

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.11.002

SIRT2 基因通过调节 WNT 通路在 RA 诱导的神经管畸形的初步试验研究 *

王 怡¹ 何学佳² 曾雨冰³ 刘 帆³ 裴 培¹ 王 珊^{1Δ}

(1 首都儿科研究所生物化学与免疫学研究室 北京 100020;

2 北京大学首都儿科研究所教学医院 北京 100020; 3 北京协和医学院教学医院首都儿科研究所 北京 100020)

摘要 目的:基于敲除 sirtuin2(*SIRT2*)基因的人胚胎肾细胞(HEK293)模型的转录组学结果,在细胞水平和动物模型中探究 *SIRT2* 基因是否通过调控 WNT 通路参与维甲酸(Retinoic acid, RA)诱导的神经管畸形(neural tube defects, NTDs)。**方法:**培养 *SIRT2* 敲除组(KO-*SIRT2*)和正常组(KO-Con)的 HEK293 细胞,提取总 RNA,应用转录组测序技术(RNA-seq)对上述两组细胞进行分析,寻找差异表达基因 ($P<0.05$, $|\log_2\text{FoldChange}|\geq 1$) 并进行 GO (Gene Ontology) 以及 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)分析。RA 分别诱导 KO-*SIRT2* 组和 KO-Con 组的 HEK293 细胞,应用 Western Blot(WB)技术检测 WNT5B 表达水平。建立 RA 诱导的 NTDs 小鼠模型,应用免疫组织化学染色技术(IHC)检测孕龄 10.5 天(E10.5)的胎鼠脑组织 Sirt2 和 Wnt5b 蛋白水平。**结果:**与 KO-Con 组相比, KO-*SIRT2* 组的 HEK293 细胞中显著改变的差异表达基因有 209 个,KEGG 分析集中在 WNT、Hippo、PI3K-Akt 等信号通路。敲除 *SIRT2* 组, KO-*SIRT2* 组的 WNT5B 蛋白水平升高。RA 诱导 HEK293 细胞, KO-Con 组的 WNT5B 蛋白水平升高。IHC 结果显示, RA 诱导的 NTDs 胎鼠脑组织 Sirt2 蛋白和 Wnt5b 蛋白水平增高。**结论:***SIRT2* 基因可以通过调节 WNT 通路参与 RA 诱导 NTDs 的发生。

关键词:神经管畸形; RNA 测序; *SIRT2* 敲除; WNT 通路; 胚胎发育

中图分类号: R772.1; R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2024)11-2009-06

Preliminary Experimental Study of SIRT2 Gene in RA-induced Neural Tube Defects by Regulating WNT Pathway *

WANG Yi¹, HE Xue-jia², ZENG Yu-bing³, LIU Fan³, PEI Pei¹, WANG Shan^{1Δ}

(1 Department of Biochemistry and Immunology, Capital Institute of Pediatrics, Beijing, 100020, China;

2 Teaching Hospital, Capital Institute of Pediatrics, Peking University, Beijing; 100020, China;

3 Capital Institute of Pediatrics, Graduate School of Peking Union Medical College, Beijing, 100020, China)

ABSTRACT Objective: To explore whether sirtuin2 (*SIRT2*) regulates retinoic acid (RA) -induced neural tube defects (NTDs) at the cellular level and in animal models through WNT pathway based on the transcriptomics results of human embryonic kidney cell (HEK293) model with *SIRT2* gene knockout. **Methods:** *SIRT2* knockdown group (KO-*SIRT2*) and *SIRT2* control group (KO-Con) were cultured and total RNA was extracted. RNA-seq technology was used to analyze the transcriptomics of the two groups of cells. Search for differentially expressed genes ($P<0.05$, $|\log_2\text{FoldChange}|\geq 1$). GO (Gene Ontology) and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) analysis were conducted. HEK293 cells in KO-*SIRT2* group and KO-Con group were induced by RA and the level of key signaling pathway protein (WNT5B) was detected by Western Blot (WB). A mouse model of NTDs induced by RA was established and the level of Sirt2 and Wnt5b proteins of brain tissues in E10.5 fetal mice was detected by immunohistochemical staining (IHC). **Results:** Compared with KO-Con group, 209 differentially expressed genes (107 up-regulated and 102 down-regulated) were significantly changed in KO-*SIRT2* group. Enrichment analysis involved multiple signaling pathways such as WNT, Hippo and PI3K-Akt. After *SIRT2* knockout, the WNT5B protein was up-regulated in the KO-*SIRT2* group. After RA induction, the level of WNT5B in KO-Con group was increased. IHC showed increased levels of Sirt2 and Wnt5b proteins in the RA-induced NTDs model. **Conclusions:** *SIRT2* gene can affect embryonic development by regulating the translation of WNT pathway genes.

