

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.05.001

· 基础研究 ·

SIRT3 过表达通过调控细胞代谢转换抑制肾肿瘤细胞的增殖 *

刘欢¹ 陈宇凌¹ 徐仁华² 许嘉桐¹ 邓海腾^{1△}

(1 清华大学生命科学学院 教育部生物信息学重点实验室 北京 100084; 2 滨州医学院护理学院 山东 烟台 264003)

摘要 目的: 研究 SIRT3 对肾透明细胞癌 (clear cell renal cell carcinoma, ccRCC) 769-P 细胞增殖和抗氧化能力的影响, 并进一步探究其作用机制。**方法:** 在 769-P 细胞的基础上构建 SIRT3 过表达稳转细胞系; 利用 CCK-8 试剂检测 769-P SIRT3 过表达细胞的增殖速度; 利用 CellROX® Deep Red 染料并结合流式细胞分析检测 SIRT3 过表达对 769-P 细胞中 ROS 水平的影响; 利用定量蛋白质组学和代谢组学的方法, 探究 SIRT3 对 769-P 细胞的作用机制。**结果:** CCK-8 实验结果表明, 769-P SIRT3 过表达细胞的生长速度与对照细胞相比下降了约 48%; 定量蛋白质组学分析显示, 769-P SIRT3 过表达细胞中 ALDOA、ALDOA、ENO2、PKM、LDHA、LDHB 表达量下调约 0.4 至 0.7 倍, SDHB 和 CS 上调约 1.3 倍; 代谢组学分析显示, PEP、pyruvic acid、lactate、carnitine 水平下降约 0.4 至 0.7 倍, isocitric acid 和 acetyl-CoA 水平升高分别约 1.3 和 2.8 倍; 分析还显示 SIRT3 过表达上调 SOD2、TXN、GPX4 和 GLRX5 的表达量约 1.3 至 2 倍, 降低 ROS 水平约 40%, 增强细胞对过氧化氢的耐受力。**结论:** SIRT3 过表达引起 769-P 细胞的代谢转换, 从而抑制其增殖; 且上调 769-P 细胞中抗氧化酶的表达, 降低 ROS 水平, 增强细胞的抗氧化能力。

关键词: SIRT3; 肾透明细胞癌; 定量蛋白质组学; 代谢组学

中图分类号: R-33; R737.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2019)05-801-06

SIRT3 Overexpression Inhibits Growth of Kidney Tumor Cells via Regulating Cellular Metabolic Transformation*

LIU Huan¹, CHEN Yu-ling¹, XU Ren-hua², XU Jia-tong¹, DENG Hai-teng^{1△}

(1 School of Life Sciences, Tsinghua University, MOE Key Laboratory of Bioinformatics, Center for Synthetic and Systematic Biology, Beijing, 100084, China; 2 School of Nursing, Binzhou Medical University, Yantai, Shandong, 264003, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of SIRT3 on the proliferation and oxidation resistance of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) 769-P cells, and to explore its mechanism. **Methods:** We established SIRT3 overexpressing stable cell line in 769-P cells. The CCK-8 assay was used to measure the proliferation rate of 769-P SIRT3 OE, while flow cytometry was used to determine the level of cellular reactive oxygen species in 769-P SIRT3 OE cells. To explore the mechanism of SIRT3 on 769-P cells by quantitative proteomics and metabolomics. **Results:** CCK-8 assay showed that SIRT3 overexpression decreased cell proliferation rate. Quantitative proteomics found that SIRT3 overexpression decreased the expression of ALDOA, ALDOA, ENO2, PKM, LDHA, LDHB, which increased the expression of SDHB and CS. Metabolomics found that SIRT3 overexpression decreased the level of PEP, pyruvic acid, lactate, carnitine, which increased the level of isocitric acid and acetyl-CoA. Furthermore, SIRT3 overexpression also increased the expression of SOD2, TXN, GPX4 and GLRX5, which decreased the level of cellular reactive oxygen species and enhanced resistance to oxidative stress. **Conclusion:** SIRT3 Overexpression inhibits growth of kidney tumor cells via regulating cellular metabolic transformation, while SIRT3 overexpression decreased the level of ROS and enhanced resistance to oxidative stress.

Key words: SIRT3; Clear cell renal cell carcinoma; Quantitative proteomics; Metabolomics

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R737.11 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)05-801-06

前言

SIRT3 是去乙酰化酶 sirtuins 家族中的一员, 主要定位于线粒体; 它通过对蛋白的去乙酰化, 调控线粒体中的代谢过程,

包括氧化呼吸链、ATP 合成和三羧酸循环等^[1-5]。研究还表明 SIRT3 通过对超氧化物歧化酶 SOD2 去乙酰化, 激活其活性, 从而调节氧化应激过程^[6]。SIRT3 在不同的癌症中可以发挥抑癌或促癌的作用。在口腔癌和膀胱癌的肿瘤组织中, SIRT3 的

* 基金项目: 国家重点研究与发展计划项目(2017YFA0505103, H.T.D); 山东省医药卫生科技发展计划项目(2016WS0013, R.H.X)

