

创新团队成果专栏

SIRT3 去 SUMO 化修饰调节乳腺癌细胞 MCF7 增殖及化疗药物敏感性的研究

郝艳云¹, 俞思慧², 陆 静³, 顾 湘⁴, 张 帆⁵, 程金科^{1*}, 王田实^{1*}

1. 上海交通大学基础医学院生物化学与分子细胞生物学系, 上海 200025; 2. 上海交通大学附属第一人民医院妇产科, 上海 201620; 3. 上海交通大学医学院附属精神卫生中心物质成瘾科, 上海 200030; 4. 上海交通大学医学院附属第九人民医院眼科, 上海 200011; 5. 上海交通大学医学院附属新华医院耳鼻咽喉头颈外科, 上海 200092

[摘要] 目的·研究沉默调节蛋白3(sirtuin 3, SIRT3)去SUMO化修饰对乳腺癌细胞的增殖和耐药性的影响。方法·用CRISPR-Cas9质粒pX330-sgRNA敲除MCF7乳腺癌细胞系SIRT3基因,构建SIRT3KO的MCF7细胞系;在此细胞系基础上,利用表达SIRT3 K288R(SUMO化修饰位点突变型)和SIRT3 WT(野生型)的反转录病毒,以及空载对照(Vector)病毒进行感染,以构建SIRT3 SUMO化修饰位点突变的细胞系及其对照细胞系。3种细胞株在相同条件下培养后进行细胞计数并在显微镜下进行观察,确定细胞数量和形态的变化;用不同浓度的阿霉素分别处理细胞24、48、72 h,检测3种细胞株的耐药程度。结果·成功构建了敲除SIRT3的MCF7细胞系,并利用反转录病毒感染构建了表达SIRT3 K288R和SIRT3 WT以及空载对照的细胞系;通过细胞计数发现,在相同培养时间下,SIRT3 K288R细胞系的增殖速率显著低于SIRT3 WT和Vector细胞系($P=0.000$);在显微镜下测量非黏附性乳腺球群细胞的大小,发现SIRT3 K288R细胞系的直径较SIRT3 WT和Vector细胞系小,增殖缓慢。阿霉素耐药实验结果显示,在细胞培养24、48和72 h时,不同阿霉素浓度(1.25、2.5、5和10 $\mu\text{g/mL}$)处理下的SIRT3 K288R细胞系的活性均显著高于SIRT3 WT和Vector细胞系(均 $P<0.05$);并且相比另外2个细胞系,阿霉素在SIRT3 K288R细胞系中的半数抑制浓度(IC_{50})也较高。结论·去SUMO化修饰的SIRT3能抑制乳腺癌细胞MCF7的增殖,但增加其对阿霉素的耐药性。

[关键词] 沉默调节蛋白3; SUMO化修饰; 乳腺癌; 阿霉素; 耐药性

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.12.003 **[中图分类号]** R737.9 **[文献标志码]** A

Role of SIRT3 SUMOylation deficiency in the proliferation and chemotherapeutic sensitivity of breast cancer cells MCF7

HAO Yan-yun¹, YÜ Si-hui², LU Jing³, GU Xiang⁴, ZHANG Fan⁵, CHENG Jin-ke^{1*}, WANG Tian-shi^{1*}

1. Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201620, China; 3. Department of Substance Addiction, Shanghai Mental Health Center, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200030, China; 4. Department of Ophthalmology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China; 5. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the effects of deSUMOylation of sirtuin 3 (SIRT3) on the proliferation and chemotherapeutic drug resistance in breast cancer cells. **Methods**·In order to construct the MCF7-SIRT3KO cell line, the CRISPR-Cas9 plasmid pX330-sgRNA targeting SIRT3 gene was designed. Then, this cell line was infected with SIRT3 K288R (sumoylation modification site mutant), SIRT3 WT (wild type) or Vector retrovirus to establish the SIRT3 SUMOylation site mutation and control cell lines. Cell counting and microscopic observation were used to determine the changes in tumor cell number and morphology under the same incubation condition. To detect the chemotherapeutic drug resistance of SIRT3 K288R and the control cells, these cells were treated with different concentrations of adriamycin (ADM) for 24 h, 48 h and 72 h. **Results**·The MCF7-SIRT3KO cell line was constructed successfully, and then SIRT3 K288R, SIRT3 WT and Vector cell lines were established. The cell growth curves showed that the growth rate of SIRT3 K288R cells was significantly slower than those of SIRT3 WT and Vector cells under the same incubation condition ($P=0.000$). This phenotype was also observed under the microscope. The diameter of non-adherent breast cancer cell clumps of SIRT3 K288R cells was smaller than those of the control cells. ADM resistance experiment showed that the activity of SIRT3 K288R cells was significantly higher than those of Vector and SIRT3 WT cells treated with different concentrations of ADM (1.25 $\mu\text{g/mL}$, 2.5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ and 10 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h, 48 h and 72 h ($P<0.05$), and the half

[基金项目] 国家自然科学基金(81730082, 82030075, 32070759, 92049113); 上海交通大学“科技创新专项资金”项目(19X160010017); 上海交通大学医学院高水平地方高校创新团队(SSMU-ZLCX20180102)。

[作者简介] 郝艳云(1991—),女,硕士生;电子邮箱:yanyunhao@sjtu.edu.cn。

[通信作者] 王田实,电子邮箱:tianshi777@shsmu.edu.cn。程金科,电子邮箱:jcheng@shsmu.edu.cn。*为共同通信作者。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (81730082, 82030075, 32070759, 92049113); Special Funding Project of Shanghai Jiao Tong University (19X160010017); Innovative Research Team of High-Level Local Universities in Shanghai (SSMU-ZLCX20180102)。

[Corresponding Author] WANG Tian-shi, E-mail: tianshi777@shsmu.edu.cn. CHENG Jin-ke, E-mail: jcheng@shsmu.edu.cn. *Co-corresponding authors.

[网络首发] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2045.R.20210922.1353.006.html> (2021/9/23 15:14:04)。



maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of ADM in the SIRT3 K288R cells was higher than those in the control cells. **Conclusion** The SIRT3 SUMOylation deficiency inhibits the proliferation of breast cancer cells MCF7, while increases the drug resistance to ADM.

[Key words] sirtuin 3 (SIRT3); SUMOylation; breast cancer; adriamycin (ADM); drug resistance

由致癌基因突变导致的细胞代谢重编程是引起肿瘤发生的主要原因^[1]。越来越多的研究^[2-3]表明,肿瘤细胞的代谢具有很高的可变性和灵活性。而线粒体作为能量代谢和氧化还原的主要场所,肩负着为肿瘤细胞的各种生理活动提供能源(ATP)和维持肿瘤细胞内氧化-还原(redox)平衡的艰巨任务,这些过程对于肿瘤细胞的存活、生长和增殖至关重要^[4-5]。组学分析也证实了线粒体蛋白的乙酰化修饰与肿瘤代谢之间确实存在着相互影响^[6]。

沉默调节蛋白3(sirtuin 3, SIRT3)是依赖于 NAD^+ 的去乙酰化酶,主要存在于线粒体基质中,是调控线粒体中能量代谢的关键因子^[7]。越来越多的研究表明SIRT3能够对许多参与线粒体氧化途径的酶去乙酰化,促进营养物质氧化以及能量生成^[8]。SIRT3在肿瘤的发生发展过程中也扮演着重要角色^[9-12]。报道^[13]证实SIRT3能够调节线粒体活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的产生,抑制肿瘤细胞存活和增殖。近期研究^[14]也发现,SIRT3的缺失能通过减少三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA循环)和乙酰辅酶A库中谷氨酰胺的量来诱导弥漫大B细胞淋巴瘤的细胞死亡。

