

[文章编号] 1000-4718(2019)09-1545-06

SIRT1 通过调节 FOXO1/RAB7 信号通路促进低氧诱导的胰腺癌细胞自噬*

田 舍^{1,2}, 江建新³, 喻 超^{1,2}, 李 琳¹, 孙诚谊^{1,2△}
(¹贵州医科大学, ²贵州医科大学肝胆胰脾重点实验室, 贵州 贵阳 550001;
³武汉大学人民医院, 湖北省人民医院, 湖北 武汉 430000)

[摘 要] 目的: 探讨 SIRT1 对低氧诱导的胰腺癌细胞自噬的影响及 FOXO1/RAB7 信号通路在其中的作用。方法: 利用 Western blot 和免疫荧光法检测 SIRT1 在低氧诱导的自噬胰腺癌细胞核内的表达情况。将下调 *SIRT1* 基因的小干扰 RNA 和过表达 *SIRT1* 的质粒转染到胰腺癌 Panc-1 细胞中, 敲减和过表达 *SIRT1* 基因; 激光共聚焦显微镜追踪双色 LC3 荧光蛋白表达, Western blot 实验检测自噬相关蛋白 LC3、p62 及 FOXO1/RAB7 信号通路的蛋白表达情况。通过生物信息学 GEPIA 网站关联性分析预测 SIRT1 与 FOXO1 的相互作用, 并进一步利用免疫共沉淀技术检测 SIRT1 与 FOXO1 蛋白的相互作用。结果: SIRT1 在低氧诱导的胰腺癌细胞核内表达增加。敲减 *SIRT1* 的表达可以引起胰腺癌细胞自噬受抑制。过表达 *SIRT1* 能够增强 Panc-1 细胞中 FOXO1 和 RAB7 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 而当 *SIRT1* 表达下调时, FOXO1 和 RAB7 表达受到抑制 ($P < 0.05$)。SIRT1 与 FOXO1 蛋白存在相互作用。结论: SIRT1 可能参与胰腺癌细胞自噬的调控, 其机制可能与 FOXO1/RAB7 信号通路有关。

[关键词] 胰腺癌; SIRT1 蛋白; 自噬; FOXO1/RAB7 信号通路
[中图分类号] R735.9; R730.23 [文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.09.002

SIRT1 promotes autophagy of pancreatic cancer cells induced by hypoxia via regulating FOXO1/RAB7 signaling pathway

TIAN She^{1,2}, JIANG Jian-xin³, YU Chao^{1,2}, LI Lin¹, SUN Cheng-yi^{1,2}
(¹Guizhou Medical University, ²Key Laboratory of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Guizhou Medical University, Guiyang 550001, China; ³Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei General Hospital, Wuhan 430000, China. E-mail: chengyisun@medmail.com.cn)

[ABSTRACT] AIM: To investigate the effect of SIRT1 on the autophagy of pancreatic cancer cells under hypoxia condition, and to analyze the underlying mechanism of regulating FOXO1/RAB7 signaling pathway. METHODS: Western blot and immunofluorescence methods were used to determine the expression of SIRT1 in the pancreatic cancer cells. The small interfering RNA targeting *SIRT1* and *SIRT1* over-expression plasmid were transfected into the pancreatic cancer Panc-1 cells. Confocal microscopy was used to detect the LC3 expression. Western blot was used to analyze the protein levels of LC3, p62 and FOXO1/RAB7 signaling pathway-related molecules. Co-immunoprecipitation was used to detected the protein interaction between SIRT1 and FOXO1. RESULTS: The expression level of SIRT1 in the nucleus of Panc-1 cells was increased under hypoxia condition. Compared with negative control under hypoxia condition, knock-down of *SIRT1* expression attenuated the autophagy flux in the pancreatic cancer Panc-1 cells ($P < 0.05$). Over-expression of *SIRT1* increased the protein levels of FOXO1 and RAB7. On the contrary, knock-down of *SIRT1* expression inhibited the protein levels of FOXO1 and RAB7. The protein interaction between SIRT1 and FOXO1 in the pancreatic cancer cells was observed. CONCLUSION: SIRT1 in pancreatic cancer Panc-1 cells under hypoxia condition is over-expressed in the nucleus. Down-regulation of *SIRT1* inhibits autophagy and its mechanism may be related to FOXO1/RAB7 signaling pathway.