作者简介: 刘欢(1990-), 硕士研究生, 主要研究方向: 蛋白质组学, E-mail: h-liu15@mails.tsinghua.edu.cn

△ 通讯作者: 邓海腾, 电话: 010-62789415, E-mail: dht@mail.tsinghua.edu.cn

(收稿日期: 2018-07-08 接受日期: 2018-07-30)

表达显著高于其在正常组织中的表达,降低 SIRT3 的表达可抑制癌细胞的增殖和迁移^[67]。与之相反,在肺癌和胃癌等癌症中,SIRT3 在肿瘤组织中的表达低于其在正常组织中的表达。在胃癌中,敲低 SIRT3 使 HIF1 α 的表达上调;HIF1 α 是促进肿瘤发生发展的关键转录因子,其稳定性受线粒体 ROS 的调控,有报道表明,在小鼠模型中敲除 SIRT3 显著促进了 ROS 依赖型肿瘤的发生,因此 SIRT3 可能通过调节细胞中 ROS 的水平调控 HIF1 α 的稳定性,从而发挥抑癌因子的作用^[89]。

肾癌是最致命的泌尿系统癌症,其发病率高居世界肿瘤发病率第九位^[90]。肾透明细胞癌(clear cell renal cell carcinoma, ccRCC)是肾癌的主要类型,它的特征主要表现为具有典型的 Warburg 效应、线粒体功能紊乱和脂肪酸积累^[91]。我们的前期研究发现,在 ccRCC 病人的肿瘤组织中,SIRT3 的表达显著低于其在癌旁组织中的表达^[92]。为了深入理解 SIRT3 在 ccRCC 发生发展中的作用机制,我们在其细胞系 769-P 中过表达 SIRT3;利用定量蛋白质组学和代谢组学,我们系统分析了 SIRT3 过表达对 769-P 细胞的蛋白质组和代谢通路的影响,阐明了 SIRT3 在肾透明细胞癌发生发展中的功能。

1 材料与方法

1.1 试剂

RPMI 1640 培养基,DMEM 培养基,PBS 缓冲液,胎牛血清,双抗,胰酶购自维森特公司(Wisent,加拿大)。二硫苏糖醇(DTT)、碘代乙酰胺(IAA)购自 Sigma 公司(美国)。TMT 试剂,色谱级甲醇和乙腈购自 Thermo 公司(美国)。质谱级胰蛋白酶购自 Promega 公司(美国)。CCK-8 试剂盒购自 Dojindo 公司(日本)。BCA 试剂盒、蛋白酶抑制剂和 RIPA 裂解液购买自北京索莱宝科技有限公司。CellROX[®] Deep Red 试剂购自 Invitrogen 公司(美国)。

1.2 细胞培养

人肾上皮细胞系 293T 和人肾透明细胞癌细胞系 769-P 均购自于中国科学院上海细胞库。用含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 培养基培养 293T 细胞系,含 10% FBS 和 1% 双抗的 RPMI 1640 培养基培养 769-P 细胞系,细胞培养箱的条件设置为 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂。

1.3 SIRT3 过表达细胞系构建

SIRT3 的 cDNA 由 293T 中提取的 RNA 逆转录而来,C 端连接 FLAG 标签,将 SIRT3-FLAG 插入 pLVX-IRES-ZsGreen1 后产生 pLVX-SIRT3-IRES-ZsGreen1 质粒。之后将 pLVX-SIRT3-IRES-ZsGreen1、pLVX-IRES-ZsGreen1 及其相应的辅助质粒转染进 293T 中,60 h 后收集细胞培养基并用 50% PEG6000 浓缩病毒。用病毒感染 769-P 野生型细胞,使用流式分选细胞仪筛选出单克隆细胞并进行后续培养,过表达 SIRT3 的 769-P 细胞命名为 769-P SIRT3 OE,转染 pLVX-IRES-ZsGreen1 的 769-P 细胞命名为 769-P PLVX。通过 Western blotting 和 qPCR 对稳转细胞系中 SIRT3 的表达情况进行蛋白水平和 mRNA 水平的验证。

1.4 Western blotting 和 qPCR 分析

向细胞中加入含有蛋白酶抑制剂 cocktail 的 RIPA 裂解液,于冰上静置 30 min,使用超声破碎仪打断核酸,然后于 4 $^{\circ}$ C,

14000 \times g 条件下离心 20 min 后取上清,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测量其蛋白浓度。分别取等量的 769-P SIRT3 OE 和 769-P PLVX 蛋白,加入上样缓冲液,于 100 $^{\circ}$ C 煮 5 min,使用 12%的 SDS-PAGE 胶分离蛋白。利用半干转的方法将胶上的蛋白转到 PVDF 膜上,使用 5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,一抗室温孵育 1 h,二抗室温孵育 1 h,PVDF 膜与 ECL 反应液反应后,在 Bio-rad 凝胶成像仪成像。 β -actin 作为内参。

对于 qPCR 实验,首先利用 Trizol 法提取 RNA,利用反转录法合成 cDNA,并以 cDNA 为模板,用 SYBR 荧光定量 PCR 试剂盒检测基因的 mRNA 相对表达水平。 β -actin 作为内参基因。

