

SIRT1 基因敲低增强 HepG2 细胞对单壁碳纳米角的敏感性

贺轲, 黄睿, 夏正林, 段小鹏, 何景亮, 李伯伟, 张锦前, 向国安
广东省第二人民医院普通外科, 广东 广州 510317

【摘要】目的:探讨 SIRT1 基因敲低增强 HepG2 细胞对单壁碳纳米角(Single-Walled Carbon Nanohorns, SWNHs)的敏感性。**方法:**通过在 HepG2 细胞中建立过表达和敲低 SIRT1 的细胞株, 流式细胞检测不同 SIRT1 表达水平对 HepG2 细胞周期的影响; 采用不同浓度 SWNHs 对 HepG2 细胞进行处理, CCK-8 法评估 HepG2 细胞对 SWNHs 的敏感性; 采用 Western blotting 探索 SIRT1 影响 HepG2 细胞凋亡的机制。**结果:**获得低表达 si-SIRT1 和高表达 pLV-SIRT1 细胞株, 发现 si-SIRT1 组细胞周期阻滞, 并且有 $(14.94 \pm 1.22)\%$ 细胞出现凋亡, HepG2 组和 pLV-SIRT1 组细胞凋亡率分别为 $(5.43 \pm 0.34)\%$ 和 $(4.49 \pm 0.34)\%$, si-SIRT1 组与之相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); SIRT1 基因敲低增强 HepG2 细胞对 SWNHs 的敏感性, 低表达 si-SIRT1 组的数据显示, 低浓度 SWNHs10 在 24 h 后 si-SIRT1-HepG2 细胞的活性下降到 $(43.22 \pm 2.21)\%$, 而最大剂量 SWNHs40 在 48 h 后 si-SIRT1-HepG2 细胞的活性下降到 $(2.02 \pm 0.13)\%$, 与对照组(HepG2 组)相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 通过 Western-blotting 验证, si-SIRT1 组的 P53 表达增高, 其相关下游凋亡蛋白 Caspase-3、Caspase-7 也出现高表达。**结论:**通过敲低 SIRT1 后 HepG2 细胞周期阻滞, 对 SWNHs 的敏感性显著增强, SWNHs 有望成为一种有效的生物治疗肝癌的新方法。

【关键词】SIRT1; 基因敲低; HepG2; 单壁碳纳米角; 细胞周期; 细胞凋亡

【中图分类号】R392.12

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2017)05-0484-05

Cell viability sensitivity of HepG2 cells to single-walled carbon nanohorns enhanced by knocking down SIRT1

HE Ke, HUANG Rui, XIA Zhenglin, DUAN Xiaopeng, HE Jingliang, LI Bowei, ZHANG Jinqian, XIANG Guo'an
Department of General Surgery, Guangdong Second Provincial General Hospital, Guangzhou 510317, China

Abstract: Objective To examine the sensitivity of HepG2 cells to single-walled carbon nanohorns (SWNHs) at different SIRT1 expression levels. **Methods** HepG2 cells were transfected with si-SIRT1 and pLV-SIRT1 to obtain the overexpressing and knockdown SIRT1 cell lines, respectively. The effects of different SIRT1 expression levels on the cell cycle of HepG2 cells were detected with flow cytometry. HepG2 cells were treated with different concentrations of SWNHs, and the sensitivity of HepG2 cells to SWNHs was evaluated with CCK-8 method. Western blotting was used to investigate the effects of SIRT1 on the apoptosis of HepG2 cells. **Results** Knockdown si-SIRT1-HepG2 and overexpressing pLV-SIRT1-HepG2 cell lines were obtained. Cell cycle arrest was observed in si-SIRT1 group, and the apoptotic cells rate were $(14.94 \pm 1.22)\%$ compared to $(5.43 \pm 0.34)\%$ in HepG2 group and $(4.49 \pm 0.34)\%$ in pLV-SIRT1 group, with statistical significance ($P < 0.05$). SIRT1 knockdown enhances the sensitivity of HepG2 cells to SWNHs. The cell viability of si-SIRT1-HepG2 cells decreased to $(43.22 \pm 2.21)\%$ after being treated with the low concentration of SWNHs10 for 24 h, and decreased to $(2.02 \pm 0.13)\%$ after being treated with the maximum dose SWNHs40 for 48 h, with significant differences compared with the control group (HepG2 group) ($P < 0.05$). The western-blot verified that the expression of P53 in si-SIRT1 group was increased, and the expressions of Caspase-3 and Caspase-7 in the downstream related apoptosis protein were also at the high levels. **Conclusion** By knocking down SIRT1, HepG2 cell cycle arrest can be observed and the sensitivity of HepG2 cell to SWNHs is significantly enhanced. SWNHs is expected to be a new effective method for the biological treatment of liver cancer.