类泛素蛋白(small ubiquitin-like modifier protein, SUMO)也是参与调控肿瘤发生发展的重要分子。它能够通过SUMO特异性激活酶(E1)、结合酶(E2)和连接酶(E3)催化与靶蛋白中的赖氨酸残基偶联,实现靶蛋白的SUMO化修饰(SUMOylation)。蛋白质的SUMO化修饰是一种可逆反应,受SUMO特异性蛋白酶家族(sentrin-specific proteases, SENPs)调控^[15-16]。蛋白质SUMO化修饰会影响蛋白的细胞定位、活性以及稳定性等。经过20多年的研究,蛋白质的SUMO化修饰已经被报道广泛参与调控肿瘤细胞内的生物化学反应。因此,蛋白质的SUMO化修饰位点可能成为治疗肿瘤的药物靶点^[17]。研究^[16,18]证实,人的SIRT3蛋白能够发生SUMO化修饰;在营养应激的条件下,SIRT3的SUMO化修饰减少,可增强SIRT3的活性,降低其底物的乙酰化水平,改善线粒体的应激响应能力。人的SIRT3 SUMO化修饰位点是第288位赖氨酸残基,当这一位点突变为精氨酸(K288R)时,SIRT3将不发生SUMO化修饰,可增强线粒体氧化磷酸化和脂肪酸代谢,改善线粒体乃至细胞的活性^[16,18-19]。由此,我们推测SIRT3的SUMO化修饰也

能够影响肿瘤细胞的代谢增殖以及对化学治疗(化疗)药物的敏感性。

乳腺癌的发病率近几十年来一直呈上升的趋势^[20],应用抗癌药物遏制肿瘤细胞已经成为癌症治疗的重要手段之一^[21]。阿霉素(adriamycin, ADM)是临床上常用的广谱抗肿瘤抗生素,它已经被用于急性淋巴细胞白血病^[22]、淋巴瘤^[23]、卡波西肉瘤^[24]、乳腺癌^[25]等癌症的治疗。但肿瘤治疗过程中产生的耐药性问题一直是肿瘤治疗的大难题,目前的肿瘤化疗往往因为化疗敏感性低而失败。基于已有报道,我们认为SIRT3 SUMO化修饰通过调控其广泛底物的乙酰化水平,影响细胞内ROS水平和能量代谢水平,可能影响肿瘤细胞的耐药性。因此,本研究通过构建SIRT3 SUMO化位点突变的人乳腺癌细胞MCF7,来探讨SIRT3的去SUMO化修饰对肿瘤增殖及耐药性的影响,以期发现提高肿瘤化疗敏感性的新机制,为肿瘤的临床治疗提供新的策略。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

胎牛血清(美国Gibco, 10099141C), DMEM培养基(美国Gibco, 11995065), RPMI 1640培养基(美国Gibco, A1049101), B27细胞培养添加剂(美国Gibco, 17504044), 表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)(美国Gibco, PHG0311L), MEGM培养基(美国Lonza, CC-3150), 青霉素-链霉素双抗(美国Hyclone, SV30010), Lipo3000转染试剂(美国Invitrogen, L3000015), 限制性内切酶Bbs I(美国New England BioLabs, #R0539), T4 DNA连接酶(美国New England BioLabs, #M0202), T4多聚核苷酸激酶(美国New England BioLabs, #M0236), *E. coli*感受态细胞(中国TIANGEN, CB101), pX330质粒(美国Addgene, #127875), Gag-pol质粒(美国Addgene, #14887), pVSV-G质粒(美国Addgene, #138479), 抗SIRT3抗体(美国CST, #5490), 抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国CST, #4967), 兔源二抗(美国CST, #7074P2), 蛋白A琼脂糖纯化树脂(中国YEASEN, 36401ES25), 阿霉素(美国Sigma, D1515)。pBABE-3×Flag质粒来源于本实验室库存^[18], 抗SUMO1抗体由本实验室自行制备^[26]。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 本研究主要使用的细胞系为人乳腺癌细胞(MCF7:美国ATCC, HTB-22),购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。经鉴定,该细胞系无支原体污染。该细胞为贴壁细胞,使用含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素双抗的DMEM培养基,培养于37℃、含5%CO₂培养箱中,每周传代2~3次。本研究的所有实验均经上海交通大学医学院伦理委员会批准。