Key words: Neural Tube Defects; RNA Sequencing; *SIRT2* knockdown; WNT pathway; Embryonic development

Chinese Library Classification (CLC): R772.1; R-33 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)11-2009-06

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82071690); 首都儿科研究所所级基金项目(CXYJ-2-21-09)

作者简介: 王怡(1998-), 女, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 儿科学, E-mail: wangyiyvonne29@sina.com

Δ 通讯作者: 王珊, E-mail: wsaquarius@sina.com

(收稿日期: 2023-12-23 接受日期: 2024-01-18)

前言

Sirtuin 蛋白作为一类 NAD⁺ 依赖的去乙酰化酶可参与调控代谢、长寿、炎症等过程^[1-4]。根据不同的亚细胞定位及功能,哺乳动物的 Sirtuin 蛋白分为 SIRT1-SIRT7^[5]。SIRT2 蛋白位于细胞质,在人类的组织和器官中广泛表达,如神经系统、心、肺、肝脏等,在大脑中的表达水平最高^[6,7]。SIRT2 蛋白在哺乳动物中枢神经系统发育中具有保护神经上皮、调控神经元迁移和树突发育的功能^[8,9]。已有文章报道 SIRT2 通过去乙酰化富含丙氨酸的豆蔻酰化蛋白激酶 C 的作用底物 (MARCKS) 在调控糖尿病诱导的神经管畸形 (neural tube defects, NTDs) 中的关键作用^[10]。

维甲酸 (Retinoic acid, RA) 作为一种诱导小鼠神经管畸形模型的常用药物,在神经管畸形研究中广泛应用^[11,12]。WNT 通路尤其是 WNT5B 在胚胎发育中的重要作用已经在斑马鱼模型中获得了验证^[13,14]。目前尚不清楚 RA 是否可以通过 SIRT2 调控 WNT 通路 (WNT5B) 的表达水平进而影响胚胎发育。本研究通过敲除 SIRT2 基因筛选与其功能相关的关键基因 (WNT5B)。RA 诱导 KO-Con、KO-SIRT2, 在 HEK293 细胞模型中探究 SIRT2 敲除对 WNT5B 蛋白的影响。建立 RA 诱导的 NTDs 小鼠模型, 探究胚胎组织 Sirt2 以及 Wnt5b 蛋白水平变化。为后续 SIRT2 在 NTDs 中的功能、SIRT2 相关作用靶点的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性和雌性的 6 周 SPF 级的 C57BL/6J 小鼠从北京维通利华动物有限公司购入。小鼠在恒温恒湿的鼠房中喂养。温度 24℃, 湿度 50%。12 小时光照/12 小时黑暗的周期给予小鼠光照。Sirt2 以及 Wnt5b 抗体从 Cell Signaling Technology 购买。RA 购自 SIGMA。

1.2 方法

1.2.1 KO-SIRT2 组和 KO-Con 组的 HEK293 细胞的 RNA-seq 分析 本研究室前期成功构建了稳定敲除 SIRT2 基因的 HEK293 细胞系, 收集 KO-Con 组和 KO-SIRT2 组的 HEK293 细胞, 提取总 RNA 后进行浓度测定并将 RNA 储存于 -80℃。利用 Illumina HiSeq 2500 进行双端测序。对测序数据进行过滤并获取高质量 clean reads, 统计过滤后总碱基数中质量值大于 30 的碱基数占总碱基数的比例 (Q30) 以及回帖到参考基因组序列的 reads 占 Total reads 的比例。本次测序 Q30 碱基百分比 > 94%, 序列比对效率大于 97%, 质控结果较好。使用 StringTie 软件进行表达量 readcount 的计算, 根据公式计算基因和转录本的 FPKM (Fragments Kilobase of exon model per Million reads) 值。根据每个样品各个基因的表达量计算 Pearson 相关系数绘制样品相关性热图, 样本相关程度较好。利用 DESeq2 进行差异比较分析, 差异基因筛选标准为: $|\log_2 \text{Fold-Change}| \geq 1$ 且 $P\text{-Value} \leq 0.05$ 。根据统计结果绘制差异表达基因火山图。使用 GO 以及 KEGG 数据库进行分析, 寻找 SIRT2 参与调控的基因及信号通路。

1.2.2 RA 诱导的 HEK293 细胞模型验证 WNT5B 蛋白表达情

况 (1) 细胞培养与传代

液氮罐中取出 HEK293 细胞, 37℃ 水浴 1 分钟后重悬细胞, 离心, 弃去上清液后将细胞置于恒温恒湿的 CO₂ 培养箱中。2-3 天后观察细胞密度进行传代, 吸出培养基、PBS 清洗、胰酶消化后置于培养箱 1-3 分钟。显微镜观察细胞脱落情况, 待大部分细胞层从瓶底脱落后加入液体培养基中和反应, 离心, 弃去上清液后加入培养基重悬细胞, 将细胞悬液按 1:3 传至新的 T25 培养瓶中, 混匀后放置于培养箱中。