Keywords: SIRT1; gene knockdown; HepG2; single-walled carbon nanohorns; cell cycle; apoptosis

【收稿日期】2017-01-15

【基金项目】国家自然科学基金(81641110); 广东省自然科学基金(2015A030313725)

【作者简介】贺轲, 硕士, 主治医师, 主要从事腹腔镜外科、消化道疾病方面的研究, E-mail: hiker00006@126.com

【通信作者】向国安, 博士, 主任医师, 博士生导师, E-mail: guoan_66@163.com

前言

肝细胞肝癌是常见的恶性肿瘤,世界卫生组织统计数据显示,全球每年肝癌新发病例约63万例,死亡人数近60万。2015年我国每年新发肝癌患者超过46.6万,仅次于肺癌、胃癌及食道癌,排第4位,死亡率居各种肿瘤的第2位,而且常见于中年男性^[1-2]。肝癌确诊后未得到有效治疗的患者,其中位生存期平均仅为6个月,5年生存率小于5%^[1]。目前,已明确我国肝癌主要致病因素是慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染,预后较差^[3],其根本原因是HBV与肝癌的发病机制至今未能完全明确、缺乏准确的早期诊断方法和有效的针对性治疗药物^[4]。因此明确肝癌尤其是HBV相关肝癌的发病机制一直是肝癌防治研究领域的关键问题之一,而准确的早期诊断方法和有效的针对性治疗肝癌的药物更是国内外多年研究所探求的目标。

近年来纳米技术成为最具市场应用潜力的新兴科学技术之一。医药使用纳米技术能使药品生产过程越来越精细,并在纳米材料的尺度上直接利用原子、分子的排布制造具有特定功能的药品。纳米材料粒子使药物在人体内的传输更为方便,用数层纳米粒子包裹的智能药物进入人体后可主动搜索并攻击癌细胞或修补损伤组织;使用纳米技术的新型诊断仪器只需检测少量血液,就能通过其中的蛋白质和DNA诊断出各种疾病^[5-7]。另外,还有研究者发现纳米材料对温度变化、红外线十分敏感^[8]。本课题组前期研究工作所使用的碳纳米材料即单壁碳纳米管(Single-Walled Carbon Nanotubes, SWNTs),是由合作伙伴北京大学化学分子工程学院纳米碳材料化学研究组与北京大学基础医学院药学院共同研发的新型碳纳米材料,全世界仅两家实验室可制备。SWNTs是由单层石墨卷曲而成的管状结构,直径2~5 nm,通常团聚成直径为数十纳米的球形聚集体^[9]。由于碳纳米材料所具有的独特结构,其外表面除了可以非共价力吸附各种分子,还可以键合多种化学基团以实现增溶及靶向,其内部空间则可以包埋离子及小分子,并且能以最小毒性穿越细胞膜,因此在生物医学,包括药物传递、分子影像、基因治疗等方面具有较好的应用前景^[10]。

我们前期研究了SWNTs对HCC和正常肝细胞的影响及其机制,结果提示SWNTs可明显抑制人HCC增殖,诱导细胞凋亡,其凋亡机制可能是通过对SIRT1抑制从而激活P53阻断细胞增殖并诱导凋亡^[9]。本实验通过过表达和敲低SIRT1,探讨肝细胞

癌SIRT1表达水平对SWNTs的敏感性,进而发现SIRT1敲低增强HCC对SWNTs的敏感性。

1 材料和方法

1.1 材料

HepG2肝癌细胞株购于中科院细胞库;SWNTs由北京大学化学与分子工程学院稀土材料化学及应用国家重点实验室合成;SIRT1、P53抗体(美国,Abcam);DMEM培养基(美国,Thermo);胎牛血清(美国,Gibco);胰蛋白酶(美国,Gibco);乙二醇四乙酸(美国,Sigma-Aldrich);Hyclone双抗(美国,Thermo);SIRT1质粒以及慢病毒系统(中国,Inovogen),siRNA-SIRT1(中国,SHBIO)。