[收稿日期] 2018-08-22 [修回日期] 2019-01-15
* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81660483); 贵州省科学技术基金资助项目 (黔科合 J 字 [2015]2013 号); 贵州省肝胆外科临床医学研究中心 (黔科合平台人才 [2017]5404 号); 贵州省高层次创新人才培养计划“十”层次人才 (黔科合平台人才 [2016]5647 号); 贵州省科学技术厅 - 贵阳医学院院士工作站肝胆外科分站 (黔科合院士站 [2015]4013 号); 贵州省孙诚谊“肝胆胰脾疾病诊治”导师工作室 (黔教研合 GZS [2016]09 号)
△通讯作者 Tel: 0851-86771326; E-mail: chengyisun@medmail.com.cn

[KEY WORDS] Pancreatic cancer; SIRT1 protein; Autophagy; FOXO1/RAB7 signaling pathway

胰腺癌在世界肿瘤排名中为第7位,是恶性程度较高的实体肿瘤之一,发生隐匿、发展迅速,明确诊断时往往已经是进展期,5年生存率低于5%^[1-2];随着前沿科技不断运用于临床,针对胰腺癌患者的系统治疗方案不断改善,但是临床治疗效果并没有明显提高,约40%的新诊断胰腺癌患者均发现有不同程度的转移,丧失了最佳手术时间,只能采取姑息性治疗^[3-4]。全球的学者们从胰腺肿瘤生物学特性及其发生的分子生物学机制发生、发展的分子靶点为突破口,为寻找治疗胰腺肿瘤的分子治疗靶点。

哺乳动物沉默信息调节因子2(silent information regulator 2, Sir2)最早在酵母菌中被发现,后来逐渐发现在自然界生物中广泛的表达。Sir2作为组蛋白去乙酰化酶类,通过调控下游结合蛋白的去乙酰化水平来参与细胞内多个重要信号通路,如能量代谢、脂类代谢和胰岛素分泌等。Sir2家族中研究最多的是SIRT1;目前为止的研究中发现多个重要信号通路的枢纽蛋白与SIRT1相互作用;更多的研究指出SIRT1在肿瘤代谢和营养调节中有着极其重要的作用;现在的证据显示肿瘤细胞中经过上调SIRT1的表达及活性来提高胞内NAD⁺数量来应对肿瘤的生存和增殖。

本研究中,我们将SIRT1小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)和过表达质粒分别转染到胰腺癌Panc-1细胞中,敲减和过表达SIRT1基因,研究其对于胰腺癌细胞自噬能力的影响,并分析SIRT1对FOXO1/RAB7信号通路的调控作用,初步探讨相关分子机制,为寻找胰腺癌治疗相关的分子靶点提供理论依据。

材 料 和 方 法

1 细胞和试剂

人胰腺癌细胞株Panc-1由武汉华中科技大学同济医学院胆胰实验室惠赠。高糖DMEM培养基与胎牛血清购自Gibco;RNAiMAX转染试剂购自Invitrogen;LC3双标腺病毒购自汉恒生物科技(上海)有限公司;SIRT1 siRNA(si-SIRT1)设计及构建由广州锐博公司完成;鼠抗人SIRT1抗体及兔抗人p62、FOXO1和RAB7抗体购Cell Signaling Technology;鼠抗人GAPDH和histone H3抗体、辣根过氧化物酶标记的II抗及高灵敏度化学发光检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;细胞裂解液、细胞核蛋白

与细胞浆蛋白抽提试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒和DAPI染料购自北京碧云天生物技术有限公司;Protein A/G琼脂糖珠购自Santa Cruz。pFlag-FOXO1和pHA-SIRT1质粒由本实验室构建。

2 主要方法

2.1 细胞培养及转染 人胰腺癌细胞株Panc-1用含10%胎牛血清、 1×10^5 U/L青霉素和100 mg/L链霉素的DMEM培养基培养。每隔24 h换液1次,待细胞密度为80%时,常规进行消化传代。细胞培养分2组:对照组细胞于37 °C、5% CO₂、95%空气在恒温培养箱中常规培养;实验组细胞于37 °C、5% CO₂、94% N₂、1% O₂三气培养箱中进行低氧培养12 h。选取对数生长期的细胞接种于6孔板,调整细胞密度为每孔 1×10^5 个,利用RNAiMAX试剂进行转染,严格按照试剂盒说明书操作。