1.5 测定细胞的生长曲线

将细胞用胰酶消化后计数,调整细胞浓度,将等量的细胞分别接种于 96 孔板中,保证每个孔的细胞量为 2000 个。分别在细胞培养至 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、84 h、96 h、108 h 时,加入 CCK-8,于细胞培养箱中孵育 2 h,使用酶标仪测定细胞在 450 nm 处的吸光度,以此反应细胞数目,从而绘制细胞的生长曲线。

1.6 测定细胞的 ROS 水平

将等量的细胞铺在 6 孔板中,约 24 h 后将细胞消化至 EP 管中,用 5 μ M 的 CellROX[®] Deep Red 染料与细胞在 37 $^{\circ}$ C 避光反应 30 min,离心后用 PBS 洗三遍,用 300 μ L PBS 将细胞重悬后,利用 BD FACSAria II 流式细胞仪检测细胞的 ROS 水平。

1.7 检测细胞的抗氧化能力

用 400 μ M 和 500 μ M 的过氧化氢刺激细胞,24 h 后,用 CCK-8 试剂检测细胞数量,计算细胞存活率。

1.8 定量蛋白质组学分析

将消化下来的细胞用冷 PBS 洗两遍,用裂解液(8 M 尿素,1 mM 蛋白酶抑制剂 cocktail,PBS)裂解,离心后取上清,用 BCA 法测定蛋白浓度。随后,取等量 769-P SIRT3 OE 和 769-P PLVX 蛋白,经过 DTT 还原二硫键,IAA 对半胱氨酸上的巯基进行烷基化修饰后,以蛋白:蛋白酶=100:1(质量比)的比例加入适量的胰蛋白酶,于 37 $^{\circ}$ C 消化 12-16 h 后,2000 \times g,离心 10 min,取上清调节 pH 至 2 以下,使用 Sep-Pak C18 除盐。将除盐后的肽段在真空浓缩挥发仪中挥干,用 100 mM TEAB 复溶后,使用 TMT 试剂进行肽段标记,将标记了不同 TMT 的肽段混合在一起后,除盐挥干至约 100 μ L。肽段使用 UPLC 2000 进行肽段组分分离,柱子使用 Waters 的 xbridge BEH3000,用流动相 A(100% H₂O,pH 10)和流动相 B(98% ACN,2% H₂O,pH 10)进行梯度洗脱,按时间进行组分收集,最终将组分合并为 12 个,进行 LC-MS/MS 分析。本实验进行三次独立生物学重复。

1.9 代谢组学分析

将细胞用冷 PBS 洗两遍,加入 80%的甲醇,置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中固定 1 h,用细胞刮将细胞刮下,4 $^{\circ}$ C、14000 \times g 离心 20 min 后取上清,将上清在真空浓缩冻干仪中冻干,沉淀使用 8 M 尿素的 PBS 进行复溶,用 BCA 测定沉淀复溶后的浓度,以此将代谢产物的量调成一致。复溶后的代谢产物使用 TSQ Quantiva[™] Triple Quadrupole Mass Spectrometer 进行检测,利用 Trace Finder 提取质谱峰并进行代谢产物的定量。本实验进行三次独立生物学重复。

1.10 统计学分析

结果通过三次平行重复的来显示, 并采用 student's t 方法计算 P 值, ***: P<0.001; **: P<0.01; *: P<0.05。

2 结果

2.1 SIRT3 过表达降低细胞的增殖速度

Western blotting 验证结果表明, 相较于对照细胞, 769-P

SIRT3 OE 细胞中 SIRT3 的蛋白水平明显升高 (图 1A); qPCR 结果证实 在 769-P SIRT3 OE 中 SIRT3 的 mRNA 水平约为对照细胞系的 15 倍 (图 1B)。我们利用 CCK-8 试剂检测细胞数目, 并绘制了细胞的生长曲线 (图 1C)。如图所示, 与 769-P PLVX 相比, 769-P SIRT3 OE 的生长速度明显降低。在 108 h, 769-P SIRT3 OE 的细胞数目约为 769-P PLVX 细胞数目的 48%。