1.2 敲低和过表达SIRT1的HepG2细胞株建立

使用Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA)转染siRNA和载体至细胞,转染后48 h收获细胞,分析敲低效率。验证后,重复上述步骤进行收获用于测定的细胞。为建立稳定的SIRT1过表达细胞,过表达质粒由Inovogen构建;然后质粒通过慢病毒系统包装。除去细胞的培养基后,加入慢病毒上清液(加入6 $\mu\text{g/mL}$ 聚凝胺)。24 h后,除去上清液,使用含有10 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素(Sigma-Aldrich, St Louis, MO)的DMEM培养4周后,得到过表达细胞株。

1.3 细胞周期检测

常规方法计数并收集细胞(约 $2 \times 10^6/\text{mL}$), $1 \times \text{PBS}$ 洗涤1次(1 000 r/min, 5 min)。预冷,75%乙醇固定,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。弃去75%乙醇, $1 \times \text{PBS}$ 洗涤1次(1 000 r/min, 5 min)。重悬细胞于800 μL $1 \times \text{PBS} + 1\%$ BSA溶液中,加入100 μL PI染液(3.8% sodium citrate, pH 7.0),加100 μL RNA酶(Rnase A, 10 mg/mL),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min,上机检测。检测前预热30 min后荧光微球调整仪器,使各放大器接收信号的HCV值 $<2\%$,采用Cell Modifit软件进行分析。低于 G_1 期的细胞(亚二倍体 G_0/G_1 峰)为凋亡细胞,其占细胞总数的比例为凋亡细胞率。

1.4 细胞增殖实验和细胞耐药性实验(CCK-8法)

按前期实验数据^[5],SWNTs用4个浓度进行实验:SWNTs10: 0.21 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、SWNTs 20: 0.42 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、SWNTs 30: 0.64 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、SWNTs 40: 0.85 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。每孔(96孔板)细胞(约 1×10^5 个细胞)铺入各组细胞,将培养体系体积调整至100 μL ,每个实验组或者对照组均设置3个平行孔检测,并设置本底对照孔。对细胞进行检测,每孔加入10 μL CCK-8溶液。之后在培养箱内孵育1~4 h,将96孔板置于摇床上摇动1 min,以充分混匀待检测体系,之后使用酶标仪在450 nm测定吸光度。

1.5 Western blotting

对各组细胞提取总蛋白,将细胞蛋白和上样缓冲液混合后,上样在10%分离胶和5%浓缩胶上,应用电转移电泳将分离后的蛋白转移至NC膜上。NC膜于室温经5%脱脂奶粉-PBS溶液封闭1 h后,一抗4℃孵育12 h。之后用PBS缓冲液将NC膜清洗3次后,再于室温用HRP交联的二抗孵育1 h。之后NC膜经PBS缓冲液清洗3次后,应用增强的化学发光法显影。

1.6 统计学分析

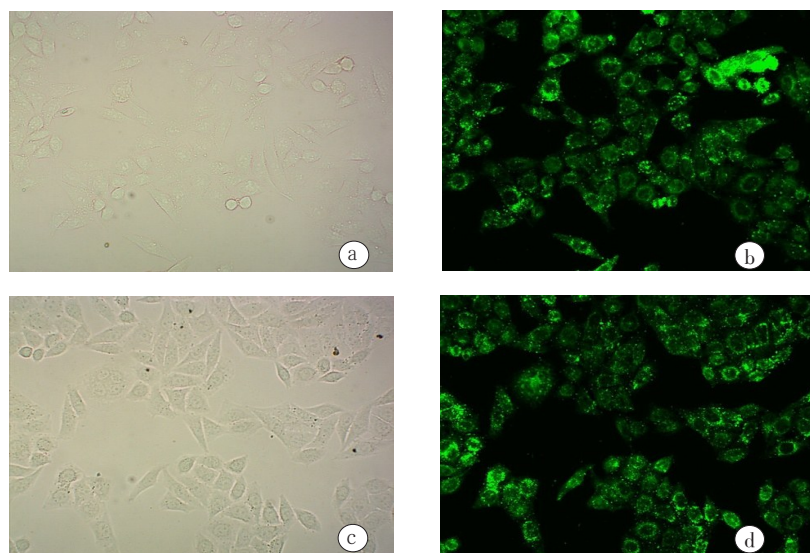
连续正态分布的变量数据用均数±标准差表示。对于两种细胞同一SWNHs浓度的处理结果采用 t 检验,对于同一细胞不同SWNHs浓度的处理结

果采用方差分析进行统计学比较,两两比较用SNK法。所有数据均适用SPSS17.0软件进行分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 获得敲低和过表达SIRT1的HCC细胞株

si-SIRT1转染和带SIRT1基因的慢病毒转染HepG2分别获得低表达si-SIRT1-HepG2和高表达pLV-SIRT1-HepG2细胞株,效率最高的为24 h,采集该时间点,见图1。通过荧光镜下视野与光镜下视野对比可知(分别计数白光和荧光下细胞数量,二者比较),细胞的转染效率达到80%以上,可进行后续实验。



a & b: The vision of light microscopy and fluoroscopic field, after HepG2 cell was transfected with si-SIRT1; c & d: The vision of light microscopy and fluoroscopic field, after HepG2 cell was transfected with lentivirus with SIRT1 gene.