2.2 总细胞蛋白的提取 常规消化离心收集细胞,用碧云天RIPA裂解液(强)提取总蛋白。

2.3 胞核蛋白的提取 将Panc-1细胞接种到60 mm细胞培养皿中,分为pHA-SIRT1组和si-SIRT1组,按上述分组转染相应质粒和siRNA至Panc-1细胞,培养48 h后,收集细胞并加入细胞浆蛋白抽提试剂,放置冰上裂解10 min,4 °C、12 000 × g离心10 min后吸弃上清液,加入细胞核蛋白抽提试剂。每隔1~2 min高速剧烈振荡15~30 s,共30 min。4 °C (12 000~16 000) × g离心10 min,上清即为所需胞核蛋白。

2.4 Western blot法检测目的蛋白的表达 半干法电泳转移至PVDF膜,10%脱脂奶粉封闭2 h。依次加入特异性I抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG、羊抗兔IgG,加入ECL化学发光液,于Bio-Rad凝胶成像仪中进行显影。根据曝光结果进行定性分析,以上实验重复3次。

2.5 免疫共沉淀实验 常规收集细胞后裂解细胞,加入1 μg小鼠抗SIRT1单克隆抗体,4 °C旋转混合2 h,加入20 μL蛋白A,继续混合过夜,离心后吸弃上清,裂解液洗涤3次后加入5 μL 5 × Tricine SDS-PAGE上样缓冲液,煮沸5 min,离心后立即电泳。

2.6 细胞免疫荧光检测 (1)将低氧培养的Panc-1细胞用4 °C、含4%多聚甲醛的磷酸缓冲液(phosphate buffer, PB)固定,加入鼠抗SIRT1(1:1 000)抗体4 °C孵育过夜。磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)漂洗后加入羊抗鼠Cy3荧光II抗,室温下避光孵育2 h。漂洗后用荧光封片剂(0.01 mol/L

PBS 和甘油 1 : 1)封片,于激光共聚焦显微镜下观察拍照。(2)通过感染 mRFP-GFP-LC3 (Ad-tf-LC3)腺病毒,并定量 mRFP-GFP-LC3 荧光点,实现对自噬体的检测。定量单个细胞荧光斑的表达;计算 50 个细胞的荧光斑,再计算平均每个转染细胞的荧光斑数量。

3 统计学方法

用 SPSS 23.0 统计学软件进行统计分析,实验结果采用均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示。多组间的均值比较用单因素方差分析法;*SIRT1* 敲减或过表达组与对照组之间的比较采用独立样本 *t* 检验;*SIRT1* 与 FOXO1/RAB7 信号通路关键因子的相关性分析

采用 Pearson 直线相关分析法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 *SIRT1* 在低氧诱导的自噬胰腺癌 Panc-1 核内的表达情况

免疫荧光显示,相比对照组 0 h,*SIRT1* 在低氧诱导的胰腺癌 Panc-1 细胞核内表达明显增加,见图 1A。Western blot 检测显示,*SIRT1* 在 Panc-1 细胞核中随低氧时间增加总体呈现逐渐表达增加的趋势 ($P < 0.05$),见图 1B。

