



· 论 著 ·

沉默信息调节因子过表达或谷氨酰胺剥夺对肾透明细胞癌细胞凋亡、增殖的影响

童颖, 余怡雯, 谢素红, 王砚春, 卢仁泉, 郭林

复旦大学附属肿瘤医院检验科, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

[摘要] 背景与目的: 肾透明细胞癌 (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) 是最常见的肾癌类型, 它与代谢密切相关。探讨沉默信息调节因子4 (silent information regulator 4, SIRT4) 过表达或谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 剥夺对ccRCC细胞增殖、凋亡的影响。方法: 慢病毒构建SIRT4和突变体H161Y过表达的Caki-2细胞株, 利用无Gln的培养基来构建Gln剥夺模型, 并通过体外增殖活力实验 [细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)] 和克隆形成实验来分析两者对Caki-2细胞增殖和生长能力的影响; 利用DCFH-DA荧光探针检测细胞内活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 水平进而评估Gln代谢对细胞ROS含量的影响; 进一步通过线粒体膜电位检测、凋亡检测和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测凋亡相关分子, 分析SIRT4过表达以及Gln剥夺对Caki-2细胞凋亡的影响。结果: 过表达SIRT4可抑制Gln代谢从而抑制Caki-2细胞增殖, 另外还原性物质还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 的生成减少能够增加细胞内ROS含量, 促进细胞凋亡。而Gln剥夺抑制细胞增殖和促进细胞凋亡的效果均比过表达SIRT4明显, 但长期缺乏Gln将导致细胞无法生长。结论: 无论是过表达SIRT4还是Gln剥夺均能抑制ccRCC细胞增殖, 促进凋亡。

[关键词] 沉默信息调节因子4; 肾透明细胞癌; 增殖; 凋亡

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2020.06.005

中图分类号: R737.11 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639 (2020)06-0435-06

Effects of silent information regulator 4 overexpression or glutamine deprivation on apoptosis and proliferation of clear cell renal cell carcinoma TONG Ying, YU Yiwen, XIE Suhong, WANG Yanchun, LU Renquan, GUO Lin (Department of Clinical Laboratory, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: LU Renquan E-mail: lurenquan_fudan15@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) has become the most common subtype of renal cell carcinoma. ccRCC is strongly related to metabolism. This study was designed to investigate the effects of silent information regulator 4 (SIRT4) overexpression or glutamine deprivation on the proliferation and apoptosis of ccRCC. **Methods:** We constructed Caki-2 cell lines stably expressing SIRT4 and SIRT4-H161Y by lentivirus infection. The glutamine deprivation model was constructed by the glutamine-free medium. We detected the proliferation and growth capacity of Caki-2 cells using cell counting kit-8 (CCK-8) assay and clone formation assay. DCFH-DA fluorescent probe was used to monitor intracellular reactive oxygen species (ROS) to evaluate the effect of glutamine on ROS generation. Moreover, the effects of SIRT4 and glutamine deprivation on apoptosis in Caki-2 cell line were analyzed by mitochondrial membrane potential detection, apoptosis detection, and Western blot. **Results:** SIRT4 overexpression inhibited the proliferation of Caki-2 cells through its inhibition of glutamine metabolism. Meanwhile, restricting glutamine metabolism was accompanied by a reduction of antioxidant NADPH and aggrandizement of intracellular ROS to promote apoptosis. The effects of glutamine deprivation on inhibiting cell proliferation and promoting apoptosis were more obvious than that of overexpression of SIRT4. However, no cell could grow under long-term lack of glutamine. **Conclusion:** SIRT4 overexpression and glutamine deprivation both could inhibit cell proliferation and promote apoptosis in ccRCC.