图1 获得低表达si-SIRT1-HepG2和高表达pLV-SIRT1-HepG2细胞株(放大倍数:×200)

Fig.1 Cell lines of knockdown si-SIRT1-HepG2 and overexpressing pLV-SIRT1-HepG2 cell (Magnification: ×200)

2.2 SIRT1不同表达水平对HepG2细胞周期的影响

低表达si-SIRT1组、HepG2细胞(Control组)及高表达pLV-SIRT1组通过流式细胞仪检测,发现si-SIRT1组细胞周期阻滞,并且有(14.94±1.22)%细胞出现凋亡,与HepG2组的(5.43±0.34)%和pLV-SIRT1组的(4.49±0.34)%相比,差异有统计学意义($P<0.05$,图2)。

2.3 SIRT1敲低增强HepG2对SWNHs的敏感性

低表达si-SIRT1组、HepG2细胞组及高表达pLV-SIRT1组在不浓度以及不同时间处理后,采用CCK8法检测各组细胞的活性。不同浓度SWNHs能明显抑制HepG2细胞的活性($P<0.05$),见图3a,这与我们的前期研究结果相同^[5],而在高表达pLV-SIRT1组出现HepG2对SWNHs的耐药情况,见图3b。低表达si-

SIRT1组数据显示,低浓度SWNHs10在24 h后si-SIRT1-HepG2细胞的活性下降到(43.22±2.21)%,而HepG2细胞的活性为(58.41±1.84)%,差异具有统计学意义($P<0.05$);而最大剂量SWNHs40在48 h后si-SIRT1-HepG2细胞的活性下降到(2.02±0.13)%,HepG2细胞的活性为(11.35±0.84)%,差异具有统计学意义($P<0.05$,图3c)。

2.4 SWNHs对SIRT1敲低的HepG2的凋亡途径

前期实验,我们采用Western blotting发现SIRT1与P53呈负相关^[5]。将低表达si-SIRT1组、HepG2细胞(Control组)及高表达pLV-SIRT1组在48 h时用SWNHs40浓度处理,通过Western blotting验证,si-SIRT1组P53显著性高表达,其相关下游凋亡蛋白

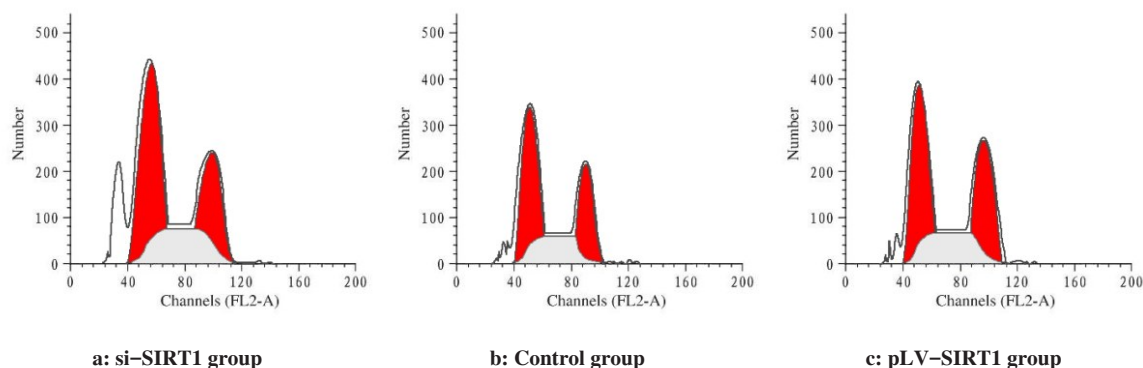


图2 SIRT1 不同表达水平对 HepG2 细胞周期的影响

Fig.2 Effects of different SIRT1 expression levels on the cell cycle of HepG2 cells