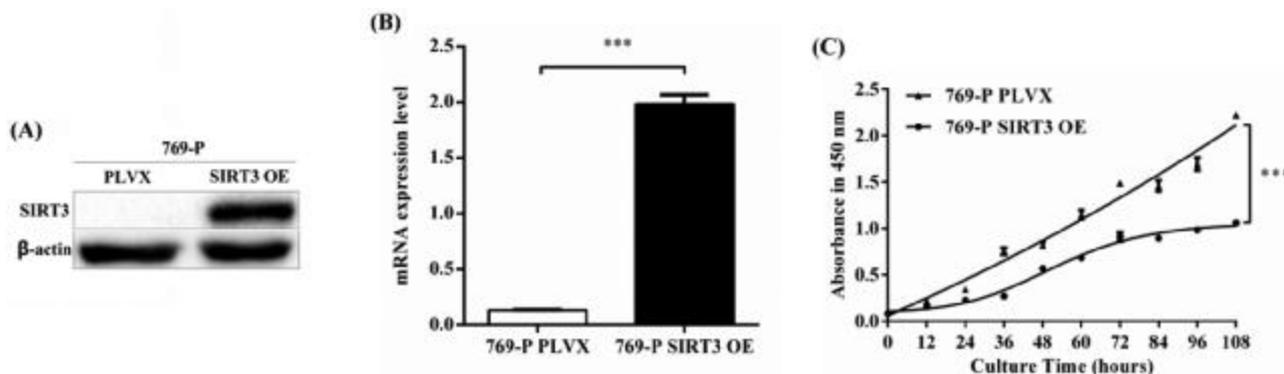


图 1 SIRT3 过表达抑制 769-P 细胞的增殖

Fig.1 SIRT3 overexpression decreased the proliferation rate of 769-P cell

(A) Western blotting was used to validate the overexpression of SIRT3 in 769-P SIRT3 OE cells compared to 769-P PLVX cells. (B) The mRNA level of SIRT3 in 769-P SIRT3 OE cells was higher than that in 769-P PLVX cells, determined by qPCR. β -ACTIN was used as internal control. (C) The growth rate in SIRT3 overexpression cells was lower than that in the control cells, measured by CCK-8 assay. ***P<0.001; n=3.

2.2 蛋白质组学分析揭示 SIRT3 过表达调控肾癌细胞的代谢转换

为了阐明 SIRT3 在 ccRCC 细胞中的功能, 我们利用定量蛋白质组学技术, 系统性地比较了 SIRT3 过表达细胞系和对照细胞系在蛋白质组水平上的差异。经过三次独立生物学重复实验, 我们共鉴定到 6839 个蛋白。对三次实验进行统计学分析, 将分数小于 5 的蛋白去除后, 上调蛋白 (比值 >1.3, P<0.05) 为 363 个, 下调蛋白 (比值 <0.75, P<0.05) 为 366 个。为了更好地分析 SIRT3 过表达细胞系和对照细胞系蛋白质组间的差异, 我们

通过 GO Term Finder Mapper (<http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermMapper>), 对差异蛋白相关的生物学通路、蛋白功能和蛋白定位进行了分类 (图 3)。其中, 变化最多的是与细胞代谢过程相关的蛋白, 上调蛋白中 66% 的蛋白与细胞代谢相关, 下调蛋白中 63% 与细胞代谢相关。在生物学通路方面, 上下调蛋白主要参与代谢过程; 在蛋白功能方面, 变化的蛋白主要在蛋白结合和催化活性上富集程度较高; 在细胞成分分类方面, 定位于细胞内、核内和染色体上的蛋白明显上调, 而下调的蛋白多定位于细胞膜、细胞外区域和细胞表面。

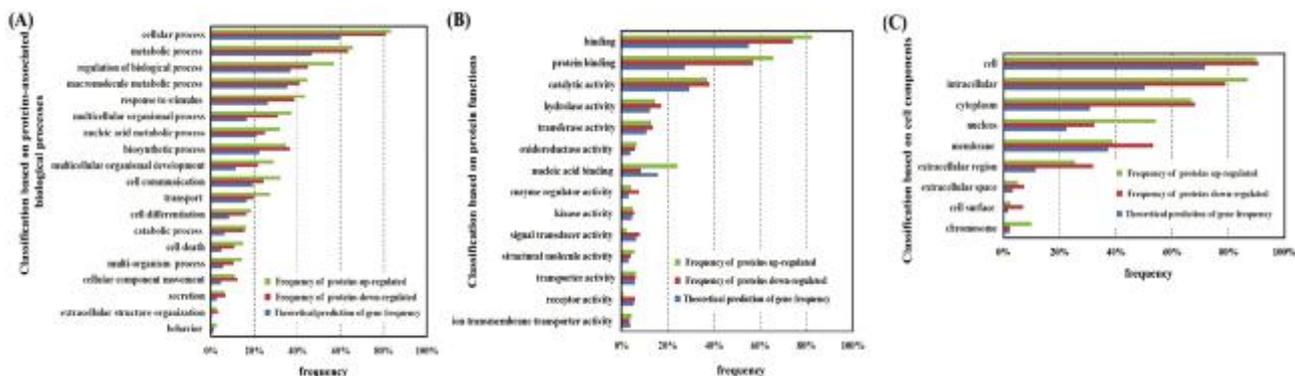


图 2 769-P SIRT3 OE 和 769-P PLVX 细胞中差异表达蛋白的 GO 分析

Fig.2 Go analysis of differentially expressed protein between 769-P SIRT3 OE and 769-P PLVX

(A) The differentially expressed proteins between 769-P SIRT3 OE cells and control cells were classified based on biological processes. (B) The differentially expressed proteins between 769-P SIRT3 OE cells and control cells were classified based on protein functions. (C) The differentially expressed proteins between 769-P SIRT3 OE cells and control cells were classified based on protein localization.