[Key words] Silent information regulator 4; Clear cell renal cell carcinoma; Proliferation; Apoptosis

肾癌是泌尿系统的常见肿瘤之一,肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)占肾癌的70%~75%^[1]。局限性ccRCC手术后尚无标准辅助治疗方案,同时转移性ccRCC无标准的治疗方案,通常采用以内科为主、外科手术为辅的综合治疗,因此寻求新的治疗手段迫在眉睫。谷氨酰胺(glutamine, Gln)是动物组织中重要的氮源。在肿瘤细胞中,Gln代谢处于高水平^[2],也会与宿主细胞竞争血液循环中的Gln,并引起Gln代谢重编程^[3]。Gln代谢产生谷胱甘肽、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)等还原性物质抵抗细胞凋亡,抗氧化物质含量的变化会引起微环境的改变,进而影响ccRCC对铂类等细胞化疗药物的敏感性^[4],因此调控谷氨酰胺代谢可成为治疗ccRCC的新手段。

沉默信息调节因子4(silent information regulator 4, SIRT4)位于线粒体基质,调节多种代谢酶活性和参与氧化应激的过程^[5],可以通过ADP-核糖基化抑制谷氨酰胺脱氢酶活性^[6],抑制谷氨酰胺代谢,因此被认为是“glutamine gatekeeper”^[7]。现有研究^[8]表明,SIRT4作为一个抑癌基因参与肿瘤的发生过程。在人类癌症和小鼠肿瘤模型中发现SIRT4具有肿瘤抑制作用^[9-10]。此外,在正常细胞中,DNA损伤时Gln代谢明显降低,通过控制周期停滞来限制危害,但是如果SIRT4缺失或低表达,这种保护性限制将会被打破,促进肿瘤的发生、发展^[11]。虽然在SIRT4在肝癌^[12]、非小细胞肺癌^[13]等癌种中可抑制肿瘤进展,但SIRT4对ccRCC发生、发展的影响尚不清楚,本研究探讨SIRT4是否通过抑制谷氨酰胺代谢影响ccRCC增殖、凋亡。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系

Caki-2细胞由复旦大学附属肿瘤医院泌尿外科赠送。

1.1.2 主要试剂

抗体SIRT4(sc-135797)、caspase-3(sc-

56053)、caspase-9(sc-133109)购自美国Santa Cruz公司,抗体Bax(50599-2-ig)、蛋白质印迹法(Western blot)二抗(SA00001-1、SA00001-2)购自美国Proteintech公司,蛋白marker(#26616)购自美国Thermo Fisher公司,cocktail(P8340)购自美国Sigma公司,HRP-ECL曝光液(36208ES60)购自上海翊圣生物科技有限公司,酮戊二酸(α -KG, CAS#328-50-7)、青-链霉素(15140122)购自美国Gibco公司,LipofectamineTM2000购自美国Invitrogen公司,PrimeScript[®]RT reagent Kit购自宝生物工程(大连)有限公司,ROS检测试剂2',7'-dichlorofluorescein-diacetate(DCFH-DA, HY-D0940)、线粒体膜电位检测试剂盒(C2006)购自上海碧云天生物技术有限公司。细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)检测试剂(CK04)购自东仁化学科技(上海)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 SIRT4和SIRT4-H161Y过表达慢病毒液生产

从HEK-293T细胞系中提取RNA,反转录为cDNA后,用相应引物扩增为双链DNA,经双酶切装载于pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro,连同辅助质粒psPAX2、pMD2按照4:3:1一起转染HEK-293T细胞,48 h后收取病毒液,0.45 μ m滤过滤器过滤。

1.2.2 稳定细胞株的获得和细胞培养

Caki-2细胞用含有10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的RPMI-1640(购自美国Gibco公司)培养于CO₂体积分数为5%、37 °C的温箱中。利用0.25%胰酶(购自美国Gibco公司)进行细胞传代。用病毒液感染Caki-2细胞24 h后,用1~2 μ g/mL的嘌呤霉素筛选1周后获得稳定表达的细胞系。

1.2.3 细胞增殖检测

将细胞以1 000个/孔的密度种于96孔板中,在检测时间点更换新的培养基,并在每孔加入10 μ L CCK-8检测试剂(CK04),37 °C温育2 h后,在450 nm波长读取吸光度(D)值。