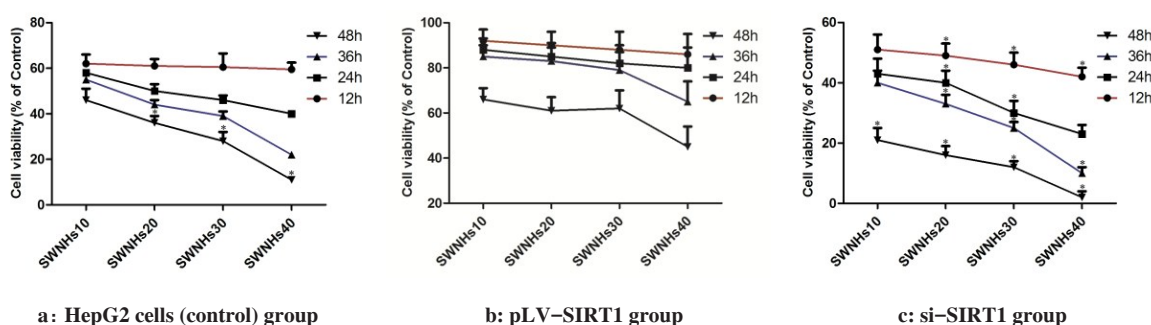
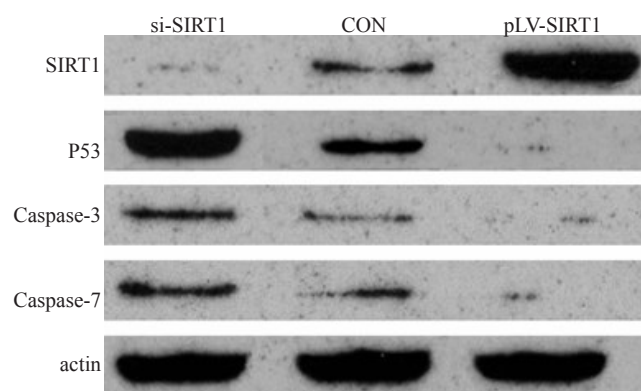


图3 CCK8 法检测不同浓度 SWNHs 处理后的细胞活性

Fig.3 Cell viability after the treatment of different concentrations of SWNHs detected with CCK8 method

Caspase-3、Caspase-7 也出现高表达,表明可以进一步促进被 SWNHs 损伤的 HepG2 细胞的凋亡(图4)。



The expression levels of SIRT1, P53, Caspase-3 and Caspase-7 were verified by Western blotting at 48 h after treatment with SWNHs40.

图4 相关凋亡蛋白检测

Fig.4 Detection of related apoptosis protein

3 讨论

近年来新兴纳米技术中的碳纳米材料,其在医学诊断和治疗领域中已有诸多研究且极具应用前

景^[11]。我们对 SWNHs 的前期研究发现:SWNHs 可明显抑制人肝癌细胞系 HepG2 以及人正常肝细胞系 L02 的细胞增殖,诱导细胞凋亡;其凋亡机制可能是通过对 SIRT1 抑制从而激活 P53 阻断细胞增殖并诱导凋亡^[9]。本文主要通过体外实验,通过敲低和过表达 SIRT1,发现敲低 SIRT1 后 HepG2 细胞对 SWNHs 的敏感性增强,为肝癌的治疗提供新的思路和方法。

在健康细胞中,P53 可以监控细胞分裂,必要时可以停止分裂或者进行 DNA 损伤的修复^[12]。如果细胞损害太大,P53 可以诱导细胞凋亡;在许多癌细胞中,如果 P53 丢失细胞就会经历一个自我组装的过程,在该过程中一个称为 MK2 的通道可以取代 P53 的部分功能,可使细胞对 DNA 损伤进行修复,并继续分裂,但是如果损伤不大,它则不会强迫细胞进行细胞凋亡,这使得癌细胞在化疗后继续不受控制的增长^[13-15]。我们的前期研究发现,SWNHs 可能是通过对 SIRT1 抑制从而激活 P53 阻断细胞增殖并诱导凋亡,可以在一定程度上阻断 MK2 通道的出现,所以本文设计了敲低 SIRT1 的实验,来证明是否可以进一步增强 HepG2 细胞对 SWNHs 的敏感性。正如我们的推测,通过敲低 SIRT1 后 HepG2 细胞周期阻滞,并且