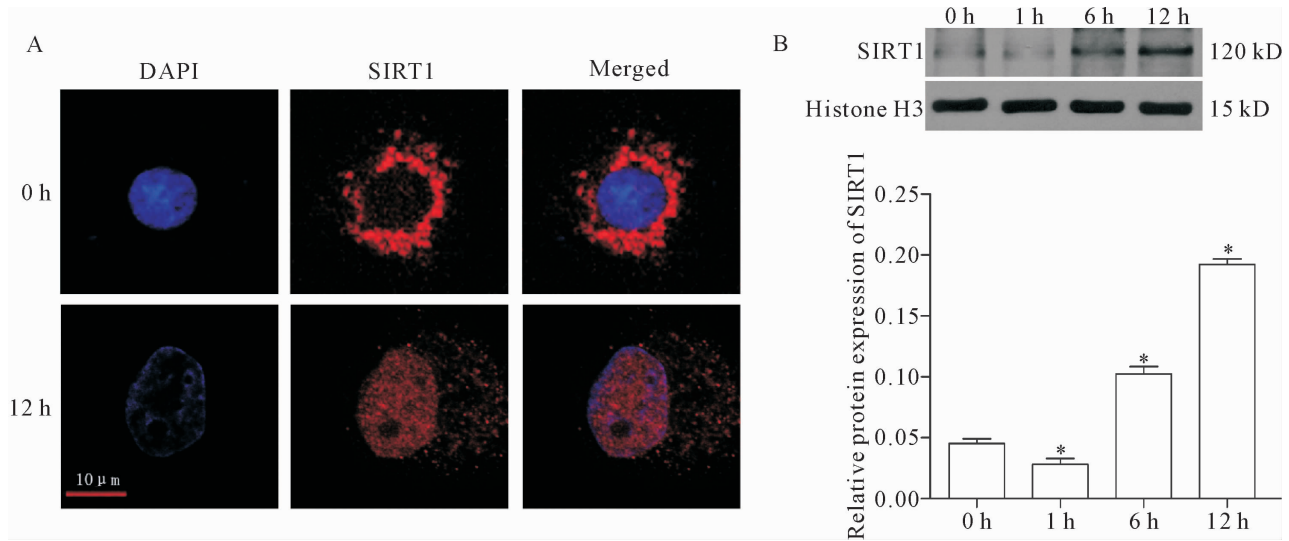


Figure 1. The expression of *SIRT1* in pancreatic cancer cell nucleus induced by hypoxia. A: immunofluorescence staining; B: Western blot. Mean ± SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs 0 h group.

图 1 *SIRT1* 在低氧诱导的胰腺癌细胞核中的表达情况

2 敲减或过表达 *SIRT1* 对低氧诱导的胰腺癌 Panc-1 细胞自噬的影响

Western blot 法检测 *SIRT1* 敲减和过表达效果,见图 2。敲减 *SIRT1* 后胰腺癌 Panc-1 细胞自噬相关蛋白 LC3-II 的表达增多,且 p62 降解受到抑制 ($P < 0.05$);而当 *SIRT1* 过表达时,LC3-II 表达变化的差异无统计学显著性 ($P > 0.05$),但是 p62 的降解受到明显抑制 ($P < 0.05$),见图 3。同时通过荧光显微镜观测双色荧光标记的 LC3 蛋白在低氧诱导的胰腺癌细胞中的表达情况,下调 *SIRT1* 后自噬溶酶体(红色荧光点)数量明显增加 ($P < 0.05$),而自噬小体(黄色荧光点)变化的差异无统计学显著性 ($P > 0.05$),见图 4。

3 敲减或过表达 *SIRT1* 对 FOXO1/RAB7 信号通路的影响

Western blot 检测显示,过表达 *SIRT1* 后,

FOXO1/RAB7 信号通路蛋白的表达水平明显升高 ($P < 0.05$);敲减 *SIRT1* 的表达能够显著降低 FOXO1/RAB7 信号通路蛋白的表达水平 ($P < 0.05$),抑制 FOXO1/RAB7 信号通路,见图 5。

4 生物信息学分析 *SIRT1* 与 FOXO1 的相关性

通过 GEPIA 网站进行 *SIRT1* 与其它蛋白的关联性分析,结果显示 *SIRT1* 与 FOXO1 显著相关 ($P < 0.05$),提示 *SIRT1* 与自噬信号通路可能存在密切关系,见图 6。

5 胰腺癌细胞中 *SIRT1* 与 FOXO1 蛋白存在相互作用

在胰腺癌 Panc-1 细胞中共转染 pHA-SIRT1 和 pFlag-FOXO1 质粒,通过蛋白免疫共沉淀实验检测 *SIRT1* 与 FOXO1 蛋白之间的相互作用情况,结果显示 Panc-1 细胞中 *SIRT1* 与 FOXO1 存在相互作用,见图 7。