1.2.4 细胞克隆形成

将细胞按照1 000个/孔种于6孔板种,用含有10%FBS的RPMI-1640培养基培养10~14 d后,4%多聚甲醛固定10 min后用1%的结晶紫染色,进行细胞克隆计数。

1.2.5 细胞凋亡检测

Caki-2细胞用0.25%胰酶消化后, 400×g离心5 min, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered solution, PBS) 洗涤2次, Annexin V-FITC和碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染色15 min, 用BD流式细胞仪检测凋亡情况。

1.2.6 细胞线粒体膜电位检测

细胞按照 2×10^4 个/孔种于24孔板中, 用不同培养基培养48 h。取1个孔细胞用CCCP处理30 min作为阳性对照, 所有待检测细胞中加入500 μ L JC-1工作液处理37 °C处理30 min, PBS洗涤2次。JC-1单体的激发波长为529 nm, 而JC-1二聚体的激发波长为590 nm。通过流式细胞仪或激光共聚焦显微镜检测细胞线粒体膜电位的改变。

1.2.7 NADPH含量检测

当细胞长满约 1×10^6 个细胞时, 吸净培养液, 用移液器加入200 μ L的NADP⁺/NADPH提取液, 裂解细胞。13 500×g, 4 °C离心5~10 min, 取上清作为待测样品备用。配置NADPH标准品和标准曲线, 加入检测样品, 37 °C避光温育10 min, 终止显色, 测量450 nm处的吸光度。

1.2.8 细胞内ROS检测

细胞用10 μ mol/L DCFH-DA工作液37 °C处理30 min, PBS洗涤1次, 胰酶消化, BD流式细胞仪用538 nm发射波长检测。

1.2.9 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测

将细胞用IP裂解液加入cocktail和PMSF在冰上裂解30 min, 4 °C 360×g离心10 min, 取上清, 用BCA试剂盒 (P0010, 购自上海碧云天生物技术有限公司) 蛋白定量后, 加入上样缓冲液, 100 °C煮样5 min。将等量的蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 通过电印记法转移到PVDF膜上, 10%的脱脂牛奶封闭1 h后, 按照目的条带大小切割温育一抗4 °C过夜。第2天用对应属性的二抗室温温育1 h, 用HRP-ECL荧光法检测目的蛋白的水平。

1.3 统计学处理

采取GraphPad Prism 6或SPSS 16.0进行统计分析, 两组之间比较用*t*检验, 多组之间统计用ANOVA, ROS检测后分析用FlowJo。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SIRT4过表达或Gln剥夺对Caki-2细胞增殖、生长的影响

Western blot结果表明, 构建的SIRT4和SIRT4-H161Y (SIRT4功能突变体) 载体能够通过表达相应蛋白 (图1A)。CCK-8检测结果表明, Gln剥夺48 h能够显著降低Caki-2细胞的增殖速度 ($P < 0.001$); 正常Gln培养时, SIRT4过表达 (overexpression, OE) 能抑制细胞增殖 ($P < 0.05$, 图1B)。为进一步探索SIRT4抑制Gln在Caki-2细胞增殖中的作用, 我们分析了SIRT4突变体H161Y以及回补Gln代谢产物 α -KG后细胞增殖的变化, 结果表明, 在正常Gln培养时, 过表达突变体不能抑制细胞增殖; 另外, Gln剥夺组回补 α -KG后, 即使过表达SIRT4也不能抑制细胞增殖 (图1C)。正常Gln培养时, SIRT4-OE能够减少细胞克隆数目, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而SIRT4-H161Y组却无明显差异。但如果长期缺乏Gln, Caki-2细胞无法生长, 无克隆形成 (图1D)。以上结果表明, SIRT4可通过抑制谷氨酰胺脱氢酶 (glutamate dehydrogenase, GDH), 减少Gln的摄入量, 从而抑制Caki-2细胞增殖; 在Gln剥夺后其细胞增殖抑制作用更为明显。

