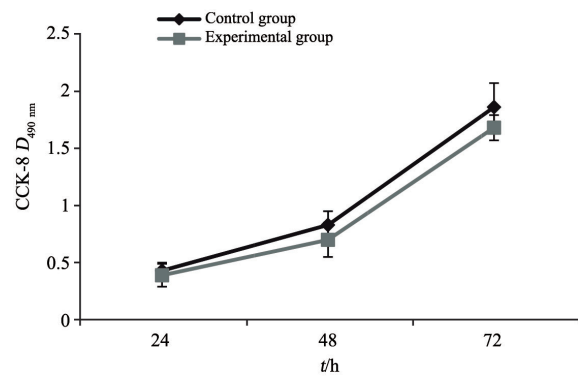


图2 CCK-8法检测U2OS细胞系的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of U2OS cells detected by CCK-8 method

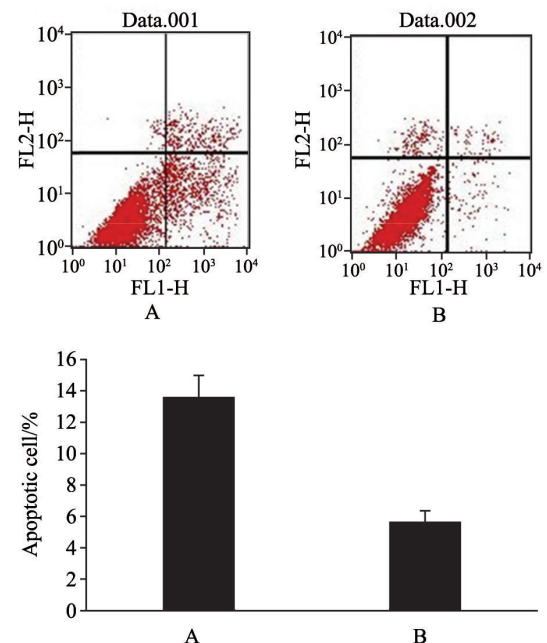


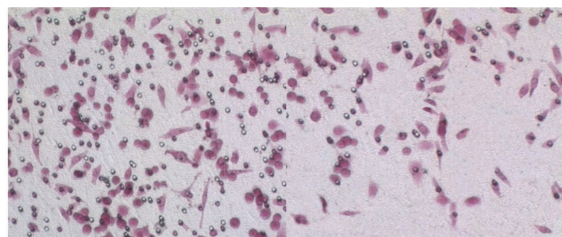
图3 流式细胞仪检测骨肉瘤细胞凋亡情况

Fig. 3 Cell apoptosis was detected by flow cytometry

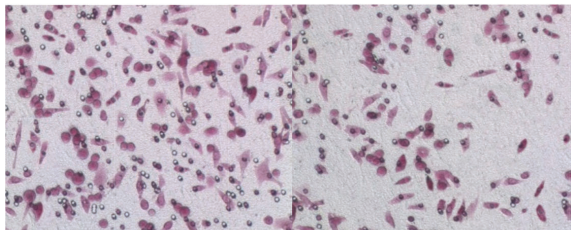
A: Experimental group; B: Control group

2.4 Transwell实验检测细胞侵袭和迁移能力

用带有基质胶的Transwell小室检测细胞的侵袭能力,转染SIRT6-siRNA 24 h后,骨肉瘤U2OS细胞穿膜细胞数为 (41.67 ± 5.02) 个,与对照组 $[(108.84 \pm 7.21)$ 个]比较侵袭能力明显减弱($P < 0.05$),这说明抑制SIRT6可降低骨肉瘤U2OS细胞侵袭能力。同时利用不带基质胶的Transwell小室行细胞迁移检测,发现实验组迁移细胞个数为 (57.83 ± 4.15) 个,与对照组 $[(140.21 \pm 5.33)$ 个]相比显著减少($P < 0.05$,图4),提示抑制SIRT6表达可降低细胞迁移能力。