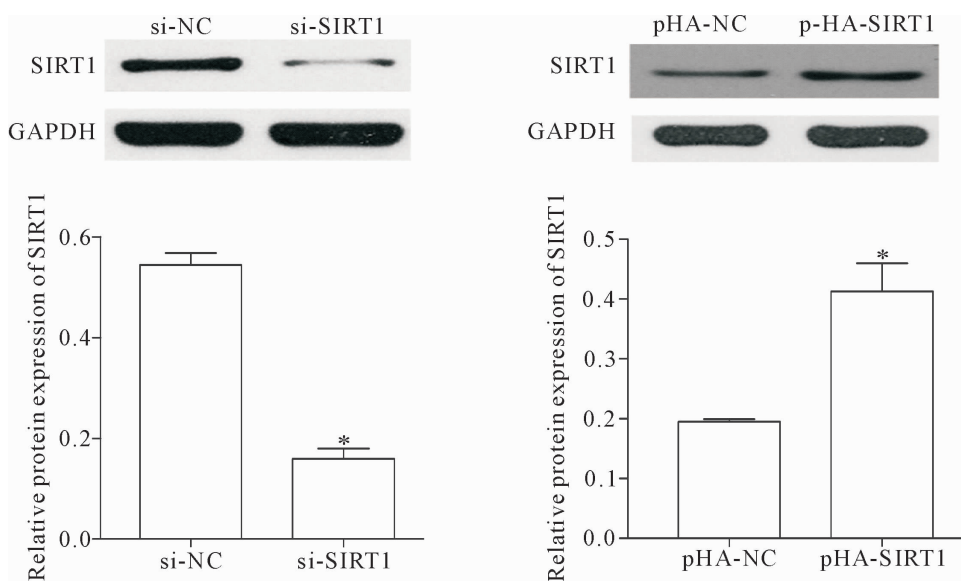


Figure 2. The over-expression and knock-down of *SIRT1* expression at protein levels in the Panc-1 cells were determined by Western blot. Mean \pm SD. $n=3$. * $P<0.05$ vs si-NC group; # $P<0.05$ vs pHA-SIRT1 group.

图2 Western blot 检测胰腺癌 Panc-1 细胞敲减或过表达 *SIRT1* 的效果

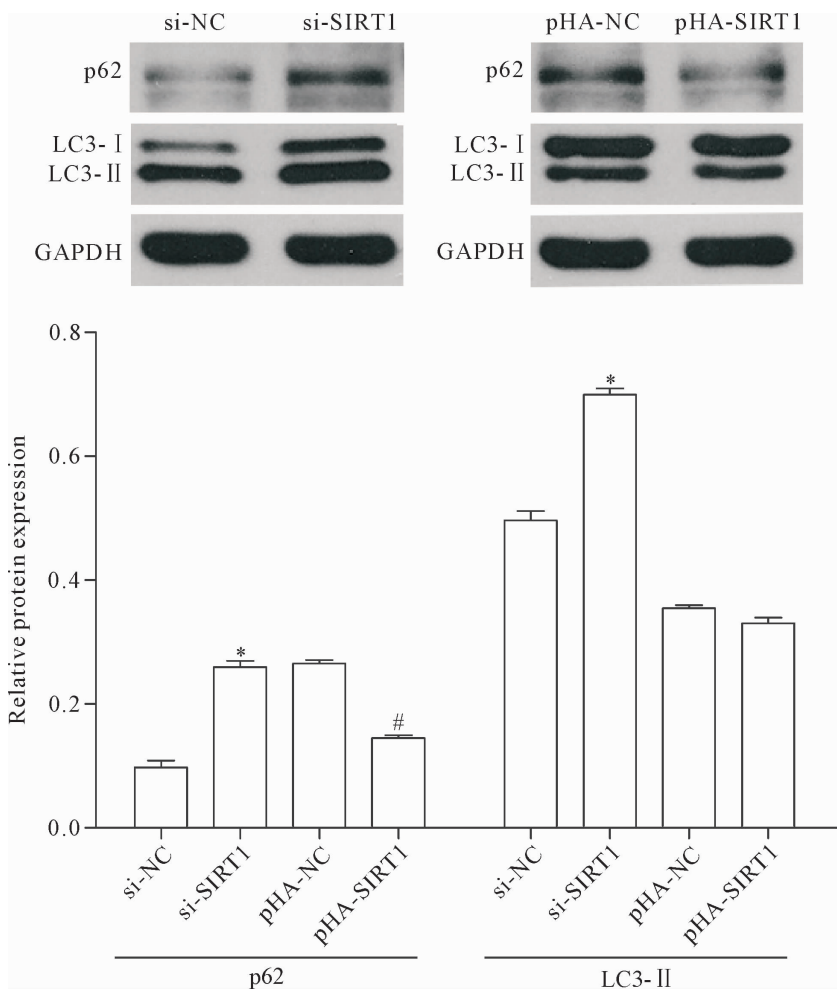


Figure 3. The effects of *SIRT1* over-expression and knock-down on the autophagy in the Panc-1 cells. Mean \pm SD. $n=3$. * $P<0.05$ vs si-NC group; # $P<0.05$ vs pHA-SIRT1 group.