(2) RA 处理及细胞蛋白质提取

用 1 μmol/L 的 RA 处理 KO-Con 组和 KO-SIRT2 组的 HEK293 细胞 24 小时^[5], 随后提取 KO-Con 组、KO-SIRT2 组、KO-Con + RA 组、KO-SIRT2 + RA 组细胞的蛋白质。2.5% EDTA 的胰酶消化细胞, PBS 洗涤后离心, 加入抽提试剂, 冰上裂解 30 分钟, 每 4 分钟上下颠倒混匀一次。随后 4℃, 12000 r/min 离心 10 分钟。吸取上清液测量浓度, 1:1 加入 Loading Buffer 煮沸 10 分钟, 用于后续 Western Blot 实验。

(3) Western Blot 实验

使用 10% 的 SDS-PAGE 进行蛋白质凝胶电泳, 条带分离后 NC 膜电转 2 小时, 5% 的脱脂牛奶封闭 1.5 小时, 将膜浸泡于 WNT5B (1:1000) 的一抗稀释液中, 4℃ 孵育 14 小时后 PBST 洗膜。将膜浸入兔二抗中, 室温孵育 1 h 后 PBST 洗膜。化学发光试剂显影, 全自动化学发光成像系统扫描, 计算条带丰度、统计分析。

1.2.3 RA 诱导的 NTDs 小鼠模型验证 Sirt2 与 Wnt5b 蛋白表达情况 建立 RA 诱导的 NTD 小鼠模型, 选取 6 周龄的 C57BL/6J 雄性 & 雌性小鼠于 20 点合笼 (雌雄比例为 1:2), 次日清晨 8:00 检查雌性小鼠阴道, 将阴道可见交配栓的雌鼠选出并随机分为 Con 组与 NTDs 组, 将次日 12:00 定为孕 0.5 天 (E0.5), NTDs 组给予正常饲料喂养并于 E7.5 采取 RA 灌胃处理, RA 浓度为 25 mg/kg, Con 组给予正常饲料喂养并于 E7.5 灌胃相同剂量的香油。于 E10.5 断颈处死 Con 组与 NTDs 组的孕鼠, 取出胚胎, 于预冷的 PBS 中小心地剥下胎鼠的胎盘和胎膜, 分离胎鼠。4% 的多聚甲醛溶液固定 E10.5 胚胎组织, 48 小时后 PBS 洗涤、乙醇脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡、蒸馏水洗。抗原修复后, 使用 3% 双氧水溶液阻断内源性过氧化物酶。使用 3% BSA 封闭, 以 Sirt2 (1:50 稀释, Cell Signaling Technology)、Wnt5b (1:50 稀释, Cell Signaling Technology) 为一抗, 4℃ 孵育 12 小时, 加入二抗, 室温孵育 50 min。DAB 显色、苏木素复染细胞核后脱水封片, 置于白光显微镜下进行观察并拍照。使用 ImageJ 软件分析免疫组化图片, 平均光密度值 (Average Optical Density, AOD) = 积分光密度值 / 阳性分布区域面积。

1.2.4 统计分析 所有实验结果均以均数 ± SD 表示, 至少重复 3 次。采用 GraphPad Prism 8 版软件对所有数据进行分析。P 值 < 0.05 提示数据具有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA-seq

2.1.1 差异表达基因筛选 按照 $|\log_2 \text{Fold Change}| \geq 1$ 且 $P\text{-Value} \leq 0.05$ 的标准筛选出差异表达的基因。结果显示, 与 KO-Con 相比, KO-SIRT2 组中有 209 个基因的表达量发生变

化,其中 107 个上调,102 个下调, $P<0.05$ 。差异表达基因火山图描绘了 KO-SIRT2 的 HEK293 细胞相比于 Con-SIRT2 的差异基因表达情况(图 1.1)。

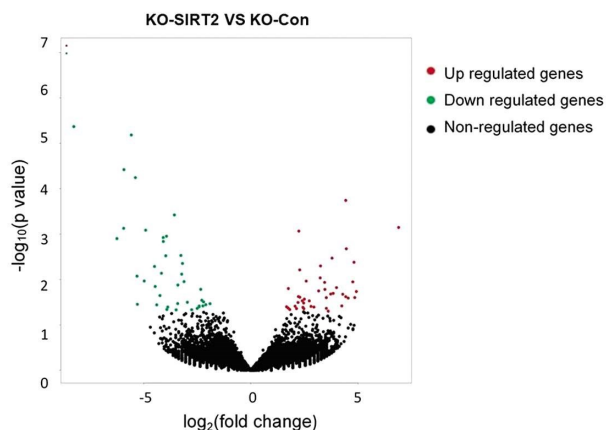


图 1.1 差异表达基因火山图

Fig.1.1 Volcano map of differentially expressed genes

2.1.2 差异表达基因的功能注释 对 209 个差异表达基因进行 GO 注释与富集,发现 *SIRT2* 参与的主要生物学进程为组蛋白 H4 去乙酰化、DNA 损伤反应等。细胞组分主要定位在细胞膜与细胞外周;主要分子功能与组蛋白去乙酰酶调节因子活性、组蛋白去乙酰化过程相关(图 1.2); KEGG 信号通路富集