Invasion



Migration

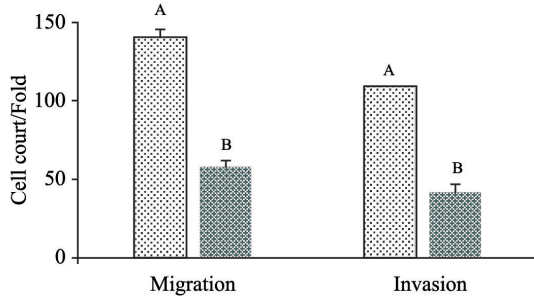


图4 Transwell实验发现实验组细胞侵袭及迁移能力下降

Fig. 4 Decreased invasion and migration abilities in the experimental group detected by Transwell assay

A: Experimental group; B: Control group

2.5 下调SIRT6基因表达可以增强骨肉瘤U2OS细胞化疗敏感性

通过抑制骨肉瘤SIRT6基因的表达观察在紫杉醇处理后的溶液中肿瘤细胞的生长情况,结果

显示,经紫杉醇处理后,实验组和对照组72 h的D值较未处理的实验组和对照组都下降明显,分别为 (0.65 ± 0.12) 和 (1.12 ± 0.18) ,且经紫杉醇处理的实验组下降幅度更显著($P < 0.05$,图5),说明下调骨肉瘤U2OS细胞系中SIRT6的表达可以增强该细胞对化疗药物紫杉醇的敏感性。

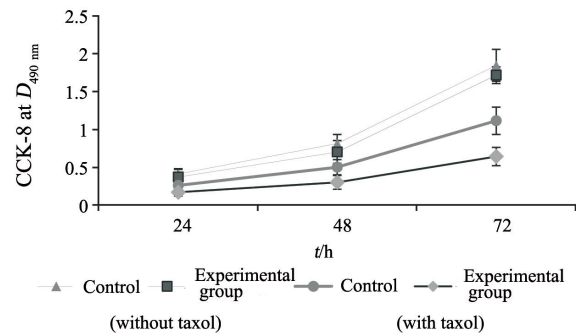


图5 应用CCK-8法检测未经及经紫杉醇处理的骨肉瘤细胞生长情况

Fig. 5 CCK-8 method was used to detect the U2OS osteosarcoma cells with or without exposure to taxol

3 讨论

SIRT6基因位于染色体19p13.3区域,其N端区域与组蛋白去乙酰化酶功能及染色质结合有关,使其具有去乙酰化酶和ADP-核糖基转移酶的活性。SIRT6在哺乳动物细胞中广泛表达,在肌肉、大脑、心脏和肿瘤细胞中的表达较丰富,SIRT6参与包括心力衰竭及心肌肥大等多种病理过程的发生、发展。

关于SIRT6在肿瘤中的作用,目前得出了许多互相矛盾的研究结论。有结论认为SIRT6是肿瘤抑制因子,Sebastián等^[3]研究发现,在人类一些肿瘤中SIRT6基因缺失,从而引起糖代谢增加及肿瘤生长;SIRT6过表达后可促进乳腺癌、肝癌等肿瘤细胞发生凋亡^[8]。此外,SIRT6的过表达将增加人肺癌A549细胞对放射治疗的敏感性,同时抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡^[9]。另一些研究也显示,SIRT6基因可能在不同的细胞中扮演不同的角色,在前列腺癌中SIRT6表达增高,下调SIRT6基因的表达可以抑制肿瘤细胞的生长,Bcl基因表达下降促进细胞凋亡,并且增加肿瘤细胞对紫杉醇的敏感性^[10]。同时在乳腺癌组织和人乳腺癌