2.2 Gln代谢生成NADPH影响细胞内ROS

由于Gln代谢过程中会产生相当比例的NADPH, 可作为抗氧化分子中和细胞内ROS, 进而抵抗凋亡。因此NADPH含量检测显得尤为重要, 检测结果表明, Gln剥夺48 h后NADPH生成量显著减少。另外, 正常Gln培养的Caki-2细胞, SIRT4-OE组NADPH生成量比pCDH-con和SIRT-H161Y组减少 (图2A)。氧化应激微环境是影响肿瘤生长、细胞凋亡的重要因素, 为进一步探索SIRT4抑制Gln代谢对Caki-2细胞内ROS的影响, 我们用DCFH-DA检测ROS水平, 结果发现, 正常Gln培养的Caki-2细胞中, SIRT4-OE组ROS水平较其他两组比明显升高; 但细胞Gln剥夺后均会产生高水平的ROS, pCDH-con、SIRT4-OE和SIRT-H161Y这三组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图2B)。

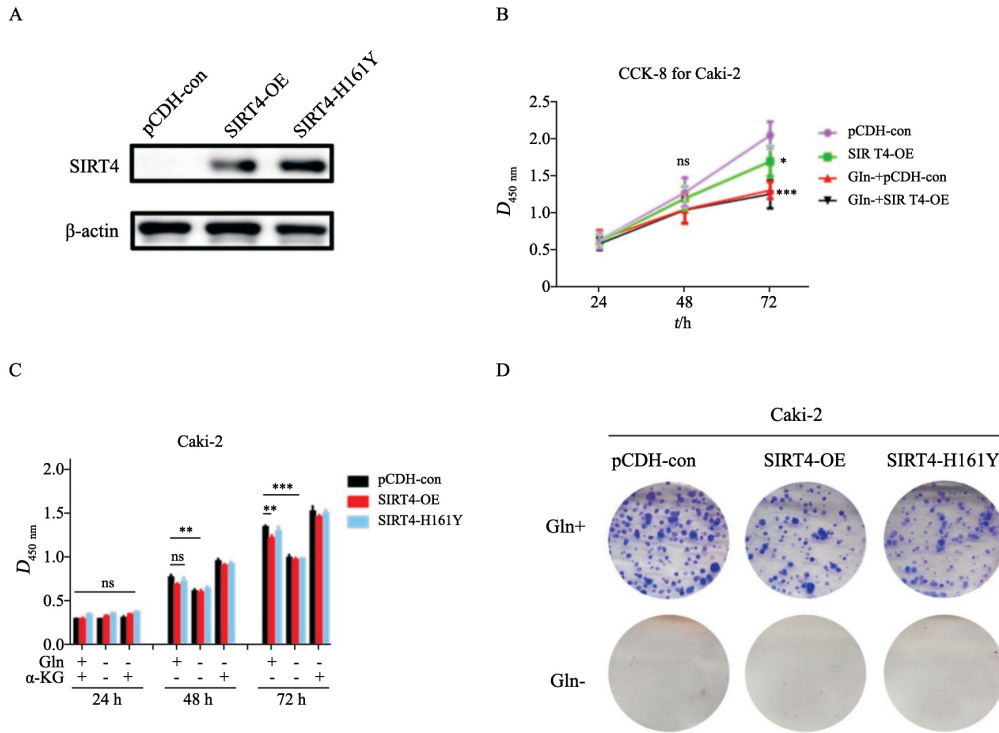


图1 SIRT4过表达和Gln剥夺均能抑制细胞增殖

Fig. 1 SIRT4 overexpression and glutamine deprivation inhibit cell proliferation

A: Protein expression of SIRT4; B: Effects of SIRT4-OE and glutamine deprivation on cell proliferation; C: Cell proliferation of pCDH-con, SIRT4-OE and SIRT4-H161Y in different media; D: Effects of SIRT4-OE and glutamine deprivation on clone formation; *: $P < 0.05$, compared with each other; **: $P < 0.01$, compared with each other; ***: $P < 0.001$, compared with each other; ns: $P > 0.05$, compared with each other