图3 敲减或过表达 *SIRT1* 对于胰腺癌 Panc-1 细胞自噬的影响

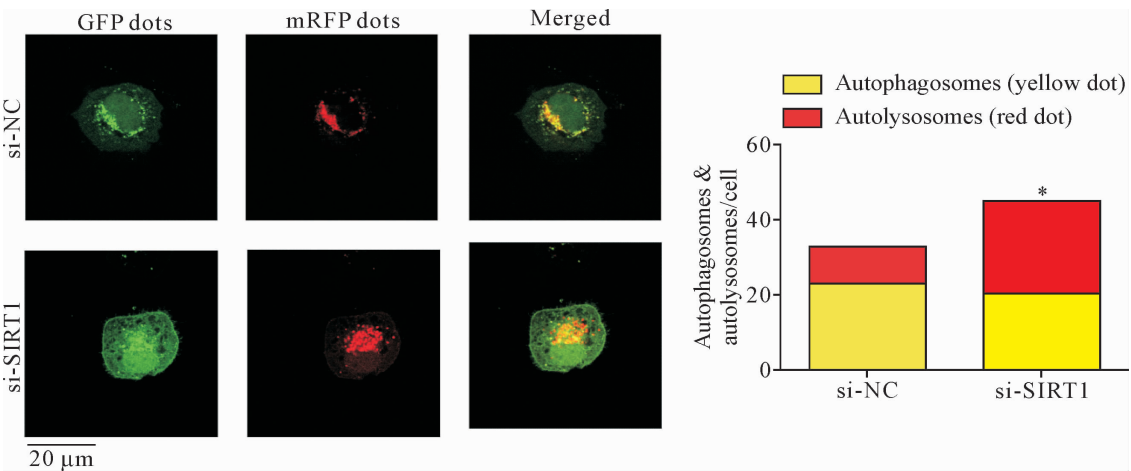


Figure 4. The effect of *SIRT1* expression knock-down on autolysosome production in the Panc-1 cells. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs si-NC group.

图 4 敲减 *SIRT1* 的表达对于自噬溶酶体生成的影响

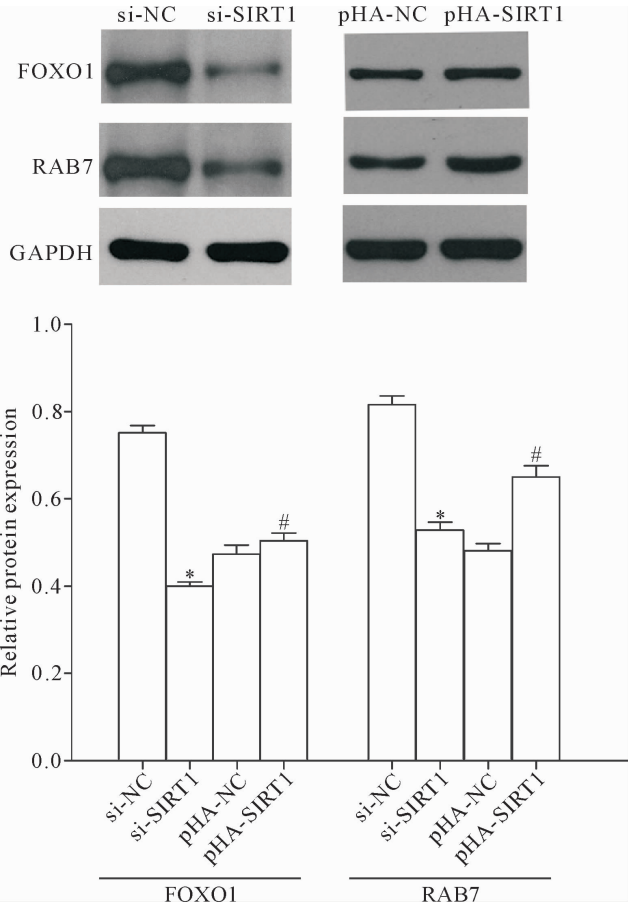


Figure 5. The effects of *SIRT1* expression levels on the protein expression of FOXO1/RAB7 signaling pathway-related molecules. Mean \pm SD. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs si-NC group; # $P < 0.05$ vs pHA-NC group.