2.3 SIRT3 过表达抑制了肾癌细胞的糖酵解通路并加强了三羧酸循环

更深入的蛋白质组学发现 SIRT3 过表达引起糖酵解相关的酶, 果糖二磷酸醛缩酶 A (fructose-bisphosphate aldolase A,

ALDOA)、果糖二磷酸醛缩酶 C (fructose-bisphosphate aldolase C, ALDOC)、烯醇化酶 2(enolase 2, ENO2)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PKM) 以及催化丙酮酸生成乳酸的 L- 乳酸脱氢酶 A (L-lactate dehydrogenase A, LDHA) 和 L- 乳酸脱氢酶 B (L-lactate dehydrogenase B, LDHB) 均显著地下调约 0.4 至 0.7 倍;而三羧酸循环过程中的琥珀酸脱氢酶 B(succinate dehydrogenase B, SDHB)和柠檬酸合酶(citrate synthetase, CS)表达量则上调约 1.3 倍(图 3A)。这些结果证明 SIRT3 的高表达引起细胞的代谢转换。

为了进一步证实 SIRT3 过表达引起了细胞代谢通路的改

变,我们对 SIRT3 过表达细胞系和对照细胞系的代谢产物进行了定量分析,发现 SIRT3 过表达细胞系中糖酵解过程中重要的中间产物磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和丙酮酸约为对照细胞系的 0.4 倍;乳酸在 769-P SIRT3 OE 中的含量约为对照细胞中的 0.6 倍;而三羧酸循环中的异柠檬酸和乙酰辅酶 A 含量分别为对照细胞系中的 1.3 倍和 2.8 倍,肉毒碱的含量约为对照细胞系的 0.7 倍(图 3B-G)。代谢组学的结果和蛋白质组学具有高度的一致性,证明 SIRT3 高表达逆转了 Warburg 效应,同时加强了线粒体的功能。