MCF-7细胞中SIRT6表达均升高, 过表达SIRT6可使乳腺癌细胞对多柔比星和紫杉醇出现抵抗^[11]。

但SIRT6在骨肉瘤中的作用还不清楚, 有研究显示, 骨肉瘤中SIRT6表达增加, 并可促进肿瘤细胞侵袭^[12]。本研究也证实, 通过下调骨肉瘤U2OS细胞系中SIRT6的表达, 可以显著抑制骨肉瘤细胞的侵袭和迁移能力, 并且也证实下调SIRT6表达可以促进骨肉瘤细胞在紫杉醇处理后的凋亡, 从而增强骨肉瘤细胞对化疗药物的敏感性。McCord等^[13]发现, 下调SIRT6后很多细胞包括人胚肺成纤维细胞WI-38细胞对于放射引起的DNA损伤更加敏感, 证实SIRT6具有稳定基因组的作用。但也有研究表明, SIRT6对不同的细胞作用不同。Wu等^[14]报道, 膀胱癌细胞肌肉侵犯T₂期的肿瘤细胞, SIRT6表达下调并不会令肿瘤细胞对化疗药物致DNA损伤的敏感性增加。本研究证实在骨肉瘤细胞中, 下调SIRT6基因的表达会增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 促进骨肉瘤U2OS细胞系的凋亡, 减缓骨肉瘤细胞的侵袭能力。在将来的研究中还需要更深入地探索SIRT6对骨肉瘤生物学效应的具体分子机制, 揭示该分子的确切作用。

[参 考 文 献]

- [1] LERRER B, GERTLER A A, COHEN H Y. The complex role of SIRT6 in carcinogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 2016, 37(2): 108-118.
- [2] BOSCH-PRESEGUÉ L, VAQUERO A. The dual role of sirtuins in cancer [J]. *Genes Cancer*, 2011, 2(6): 648-662.
- [3] SEBASTIÁN 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.
- [4] KUGEL S, SEBASTIÁN C, FITAMANT J, et al. SIRT6 suppresses pancreatic cancer through control of Linda28b [J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1401-1415.
- [5] BHARDWAJ A, DAS S. SIRT6 deacetylates PKM2 to suppress its nuclear localization and oncogenic functions [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(5): 538-547.
- [6] MING M, HAN W, ZHAO B, et al. SIRT6 promotes COX-2 expression and acts as an oncogene in skin cancer [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(20): 5925-5933.
- [7] RAN L K, CHEN Y, ZHANG Z Z, et al. SIRT6 overexpression potentiates apoptosis evasion in hepatocellular carcinoma via BCL-2 associated X protein-dependent apoptotic pathway [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(13): 3372-3382.
- [8] VAN METER M, MAO Z, GORBUNOVA V, et al. SIRT6 overexpression induces massive apoptosis in cancer cells but not in normal cells [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(18): 3153-3158.
- [9] CAI Y, SHENG Z Y, LIANG S X. Radiosensitization effect of overexpression of adenovirus-mediated SIRT6 on A549 non-small cell lung cancer cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(17): 7297-7301.
- [10] LIU Y, XIE Q R, WANG B, et al. Inhibition of SIRT6 in prostate cancer reduces cell viability and increases sensitivity to chemotherapeutics [J]. *Protein Cell*, 2013, 4(9): 702-710.
- [11] KHONGKOW M, OLMOS Y, GONG C, et al. SIRT6 modulates paclitaxel and epirubicin resistance and survival in breast cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(7): 1476-1486.
- [12] LIN H, HAO Y, ZHAO Z, et al. Sirtuin 6 contributes to migration and invasion of osteosarcoma cells via the ERK1/2/MMP9 pathway [J]. *FEBS Open Biol*, 2017, 7(9): 1291-1301.
- [13] MCCORD R A, MICHISHITA E, HONG T, et al. SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair [J]. *Aging (Albany NY)*, 2009, 1(1): 109-121.
- [14] WU M, DICKINSON S I, WANG X, et al. Expression and function of SIRT6 in muscle invasive urothelial carcinoma of the bladder [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(10): 6504-6513.

(收稿日期: 2018-04-20 修回日期: 2018-06-30)