性分析发现 WNT、Hippo 等信号通路发生激活。WNT 信号通路和 Hippo 信号通路富集到的基因有 *WNT2B*、*WNT5B*、*MYC*、*FZD9* 等。WNT 配体生物发生和转运富集到的基因有 *WNT2B* 和 *WNT5B*(图 1.3)。

2.2 RA 诱导的 HEK293 细胞中 WNT5B 蛋白表达情况

RA 诱导 24 小时后,KO-Con+RA 组相比于 KO-Con 组,WNT5B 蛋白表达升高且有统计学意义($P<0.01$),如图 2(中),这提示 RA 可促进 WNT5B 的表达。敲除 *SIRT2* 后 KO-SIRT2 组相比于 KO-Con 组的 WNT5B 蛋白表达升高且有统计学意义($P<0.001$),如图 2(右),这提示 WNT 通路(WNT5B)参与调节 *SIRT2* 的表达。

2.3 RA 诱导的 NTDs 小鼠模型的建立

体视镜照片(图 3)正面图显示,正常组 E10.5 胚胎小鼠发育完好,头面部发育正常,神经管闭合完全,脊柱自然弯曲、形态流畅、发育完好,而 RA 诱导的 NTDs 组小鼠胚胎体积较小、发育异常,头面部发育畸形,侧面照片可见其出现脊柱裂,脊柱发育畸形、形态不连续。

2.4 免疫组化验证 NTD 小鼠模型中 Sirt2 与 Wnt5b 蛋白表达

IHC 染色分析检测正常组(Con)以及 RA 诱导的 NTDs 小鼠组织的 *Sirt2*、*Wnt5b* 蛋白表达情况。利用平均光密度值(AOD)衡量两种蛋白在神经管区域的表达水平。结果显示(图 4.1 左,图 4.2 左),与 Con 组相比,NTDs 组神经管的 *Sirt2* 以及 *Wnt5b* 染色增强,AOD 值升高且 P 值具有统计学意义(图 4.1