图 5 *SIRT1* 表达水平对 FOXO1/RAB7 信号通路相关蛋白表达的影响

讨 论

肿瘤缺氧微环境是人类恶性实体肿瘤的基本特征之一,肿瘤缺氧与其恶性生物学行为密切相关^[5]。

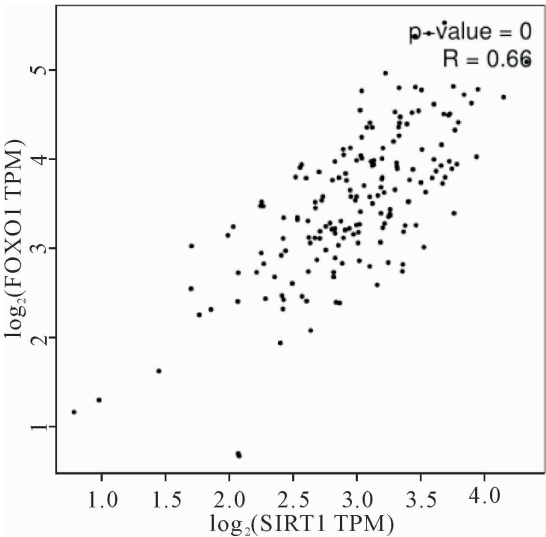


Figure 6. The correlations between *SIRT1* and FOXO1 were analyzed in GEPIA database.

图 6 生物信息学分析 *SIRT1* 与 FOXO1 信号通路关键因子的相关性

人体的大部分组织中,氧浓度在 3 ~ 5% 之间,当氧浓度处于 3% 以下即视为低氧环境^[6]。临床研究中通过¹⁸F-FAZA 辅助 PET 图像证实胰腺癌缺氧分数在 5 ~ 50% 之间^[7],瘤体内呈低氧气张力,表明胰腺癌处于低氧环境,具有缺血缺氧的病理生理特点。缺氧与胰腺癌的发展进程及恶性生物学特性密切相关^[8-9]。*SIRT1* 是 Sir2 家族中的成员之一。*SIRT1* 作为一种重要的能量调控蛋白,连接着细胞代谢和核染色质;作为 NAD⁺ 依赖型去乙酰化酶,通过调控组蛋白、转录因子和转录辅助因子,从而参与到细胞衰老、凋亡、DNA 损伤修复和自噬等生理活动中^[10]。叉头框蛋白转录因子家族中 O 亚家族中的 FOXO1 在人体心脏细胞、脂肪细胞、肝脏细胞和脑神经中有

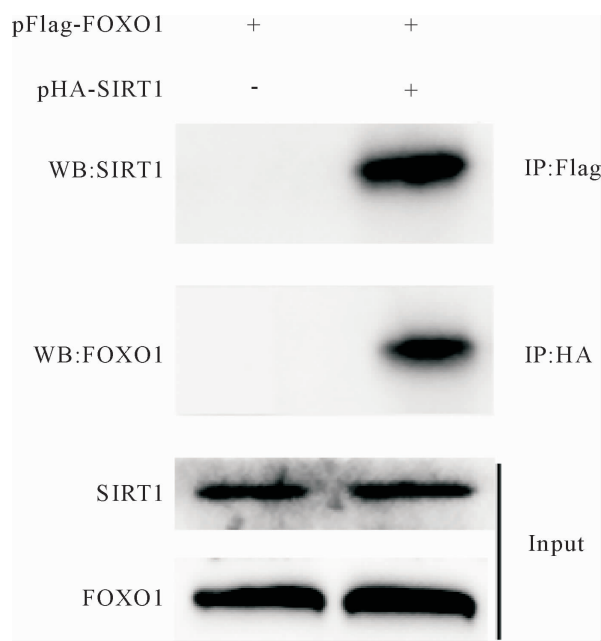


Figure 7. SIRT1 interacted with FOXO1 at the protein level in the Panc-1 cells determined by co-immunoprecipitation.