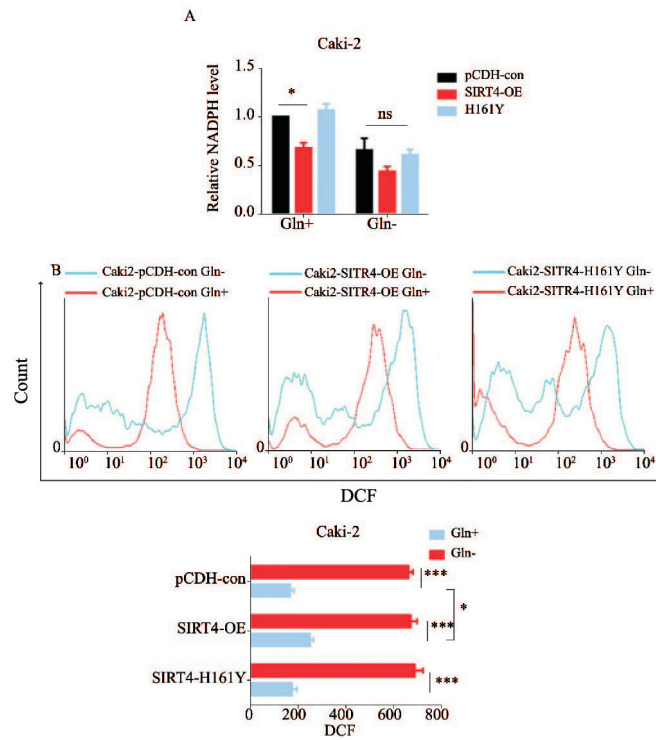


图2 SIRT4-OE或Gln剥夺使得NADPH生成减少, ROS水平增高

Fig. 2 SIRT4-OE or glutamine deprivation reduces NADPH production and increases ROS levels

A: NADPH level in pCDH-con, SIRT4-OE and SIRT4-H161Y groups cultured with or without glutamine; B: ROS level in pCDH-con, SIRT4-OE and SIRT4-H161Y groups cultured with or without glutamine. The quantification analysis was shown below; *: $P < 0.05$, compared with each other; ***: $P < 0.001$, compared with each other; ns: $P > 0.05$, compared with each other

2.3 过表达SIRT4或Gln剥夺对Caki-2细胞凋亡的影响

线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件，非Gln剥夺的细胞，过表达SIRT4后，绿色荧光（JC-1）/红色荧光（JC-1 aggregates）比例升高，意味着线粒体膜电位下降。同时Gln剥夺后pCDH-con、SIRT4-OE、SIRT-H161Y此3组细胞的线粒体膜电位都有明显下降（图3A）。此外，凋亡检测结果表明，正常Gln培养时，pCDH-con、SIRT4-OE和SIRT4-

H161Y细胞凋亡比例分别是2.777%、7.143%和2.363%，SIRT4过表达引起细胞凋亡增加（ $P<0.05$ ）；Gln剥夺引起各组细胞凋亡大幅度增加（图3B）。Bax、caspase-3、caspase-9均是凋亡相关蛋白，我们采用Western blot检测这些蛋白的表达变化来进一步探索SIRT4或Gln剥夺对凋亡的影响。结果显示，非Gln剥夺的Caki-2细胞，SIRT4过表达凋亡相关分子表达量都增加，同时Gln剥夺使得这些分子增加更为明显（图3C）。