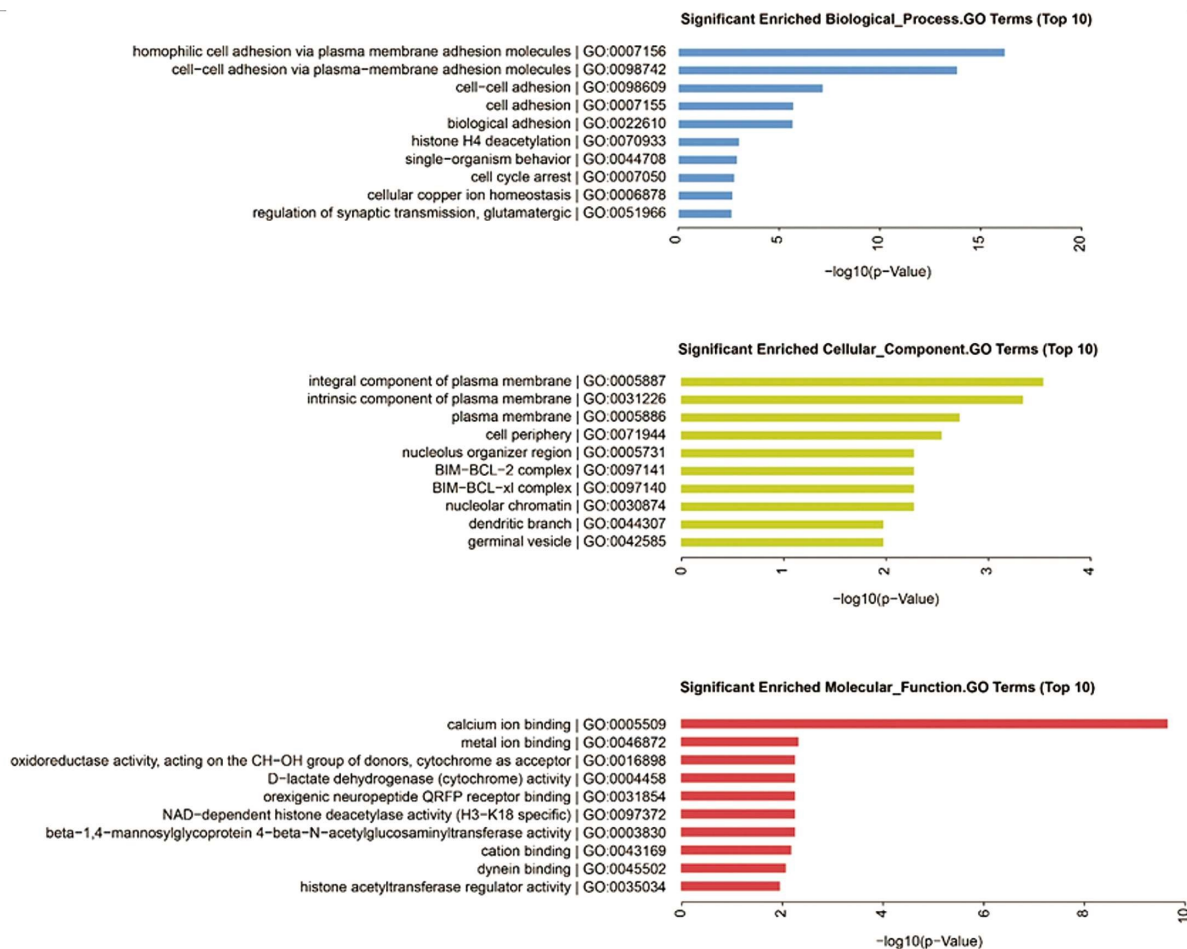


图 1.2 GO 信号通路富集性分析

Fig.1.2 Enrichment analysis diagram of GO signaling pathway

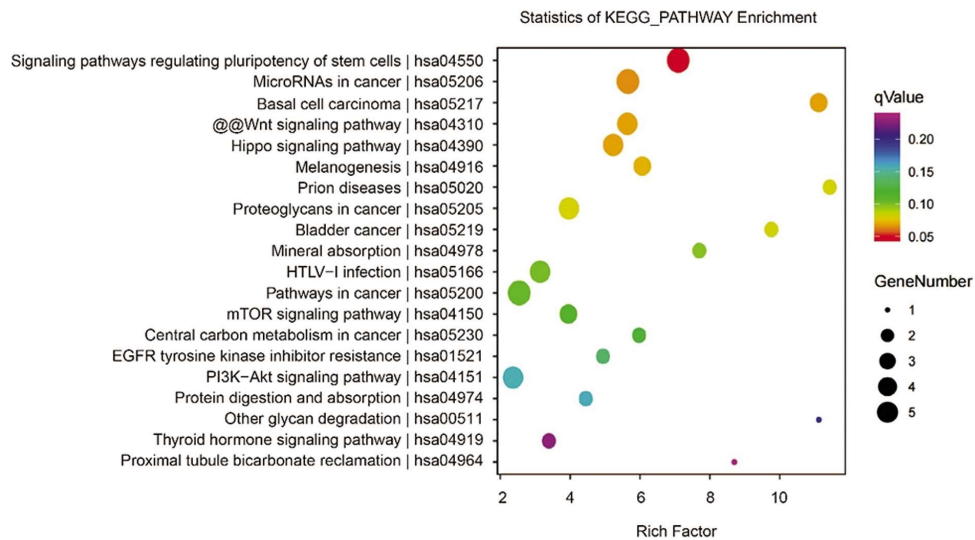


图 1.3 KEGG 信号通路富集性分析

Fig.1.3 Enrichment analysis diagram of KEGG signaling pathway

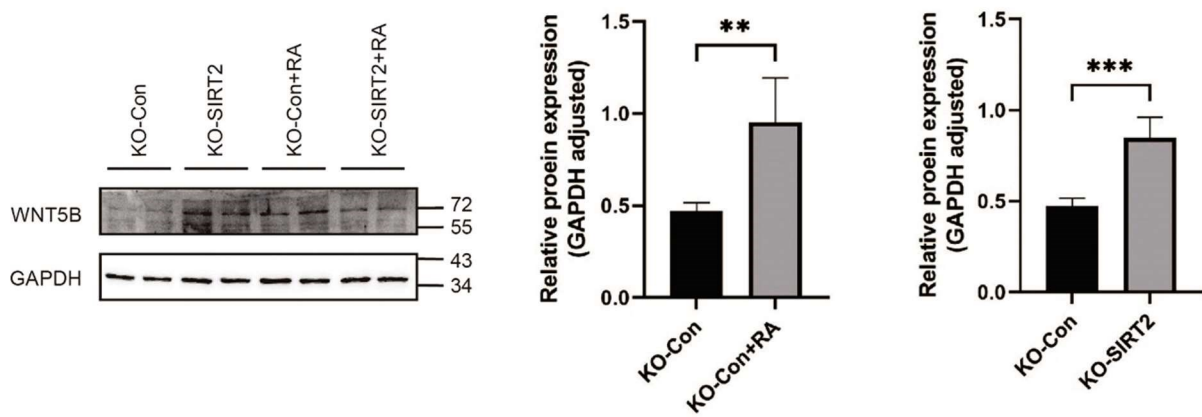


图 2 RA 诱导的 HEK293 细胞中 WNT5B 蛋白表达水平及统计分析

Fig.2 The expression level of WNT5B protein in HEK293 cells induced by retinoic acid