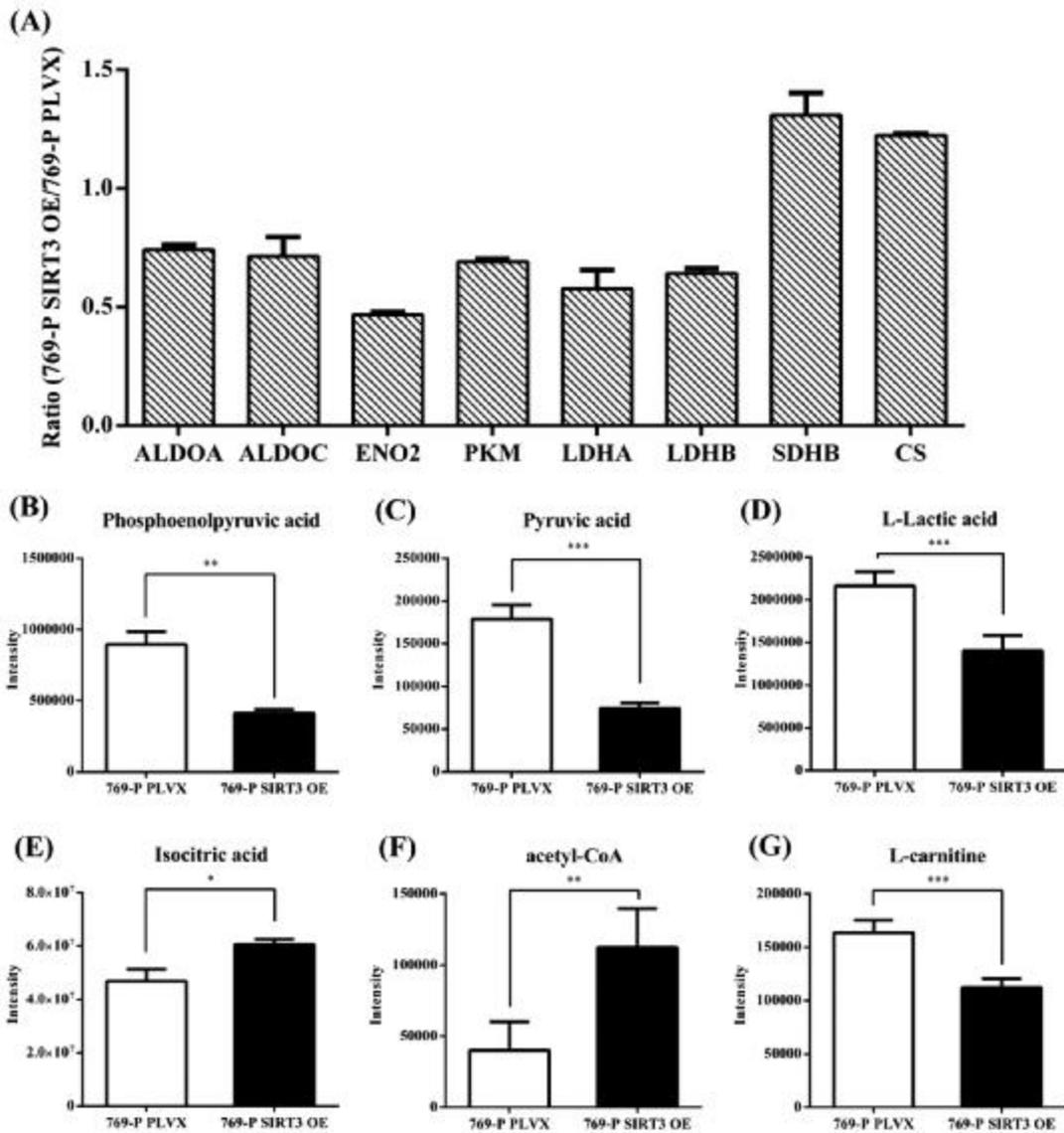


图 3 SIRT3 过表达促使 769-P 细胞代谢转换

Fig.3 SIRT3 overexpression promoted the metabolic transformation in 769-P

(A) The protein expressions of ALDOA, ALDOC, ENO 2, PKM, LDHA and LDHB were reduced in SIRT3 overexpression cells as compared to the control cells, while the expressions of SDHB and CS were increased, as determined by quantitative proteomics. (B)-(G) The levels of phosphoenolpyruvic acid (PEP), pyruvic acid, L-lactic acid, isocitric acid, acetyl-CoA, L-carnitine were measured by metabolomic analysis, in which the levels of PEP, pyruvic acid, lactate and carnitine were reduced, while the levels of isocitric acid and acetyl-CoA were increased. ***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05; n=3.

2.4 SIRT3 过表达降低 ROS 水平并增强细胞的抗氧化能力

我们在蛋白质组学结果中发现 SIRT3 过表达显著上调细胞中的抗氧化蛋白:超氧化物歧化酶 2 (superoxide dismutase 2,

SOD2)、硫氧还蛋白(thioredoxin, TXN)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)及谷氧还蛋白 5 (glutaredoxin 5, GLRX5)(图 4B)。为了验证这些酶的高表达可以降低细胞内

的 ROS 水平,我们采用 CellROX® Deep Red 染色,结合流式细胞分析的方法(图 4A),检测了细胞中 ROS 水平。实验结果显示,SIRT3 过表达显著降低细胞中的 ROS 水平(图 4C)。为了检测 SIRT3 过表达对细胞抗氧化能力的影响,我们分别用 400 μM 和 500 μM 的过氧化氢对 769-P PLVX 和 769-P SIRT3 OE

细胞进行处理,并应用 CCK-8 试剂检测过氧化氢刺激 24 h 后细胞的数目,从而计算出细胞的存活率(图 4D)。我们发现过氧化氢处理后,SIRT3 过表达细胞的存活率明显高于对照细胞。由此可见,SIRT3 过表达显著增强了细胞的抗氧化能力。

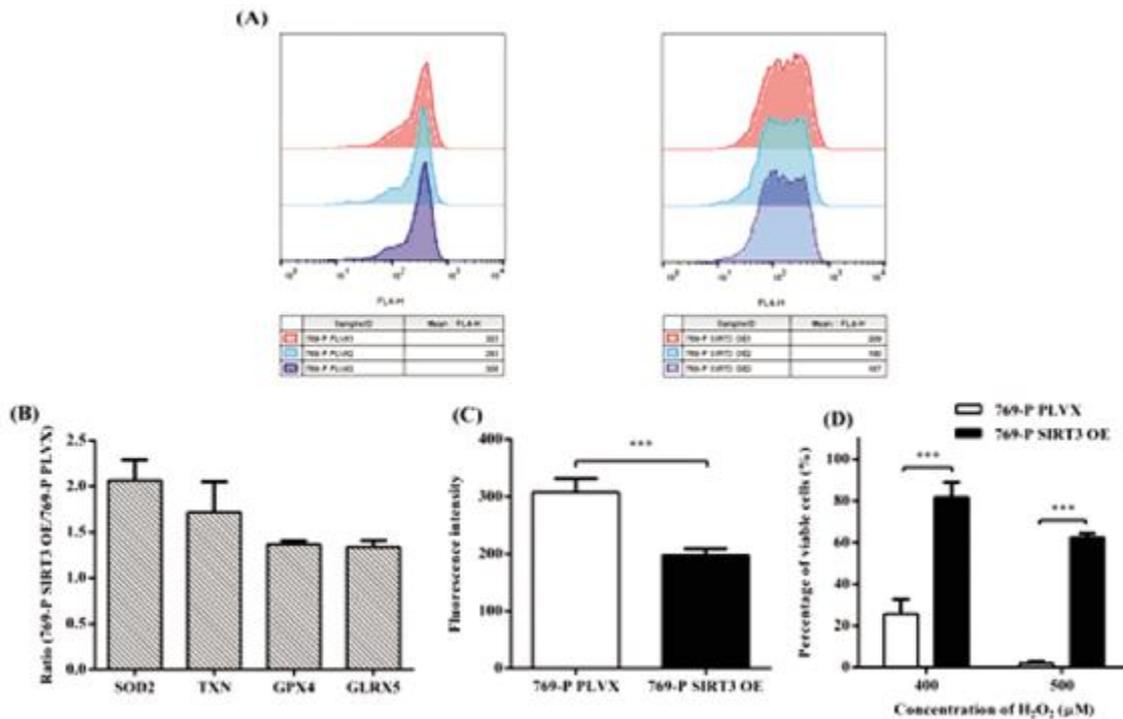


图 4 SIRT3 过表达降低细胞的 ROS 水平并增强细胞的抗氧化能力

Fig.4 SIRT3 overexpression decreased the level of ROS and enhanced the resistance of cells to oxidative stress

(A)The level of ROS in 769-P PLVX and 769-P SIRT3 OE measured by flow cytometry. (B) The expressions of antioxidant enzymes including SOD2, TXN, GPX4 and GLRX5 were higher in SIRT3 overexpression cells than those in the control cells. (C) The ROS level in 769-P SIRT3 OE cells was lower than that in 769-P PLVX cells, measured by CellROX® Deep Red reagent. (D) The percentage of viable cells was determined after hydrogen peroxide treatment at concentrations of 400 μM and 500 μM for 24 h, showing that SIRT3 overexpression enhanced the resistance of cells to oxidative stress.