已经出现部分细胞的凋亡,不同浓度 SWNHs 的处理,体现了超强的杀伤能力,较我们前期研究有明显的提高,对 SWNHs 的敏感性增强。我们再次通过 Western blotting 验证,si-SIRT1 组 P53 的显著性高表达,其相关下游凋亡蛋白 Caspase-3、Caspase-7 也出现高表达,表明可以进一步促进被 SWNHs 损伤的 HepG2 细胞的凋亡,并影响 HepG2 细胞的增殖。

SWNHs 可能成为一种有效的生物治疗肝癌的新方法,本研究旨在为 SWNHs 用于肝癌治疗奠定临床前的研究工作基础,对 SWNHs 进入临床后的化疗耐药提供新的研究思路和方向。

【参考文献】

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] 徐向南, 肖永胜, 樊嘉. 肝星状细胞与肝癌的研究进展[J]. *中国临床医学*, 2012, 19(6): 705-707.
XU X N, XIAO Y S, FAN J. Hepatic stellate cells and hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of Clinical Medicine*, 2012, 19(6): 705-707.
- [3] 郝连杰. 肝细胞肝癌与病毒性肝炎: 病毒抗原表达免疫组织化学研究[J]. *暨南大学学报(自然科学与医学版)*, 1998, 19(6): 56-57.
HAO L J. Hepatocellular carcinoma and viral hepatitis: study of viral antigen expression immunohistochemistry [J]. *Journal of Jinan University (Natural Science & Medicine Edition)*, 1998, 19(6): 56-57.
- [4] 刘刚, 卢光琇. 湖南汉族人群 CTLA4 基因+49G/A 多态性与乙肝感染和乙肝源性肝癌相关性的初步研究[J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(8): 1838-1840.
LIU G, LU G X. Association of CTLA4 gene +49G/A polymorphism with HBV infection and HBV-related hepatocellular carcinoma in Hunan Han population[J]. *Journal of Southern Medical University*, 2010, 30(8): 1838-1840.
- [5] MOHAMADI N L, KAZEMI S M, MOHAMMADIAN M, et al. Toxicity of cisplatin-loaded poly butyl cyanoacrylate nanoparticles in a brain cancer cell line: anionic polymerization results[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2017, 18(3): 629-632.
- [6] SUN L, WANG D, CHEN Y, et al. Core-shell hierarchical mesostructured silica nanoparticles for gene/chemo-synergetic stepwise therapy of multidrug-resistant cancer[J]. *Biomaterials*, 2017, 133: 219-228.
- [7] NEMMAR A, AL-SALAM S, BEEGAM S, et al. The acute pulmonary and thrombotic effects of cerium oxide nanoparticles after intratracheal instillation in mice[J]. *Int J Nanomed*, 2017, 12: 2913-2922.
- [8] GANNON C J, CHERUKURI P, YAKOBSON B I, et al. Carbon nanotube-enhanced thermal destruction of cancer cells in a noninvasive radiofrequency field[J]. *Cancer*, 2007, 110(12): 2654-2665.
- [9] ZHANG J, SUN Q, BO J, et al. Single-walled carbon nanohorn (SWNH) aggregates inhibited proliferation of human liver cell lines and promoted apoptosis, especially for hepatoma cell lines[J]. *Int J Nanomed*, 2014, 9(1): 759-773.
- [10] SCHEINBERG D A, VILLA C H, ESCORCIA F E, et al. Conscripts of the infinite armada: systemic cancer therapy using nanomaterials [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7(5): 266-276.
- [11] 薛芳沁, 陈鸿源, 许超, 等. 纳米炭示踪在结直肠癌根治术淋巴结检出中的应用[J]. *中国医学物理学杂志*, 2015, 32(4): 490-492.
XUE F Q, CHEN H Y, XU G, et al. Application of carbon nanoparticles on the detection of lymph nodes in radical resection for colorectal cancer [J]. *Chinese Journal of Medical Physics*, 2015, 32(4): 490-492.
- [12] VELLETRI T, XIE N, WANG Y, et al. P53 functional abnormality in mesenchymal stem cells promotes osteosarcoma development[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(1): e2015.
- [13] MORANDELL S, REINHARDT H C, CANNELL I G, et al. A reversible gene-targeting strategy identifies synthetic lethal interactions between MK2 and p53 in the DNA damage response *in vivo*[J]. *Cell Rep*, 2013, 5(4): 868.
- [14] REINHARDT H, ASLANIAN A J, YAFFE M. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. [J]. *Cancer Cell*, 2007, 11(2): 175-189.
- [15] RAZZAK M. Basic research: MK2 and p53: a lethal pairing[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(1): 3.

(编辑:黄开颜)