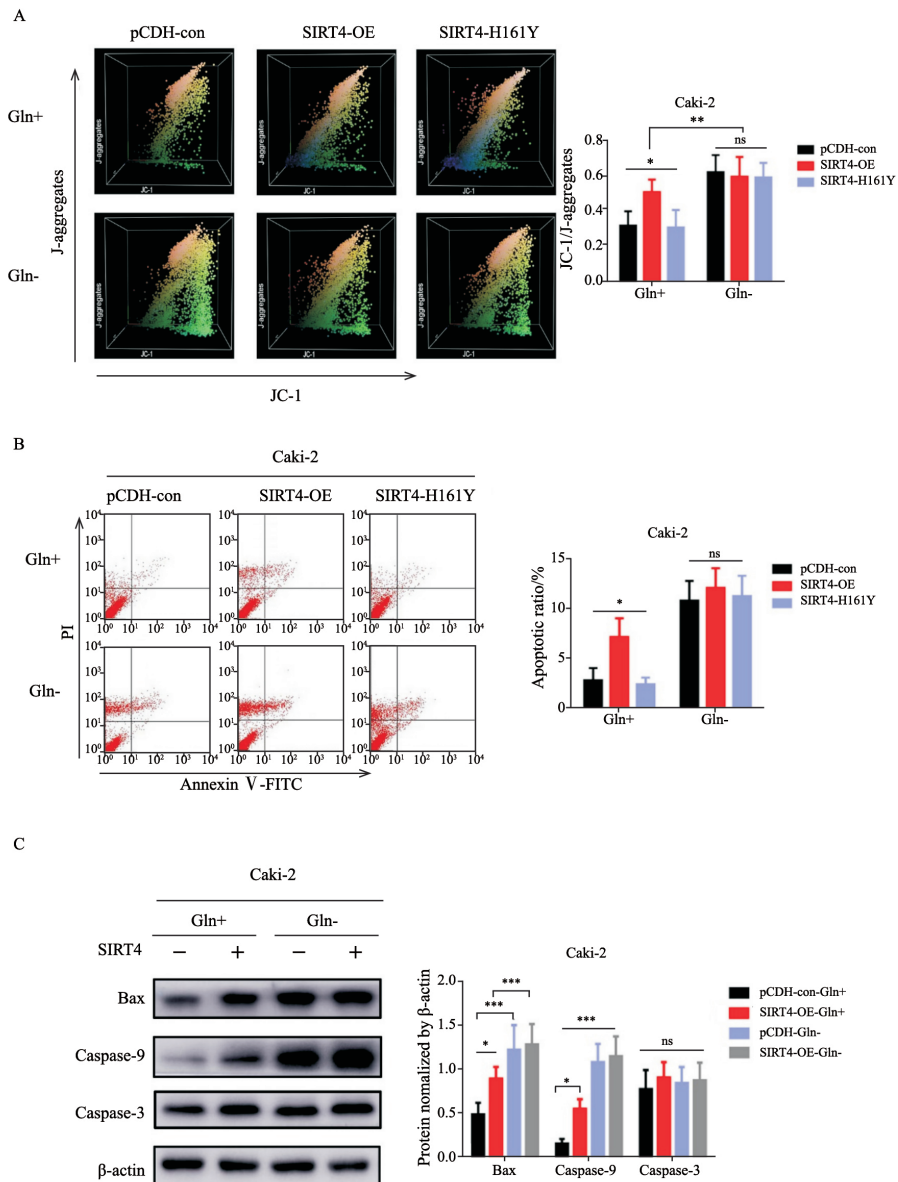


图3 SIRT4-OE或Gln剥夺促进细胞凋亡

Fig. 3 SIRT4-OE or Gln deprivation promotes apoptosis

Determination of mitochondrial transmembrane potential (A) and apoptotic ratio (B) of pCDH-con, SIRT4-OE and SIRT4-H161Y groups cultured with or without glutamine. The analysis was revealed as right; C: Expression levels of Bax, caspase-3 and caspase-9; *: $P<0.05$, compared with each other; **: $P<0.01$, compared with each other; ***: $P<0.001$, compared with each other; ns: $P>0.05$, compared with each other