*** $P < 0.001$; $n = 3$.

3 讨论

肾透明细胞癌(ccRCC)的主要特征表现为线粒体紊乱,SIRT3 是线粒体中主要的去乙酰化酶,它在 ccRCC 肿瘤组织中的表达量显著低于其在癌旁组织中的表达量^[12]。此外,通过对 2004 到 2010 年的 102 例肾脏肿块手术的包埋标本进行免疫组化染色的比较,发现癌组织中的 SIRT1、SIRT3 和 SIRT6 的表达量显著低于癌旁组织中的量,且 SIRT3 表达量高的病人存活率更高^[13]。由此推测,SIRT3 可能在 ccRCC 的发展过程中起到了抑癌作用,这与 SIRT3 在胃癌和肺癌中的功能相一致^[8,9]。目前,对于 SIRT3 如何在 ccRCC 中发挥作用尚不清楚,于是我们构建了 769-P SIRT3 过表达细胞系来探究 SIRT3 在 ccRCC 发生发展过程中的作用机制,我们发现 SIRT3 过表达抑制了 769-P 细胞的生长,这与以往报道及我们的推测相一致。前人研究表明,在 ccRCC 中,糖酵解途径、乳酸发酵、脂质合成途径上调,而三羧酸循环产生能量的途径下调,肉毒碱积累^[14]。在本文中,我们通过对 769-P SIRT3 OE 和 769-P PLVX 细胞系进行定量蛋白质组学和代谢组学分析,发现糖酵解途径

中的酶 ALDOA、ALDOC、ENO2、PKM 下调,催化丙酮酸生成乳酸的酶 LDHA 和 LDHB 显著下调;而三羧酸循环过程中的 SDHB 和 CS 表达量显著增加。这个发现与前人研究中的 ccRCC 通路是相反的,于是我们推测 SIRT3 过表达扭转了 ccRCC 中的糖酵解途径和三羧酸循环过程。与此推测相一致的代谢结果也表明,SIRT3 过表达降低了磷酸烯醇式丙酮酸和丙酮酸的含量。丙酮酸是糖酵解途径的最终产物,在细胞质中还原成乳酸供能,或进入线粒体氧化生成乙酰辅酶 A,进入三羧酸循环,被氧化成二氧化碳和水^[15]。另外,SIRT3 过表达导致乳酸水平显著降低,乙酰辅酶 A 和异柠檬酸的水平明显升高,推测 SIRT3 过表达引起细胞中丙酮酸生成乳酸的途径下调,生成乙酰辅酶 A 途径上调,三羧酸循环增强。有研究表明,脂肪酸代谢受 β 氧化和脂肪酸合成途径所调控,当脂肪酸用于三羧酸循环时,脂肪酸先转化为脂肪酰基辅酶 A,然后转化为脂肪酰基肉碱,通过肉碱棕榈酰转移酶将其转移至线粒体中。在线粒体中,脂肪酰基肉碱被转化为脂肪酰基辅酶 A,经过 β 氧化后转化为乙酰辅酶 A^[16]。在本文的代谢结果中显示,SIRT3 过表达后,769-P 中的肉毒碱水平降低,乙酰辅酶 A 的水平升高,结合前

人关于 ccRCC 中肉毒碱累积的现象说明, SIRT3 过表达扭转了 ccRCC 中的正常代谢情况。糖酵解和戊糖途径使肿瘤细胞通过加速脂质、核苷酸和氨基酸的产生来适应营养缺乏^[17]。因此我们推测, SIRT3 过表达逆转了 ccRCC 中的 Warburg 效应, 导致代谢转换, 降低了细胞的增殖速度。

此外, 在以往报道中显示, ROS 包括超氧阴离子、过氧化氢和羟基自由基, 往往与氧化应激有关, 通过损伤脂质、蛋白质和 DNA 来诱导疾病的发生^[18]。而 H₂O₂ 由线粒体和 NADPH 氧化酶产生的超氧化物产生^[19]。超氧化物可损伤含有铁硫簇的蛋白并使其失活, 超氧化物酶可防止超氧化物的积累, 其中超氧化物酶 SOD1 主要位于细胞质和线粒体膜间隙, SOD2 位于线粒体基质^[20]。SOD2 将线粒体电子传递链的副产物 ROS 转化为过氧化氢和双原子氧, 由此起到清除 ROS 的作用^[21]。同时, SOD2 是 SIRT3 的底物, SIRT3 对 SOD2 上的两个关键赖氨酸残基进行去乙酰基, 从而促进其抗氧化活性, 降低细胞的 ROS 水平^[22]。GPX4 属于谷胱甘肽过氧化物酶家族, 催化过氧化氢的还原, 用于保护细胞免受氧化应激^[23]。此外, TXN 和 GLRX5 均为重要的抗氧化剂。在本文中, SIRT3 过表达后, 769-P 中的 ROS 水平显著降低, 这与以往关于 SIRT3 降低 ROS 水平的研究相一致。且在我们蛋白质组学结果中, SIRT3 过表达引起抗氧化酶 SOD2、TXN、GPX4 及 GLRX5 表达上调, 由此推测这可能就是 ROS 降低的原因。这些抗氧化酶的高表达降低了细胞中的 ROS 水平, 增强了细胞的抗氧化能力。