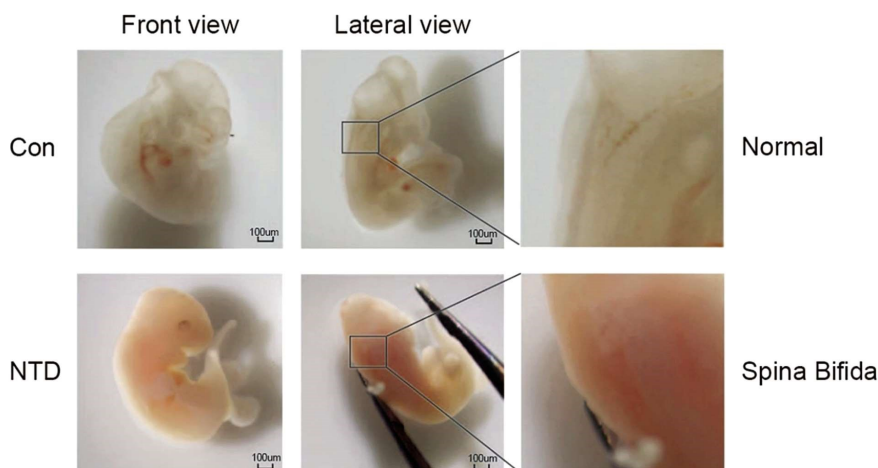


图 3 RA 诱导的小鼠神经管畸形模型体视镜照片

Fig.3 Stereoscopic photographs of NTDs model induced by RA

右,图 4.2 右),这表明维甲酸促进了 E10.5 胚鼠的去乙酰化酶 Sirt2 以及 WNT 通路关键蛋白 Wnt5b 的表达,影响了小鼠胚胎神经管闭合。

3 讨论

Sirt2 基因敲除的动物模型及细胞模型被广泛应用于对疾病发病机制的研究。在 Sirt2 基因敲除的小鼠及大鼠模型中,研究证实了敲除 Sirt2 基因可以引起心脏肥大、胰岛素分泌受损、代谢紊乱、神经退行性疾病和脑缺血^[1621]。在 Sirt2 基因敲除的