3 讨 论

ccRCC具有明显的代谢重编程特征,与葡萄糖、谷氨酰胺、脂肪酸等代谢途径发生改变有关。可利用改变的代谢途径作为潜在的治疗策略,SIRT4就是一个控制Gln代谢的重要分子。现有研究^[8]表明,SIRT4作为一个抑癌基因参与肿瘤的发生、发展过程。在人类癌症和小鼠肿瘤模型中,SIRT4可以通过影响Gln代谢发挥其抑制肿瘤的作用^[9-10],目前尚无SIRT4在ccRCC中作用的研究。本研究发现,Gln剥夺对ccRCC细胞Caki-2的增殖、凋亡影响最为明显。然而,谷氨酰胺被众多细胞途径所利用,包括核苷酸的产生^[14],DNA^[15]和RNA^[16]的合成,虽然肿瘤细胞对Gln十分依赖,存在“谷氨酰胺成瘾”现象,同时除了葡萄糖以外,Gln也是哺乳动物细胞用于生长和增殖的主要元素之一,对正常细胞同样是必不可少的,因此彻底剥夺Gln是对肿瘤细胞最有效却并非是一个最好的治疗方法。如果能够增加SIRT4在ccRCC肿瘤组织中的表达量(如SIRT4激活剂)就能减少肿瘤细胞Gln的利用,发挥抑制肿瘤生长、促进凋亡的作用。除此之外,抑制Gln代谢减少NADPH生成使得ROS显著升高,肿瘤细胞比正常细胞对高浓度的ROS更敏感,会因细胞结构不稳定等原因导致肿瘤细胞走向凋亡坏死。综上所述,SIRT4对ccRCC而言是一个有利分子,或将成为阻止肿瘤摄取Gln潜在的治疗靶向分子。

[参 考 文 献]

- [1] LAI Y, ZHAO Z, ZENG T, et al. Crosstalk between VEGFR and other receptor tyrosine kinases for TKI therapy of metastatic renal cell carcinoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 31.
- [2] HENSLEY C T, WASTI A T, DEBERARDINIS R J. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123 (9): 3678–3684.
- [3] WETTERSTEN H I, ABOUD O A, LARA P N JR, et al. Metabolic reprogramming in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2017, 13 (7): 410–419.
- [4] TRIVEDI R, DIHAZI G H, ELTOWEISSY M, et al. The antioxidant protein PARK7 plays an important role in cell resistance to cisplatin-induced apoptosis in case of clear cell renal cell carcinoma [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 784: 99–110.
- [5] PARK E S, KANG J C, JANG Y C, et al. Cardioprotective effects of rhamnetin in H9c2 cardiomyoblast cells under H2O2-induced apoptosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153 (3): 552–560.
- [6] LOMBARD D B, ALT F W, CHENG H L, et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27 (24): 8807–8814.
- [7] HAIGIS M C, MOSTOSLAVSKY R, HAIGIS K M, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells [J]. *Cell*, 2006, 126 (5): 941–954.
- [8] ZHU Y, YAN Y, PRINCIPE D R, et al. SIRT3 and SIRT4 are mitochondrial tumor suppressor proteins that connect mitochondrial metabolism and carcinogenesis [J]. *Cancer Metab*, 2014, 2: 15.
- [9] CSIBI A, FENDT S M, LI C, et al. The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4 [J]. *Cell*, 2013, 153 (4): 840–854.
- [10] MIYO M, YAMAMOTO H, KONNO M, et al. Tumour-suppressive function of SIRT4 in human colorectal cancer [J]. *Br J Cancer*, 2015, 113 (3): 492–499.
- [11] JEONG S M, XIAO C, FINLEY L W, et al. SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23 (4): 450–463.
- [12] LI Z, LI H, ZHAO Z B, et al. SIRT4 silencing in tumor-associated macrophages promotes HCC development via PPARdelta signalling-mediated alternative activation of macrophages [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38 (1): 469.
- [13] FU L, DONG Q, HE J, et al. SIRT4 inhibits malignancy progression of NSCLCs, through mitochondrial dynamics mediated by the ERK-Drp1 pathway [J]. *Oncogene*, 2017, 36 (19): 2724–2736.
- [14] ALTMAN B J, STINE Z E, DANG C V. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16 (10): 619–634.
- [15] TURGEON M O, PERRY N J S, POULOGIANNIS G. DNA damage, repair, and cancer metabolism [J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 15.
- [16] NEWSHOLME E A, CRABTREE B, ARDAWI M S. Glutamine metabolism in lymphocytes: its biochemical, physiological and clinical importance [J]. *Q J Exp Physiol*, 1985, 70 (4): 473–489.

(收稿日期: 2020-02-15 修回日期: 2020-04-30)