图7 胰腺癌细胞中 SIRT1 与 FOXO1 蛋白存在相互作用

着大量的表达。研究表明,SIRT1-FOXO 家族信号通路对衰老、肥胖、肿瘤及血管应激损伤有着重要的影响^[11]。SIRT1 对肿瘤细胞的调控具有双重意义,特别是 SIRT1 通过多个信号通路影响肿瘤细胞的侵袭、转移和生存^[12]。

细胞在氧化应激状态时,FOXO1 被激活,FOXO1 与 Atg7 和 E1 蛋白结合,进而影响肿瘤细胞的自噬^[13]。此外,非折叠蛋白反应(unfolded protein response,UPR)转录因子 XBP-1u 可促进 FOXO1 的降解。但 Ying 等^[14]的研究表明,FOXO1 的降解受到抑制可过度激活自噬,降低肿瘤细胞活性。

我们通过共聚焦荧光显微镜及 Western blot 实验发现 SIRT1 随着胰腺癌细胞自噬的进程,逐渐在细胞核内表达增加。当通过转染手段抑制细胞内 SIRT1 的表达时,Panc-1 细胞出现自噬受到抑制的表现。并且从 LC3 双色荧光标记蛋白的结果可以发现,SIRT1 通过 FOXO1/RAB7 信号通路,调控胞内自噬小体及溶酶体的结合,使得自噬溶酶体大量在胞内堆积,降解困难。同时通过生物信息学及免疫共沉淀证实 SIRT1 通过结合 FOXO1,并调控 FOXO1 的去乙酰化程度进而调节胰腺癌细胞自噬。

综上所述,低氧环境能够引起 SIRT1 的入核,通过 FOXO1/RAB7 调控胰腺肿瘤细胞自噬。通过下调 SIRT1 的表达可以在低氧条件下抑制胰腺肿瘤细胞的自噬,其机制可能与调节 FOXO1 的乙酰化/去

乙酰化有关,但此信号通路具体作用机制还不甚清楚,需要进一步的研究,并且该基因可能是除常规治疗方法外的新的基因靶点。

[参 考 文 献]

[1] International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Global Cancer Observatory 2018; [DB/OL]. (2018-09-13) [2019-01-10]. <https://gco.iarc.fr/>.

[2] Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(44): 9694-9705.

[3] Teague A, Lim KH, Wang-Gillam A. Advanced pancreatic adenocarcinoma: a review of current treatment strategies and developing therapies [J]. Ther Adv Med Oncol, 2015, 7(2): 68-84.

[4] Ellenrieder V, König A, Seufferlein T. Current standard and future perspectives in first- and second-line treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma [J]. Digestion, 2016, 94(1): 44-49.

[5] Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease [J]. N Engl J Med, 2011, 365(6): 537-547.

[6] Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine [J]. Cell, 2012, 148(3): 399-408.

[7] Metran-Nascente C, Yeung I, Vines D, et al. Measurement of tumor hypoxia in patients with advanced pancreatic cancer based on ¹⁸F-fluorazomycin arabinoside uptake [J]. J Nucl Med, 2016, 57(3): 361-366.

[8] Erickson LA, Highsmith WE Jr, Fei P, et al. Targeting the hypoxia pathway to treat pancreatic cancer [J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 2029-2031.

[9] Schonenberger MJ, Kovacs WJ. Hypoxia signaling pathways: modulators of oxygen-related organelles [J]. Front Cell Dev Biol, 2015, 3: 42.

[10] Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function [J]. Biochem J, 2007, 404(1): 1-13.

[11] Ferdous A, Battiprolu PK, Ni YG, et al. FoxO, autophagy, and cardiac remodeling [J]. J Cardiovasc Transl Res, 2010, 3(4): 355-364.

[12] Frazzi R. SIRT1 in secretory organ cancer [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2018; 9: 59.

[13] Zhao Y, Yang J, Liao W, et al. Cytosolic FoxO1 is essential for the induction of autophagy and tumour suppressor activity [J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(7): 665-675.

[14] Ying Z, Xue L, Cai MY, et al. XBP-1u suppresses autophagy by promoting the degradation of FoxO1 in cancer cells [J]. Cell Res, 2013, 23(4): 491-507.

(责任编辑: 宋廷君, 罗 森)