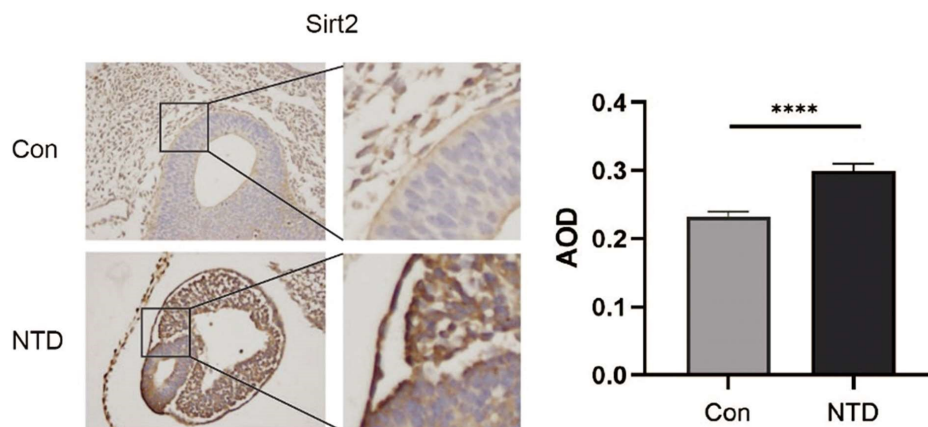


图 4.1 NTD 小鼠 SIRT2 蛋白的免疫组化染色及统计分析

Fig.4.1 IHC and statistical analysis of SIRT2 protein in NTDs mice

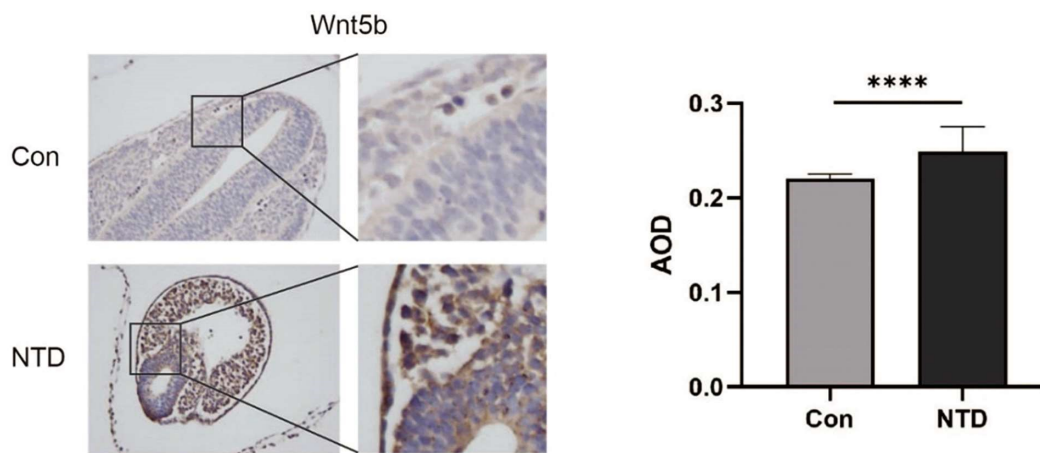


图 4.2 NTDs 小鼠 WNT5B 蛋白的免疫组化染色及统计分析

Fig.4.2 IHC and statistical analysis of WNT5B protein in NTDs mice

巨噬细胞系中,敲低 *Sirt2* 基因可以促进炎症小体激活,影响衰老相关炎症与胰岛素抵抗^[2]。

WNT 基因高度保守,其编码的 *WNT* 蛋白对多种生命进程尤其是神经发育至关重要^[23-27]。*WNT* 通路参与调节大脑皮质和海马的发育,*WNT* 通路受体 *Frizzled9* (*Fzd9*) 在海马中特异性表达^[28]。*WNT* 通路共有 19 种 *WNT* 蛋白,根据是否依赖于 β -catenin 的转录活化,*WNT* 信号通路可分为经典通路 (*WNT*- β -catenin 信号通路)和非经典的 *WNT*/*PCP* 信号通路和 *WNT*/ Ca^{2+} 信号通路。其中 *Wnt5a* 和 *Wnt5b* 的配体参与了预防造血衰竭,刺激造血发生与衰老的发展^[29]。

研究证实,通过 *Sirt2* 基因敲除小鼠可以抑制 *Wnt*/ β -catenin 信号传导对肠上皮细胞增殖和分化发挥作用^[25]。此外还发现 *SIRT2* 通过 *Wnt*/ β -catenin 参与了结直肠癌细胞的分化以及机体免疫过程^[30,31]。利用野生型和 *Sirt2* 基因敲除小鼠的胚胎成纤维细胞进行共免疫沉淀实验证明了 β -catenin 可以直接结合 *Sirt2*^[32]。*Sirt2* 可以通过介导的经典 *WNT*/ β -catenin 信号通路对肾脏类器官的发生和发育产生重要作用^[33]。过往的研究充分证明了 *SIRT2* 基因以及 *WNT* 通路在调控器官发育以及衰老中的作用。本研究中,敲低 *SIRT2* 基因后,*WNT* 通路中的 *WNT5B* 基因发生差异表达。我们通过 WB 证实敲低 *SIRT2* 基因以及 RA 诱导后 *WNT5B* 蛋白表达水平平均升高。这表明 *SIRT2* 基因的表达影响了 *WNT* 通路。

RA 作为一种维生素 A 代谢产物参与了神经管的闭合,在小鼠早期胚胎发生时期,其过量或不足均可导致 NTDs。在 RA 诱导的 NTDs 小鼠模型中,有研究发现 *miR-222-3p* 通过 *Ddit4* 抑制调控 *Wnt*/ β -catenin 信号通路,导致 HT-22 细胞细胞增殖和凋亡失衡^[34]。本研究通过 IHC 证实在 RA 诱导的 NTDs 小鼠模型中 *Sirt2* 蛋白和 *Wnt5b* 蛋白表达水平平均升高,这提示了 *Sirt2* 蛋白和 *Wnt5b* 蛋白在神经管发育当中的重要作用。

本研究从建立敲除 *SIRT2* 基因的细胞模型出发,应用 RNA-seq 技术探索与 *SIRT2* 功能相关的关键基因并验证 *WNT* 通路在 *SIRT2* 蛋白表达中的作用。探究了 RA 对 *SIRT2* 蛋白及 *WNT* 通路相关蛋白表达的作用,并在 RA 诱导的发育缺陷动物模型中进行了验证。

参考文献 (References)

- [1] Imai S, Guarente L. *NAD⁺ and sirtuins in aging and disease* [J]. Trends Cell Biol, 2014, 24(8): 464-471.
- [2] Kida Y, Goligorsky M S. Sirtuins, Cell Senescence, and Vascular Aging[J]. Can J Cardiol, 2016, 32(5): 634-641.
- [3] Morigi M, Perico L, Benigni A. Sirtuins in Renal Health and Disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2018, 29(7): 1799-1809.
- [4] Carraway H E, Malkaram S A, Cen Y, et al. Activation of SIRT6 by DNA hypomethylating agents and clinical consequences on combination therapy in leukemia[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 10325.
- [5] Frye R A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic

- Sir2-like proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273(2): 793-798.
- [6] North B J, Marshall B L, Borra M T, et al. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase[J]. *Mol Cell*, 2003, 11(2): 437-444.
- [7] North B J, Verdin E. Interphase nucleo-cytoplasmic shuttling and localization of SIRT2 during mitosis[J]. *PLoS One*, 2007, 2(8): e784.
- [8] Maxwell M M, Tomkinson E M, Nobles J, et al. The Sirtuin 2 microtubule deacetylase is an abundant neuronal protein that accumulates in the aging CNS [J]. *Human molecular genetics*, 2011, 20 (20): 3986-3996.
- [9] Kim J Y, Hwang H G, Lee J Y, et al. Cortactin deacetylation by HDAC6 and SIRT2 regulates neuronal migration and dendrite morphogenesis during cerebral cortex development [J]. *Mol Brain*, 2020, 13(1): 105.
- [10] Yang P, Xu C, Reece E A, et al. Tip60- and sirtuin 2-regulated MARCKS acetylation and phosphorylation are required for diabetic embryopathy[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 282.
- [11] Cheng X, Pei P, Yu J, et al. F-box protein FBXO30 mediates retinoic acid receptor γ ubiquitination and regulates BMP signaling in neural tube defects[J]. *Cell death & disease*, 2019, 10(8): 551.
- [12] Xie X, Li C, Yu J, et al. MTHFD1 is critical for the negative regulation of retinoic acid receptor signalling in anencephaly [J]. *Brain*, 2023, 146(8): 3455-3469.
- [13] Hung I C, Chen T M, Lin J P, et al. Wnt5b integrates Fak1a to mediate gastrulation cell movements via Rac1 and Cdc42 [J]. *Open Biol*, 2020, 10(2): 190273.
- [14] Hu B, Rodriguez J J, Kakkerla Balaraju A, et al. Glypican 4 mediates Wnt transport between germ layers via signaling filopodia [J]. *J Cell Biol*, 2021, 220(12): e202009082.
- [15] Yu J, Wang L, Pei P, et al. Reduced H3K27me3 leads to abnormal Hox gene expression in neural tube defects [J]. *Epigenetics Chromatin*, 2019, 12(1): 76.
- [16] Tang X, Chen X F, Wang N Y, et al. SIRT2 Acts as a Cardioprotective Deacetylase in Pathological Cardiac Hypertrophy[J]. *Circulation*, 2017, 136(21): 2051-2067.
- [17] Zhou F, Zhang L, Zhu K, et al. SIRT2 ablation inhibits glucose-stimulated insulin secretion through decreasing glycolytic flux [J]. *Theranostics*, 2021, 11(10): 4825-4838.
- [18] Zhang N, Zhang Y, Wu B, et al. Deacetylation-dependent regulation of PARP1 by SIRT2 dictates ubiquitination of PARP1 in oxidative stress-induced vascular injury[J]. *Redox Biol*, 2021, 47: 102141.
- [19] Wang W, Gong Q Y, Cai L, et al. Knockout of Sirt2 alleviates traumatic brain injury in mice [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(2): 350-356.
- [20] Zhao X, Du W, Zhang M, et al. Sirt2-associated transcriptome modifications in cisplatin-induced neuronal injury [J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 192.
- [21] Lee E J, Lee M M, Park S, et al. Sirt2 positively regulates muscle regeneration after Notexin-induced muscle injury[J]. *Exp Mol Pathol*, 2022, 127: 104798.
- [22] He M, Chiang H H, Luo H, et al. An Acetylation Switch of the NLRP3 Inflammasome Regulates Aging-Associated Chronic Inflammation and Insulin Resistance [J]. *Cell Metab*, 2020, 31 (3): 580-591.e585.
- [23] Sun X, Peng X, Cao Y, et al. ADNP promotes neural differentiation by modulating Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 2984.
- [24] Marchetti B, Tirolo C, L'Episcopo F, et al. Parkinson's disease, aging and adult neurogenesis: Wnt/ β -catenin signalling as the key to unlock the mystery of endogenous brain repair [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(3): e13101.
- [25] Li C, Zhou Y, Rychahou P, et al. SIRT2 Contributes to the Regulation of Intestinal Cell Proliferation and Differentiation[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2020, 10(1): 43-57.
- [26] Zhou X, Lu Y, Zhao F, et al. Deciphering the spatial-temporal transcriptional landscape of human hypothalamus development [J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(2): 328-343.e325.
- [27] Ji Y, Hao H, Reynolds K, et al. Wnt Signaling in Neural Crest Ontogenesis and Oncogenesis[J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1173.
- [28] Zhou W, Zhang Y, Li Y, et al. A transgenic Cre mouse line for the study of cortical and hippocampal development[J]. *Genesis*, 2010, 48 (5): 343-350.
- [29] Mastelaro de Rezende M, Zenker Justo G, Julian Paredes-Gamero E, et al. Wnt-5A/B Signaling in Hematopoiesis throughout Life[J]. *Cells*, 2020, 9(8).
- [30] Li C, Zhou Y, Kim J T, et al. Regulation of SIRT2 by Wnt/ β -catenin signaling pathway in colorectal cancer cells[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2021, 1868(4): 118966.
- [31] Bhaskar A, Pahuja I, Negi K, et al. SIRT2 inhibition by AGK2 enhances mycobacteria-specific stem cell memory responses by modulating beta-catenin and glycolysis [J]. *iScience*, 2023, 26 (5): 106644.
- [32] Nguyen P, Lee S, Lorang-Leins D, et al. SIRT2 interacts with β -catenin to inhibit Wnt signaling output in response to radiation-induced stress[J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(9): 1244-1253.
- [33] Han X, Sun Z. Adult Mouse Kidney Stem Cells Orchestrate the De Novo Assembly of a Nephron via Sirt2-Modulated Canonical Wnt/ β -Catenin Signaling[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9(15): e2104034.
- [34] Sun Y, Zhang J, Wang Y, et al. miR-222-3p is involved in neural tube closure by directly targeting Ddit4 in RA induced NTDs mouse model [J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(22): 2372-2386.