参考文献(References)

- [1] Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, et al. Mammalian sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2007, 27(24): 8807-8814
- [2] Someya S, Yu Wei, Hallows WC, et al. Sirt3 Mediates Reduction of Oxidative Damage and Prevention of Age-Related Hearing Loss under Caloric Restriction[J]. *Cell*, 2010, 143(5): 802-812
- [3] Finley LWS, Haas W, Desquiret Dumas V, et al. Succinate Dehydrogenase Is a Direct Target of Sirtuin 3 Deacetylase Activity[J]. *Plos One*, 2011, 6(8): e23295
- [4] Hebert AS, Dittenhafer-reed KE, Yu Wei, et al. Calorie Restriction and SIRT3 Trigger Global Reprogramming of the Mitochondrial Protein Acetylome[J]. *Molecular Cell*, 2013, 49(1): 186-199
- [5] Chen Yaohui, Zhang Jinye, Lin Yan, et al. Tumour suppressor SIRT3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutase to scavenge ROS[J]. *Embo Reports*, 2011, 12(6): 534-541
- [6] Kamarajan P, Alhazzazi TY, Danciu T, et al. Receptor-interacting protein (RIP) and Sirtuin-3 (SIRT3) are on opposite sides of anoikis and tumorigenesis[J]. *Cancer*, 2012, 118(3): 5800-5810
- [7] Hansen SF, S Laursen AL, Jensen TS, et al. The Nordic maintenance care program: what are the indications for maintenance care in patients with low back pain? A survey of the members of the Danish Chiropractors' Association [J]. *Chiropractic & osteopathy*, 2010, 18(1): 25
- [8] Xiao Kui, Jiang Jiehan, Wang Wei, et al. Sirt3 is a tumor suppressor in lung adenocarcinoma cells [J]. *Oncology Reports*, 2013, 30(3): 1323-1328
- [9] Yang Bing, Fu Xueqiong, Shao Liang, et al. Aberrant expression of SIRT3 is conversely correlated with the progression and prognosis of human gastric cancer [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 443(1): 156-160
- [10] Jonasch E, Gao J, Rathmell WK. Renal cell carcinoma [J]. *Bmj-British Medical Journal*, 2014, 349(12): g4797
- [11] Li Bo, Qiu Bo, Lee DSM, et al. Fructose-1,6-bisphosphatase opposes renal carcinoma progression[J]. *Nature*, 2014, 513(7517): 251
- [12] Wang Xiao-fei, Tang Hai-ping, Chen Yu-ling, et al. Overexpression of SIRT3 disrupts mitochondrial proteostasis and cell cycle progression[J]. *Protein & Cell*, 2016, 7(4): 295-299
- [13] Jeh SU, Park JJ, Lee JS, et al. Differential expression of the sirtuin family in renal cell carcinoma: Aspects of carcinogenesis and prognostic significance [J]. *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations*, 2017, 35(12): 1078-1439
- [14] Wettersten HI, Abu Aboud O, Lara PN, et al. Metabolic reprogramming in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2017, 13(7): 410-419
- [15] Kato Y, Maeda T, Suzuki A, et al. Cancer metabolism: New insights into classic characteristics[J]. *Japanese Dental Science Review*, 2018, 54(1): 8-21
- [16] Carracedo A, Cantley LC, Pandolfi PP. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2013, 13(4): 227-232
- [17] Wettersten HI, Hakimi AA, Morin D, et al. Grade-Dependent Metabolic Reprogramming in Kidney Cancer Revealed by Combined Proteomics and Metabolomics Analysis[J]. *Cancer Research*, 2015, 75(12): 2541-2552
- [18] Cross CE, Halliwell B, Borish ET, et al. Oxygen radicals and human-disease[J]. *Annals of Internal Medicine*, 1987, 107(4): 526-545
- [19] Brand MD. The sites and topology of mitochondrial superoxide production[J]. *Experimental Gerontology*, 2010, 45(7-8): 466-472
- [20] Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻ radical anion), superoxide dismutases, and related matters [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(30): 18515-18517
- [21] Pias EK, Ekshyyan OY, Rhoads CA, et al. Differential effects of superoxide dismutase isoform expression on hydroperoxide-induced apoptosis in PC-12 cells [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(15): 13294-13301
- [22] Qiu Xiaolei, Brown K, Hirsche MD, et al. Calorie Restriction Reduces Oxidative Stress by SIRT3-Mediated SOD2 Activation[J]. *Cell Metabolism*, 2010, 12(6): 662-667
- [23] Fanzani A, Poli M. Iron, Oxidative Damage and Ferroptosis in Rhabdomyosarcoma [J]. *International journal of molecular sciences*, 2017, 18(8)