1.2.2 构建用于敲除SIRT3基因的pX330-sgRNA质粒 利用美国麻省理工学院的CRISPR sgRNA设计在线平台(<http://crispr.mit.edu>)设计sgRNA的引物序列。在美国国立生物技术信息中心(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)查找人SIRT3基因的编码序列,同时确定基因敲除位点。表1是最终合成的3对sgRNA引物。

表1 sgRNA引物信息

Tab 1 Primers used for sgRNA

Primer	Sequence
SIRT3KO fwd1	5'-CACCGGTCTTTGGCAGACTGTGC-3'
SIRT3KO rev1	5'-AAACGCACAGTCTGCCAAAGACCC-3'
SIRT3KO fwd2	5'-CACCGTACGATCTCCCGTACCCCG-3'
SIRT3KO rev2	5'-AAACCGGGGTACGGGAGATCGTAC-3'
SIRT3KO fwd3	5'-CACCGCGCACGGCTCGGTCAAGC-3'
SIRT3KO rev3	5'-AAACGCTTGACCGAGGCCGTGCGGC-3'

首先,用限制性内切酶Bbs I对pX330质粒在37℃下酶切30 min。同时,将合成的sgRNA用T4多聚核苷酸激酶在37℃孵育30 min,随后在95℃作用5 min,每分钟降低5℃直到25℃,完成磷酸化过程。然后,将磷酸化的sgRNA与琼脂糖凝胶回收的Bbs I酶切质粒通过T4 DNA连接酶连接。最后,将连接产物转化到E. coli感受态细胞,挑取单克隆测序鉴定pX330-sgRNA质粒是否构建成功。

1.2.3 构建MCF7-SIRT3KO细胞系 通过脂质体Lipo3000将pX330-sgRNA质粒转染进MCF7细胞。首先,将转染pX330-sgRNA的MCF7细胞培养24~48 h并计数,然后将细胞均匀移种到96孔板中,加入DMEM完全培养基开始单克隆培养,通过24孔板、6孔板持续传代培养1个月左右得到1×10⁵个以上的细胞,然后一半用于鉴定,另一半移种到24孔板继续培养。用于鉴定的细胞系经RIPA溶液[含50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)、150 mmol/L NaCl、0.3% NP40和1%蛋白酶抑制剂]裂解变性,通过SDS-PAGE和SIRT3抗体检测确定SIRT3KO细胞株构建成功。

1.2.4 构建反转录病毒质粒 通过设计带有酶切位点的

基因序列引物,将相应的人的SIRT3基因序列插入到pBABE-3×Flag的BamH I和EcoR I酶切位点之间,构建SIRT3 WT反转录病毒质粒,具体引物序列见表2。

在SIRT3 WT反转录病毒质粒中,通过设计SIRT3第288位赖氨酸编码基因周围的引物序列将该位点突变为精氨酸,使相应质粒表达的SIRT3蛋白不能够发生SUMO化修饰,且结构电荷不发生过多改变,从而构建SIRT3 K288R反转录病毒质粒,相应引物序列见表2。

表2 构建反转录病毒质粒引物序列

Tab 2 Primers used for retroviral plasmids construction

Primer	Sequence
SIRT3WT fwd	5'-CGCGGATCCATGGCGTTCTGGGGTTGGCGC-3'
SIRT3WT rev	5'-CCGGAATCTTTGTCTGGTCCATCAAGCTT-3'
SIRT3K288R fwd	5'-GGCGTTGTGAGGCCCGACATT-3'
SIRT3K288R rev	5'-AATGTCGGGCTCACAAACGCC-3'

1.2.5 反转录病毒质粒感染MCF7 SIRT3KO细胞系 反转录病毒感染前24 h,在10 cm培养皿中接种MCF7细胞,待细胞贴壁生长汇合至60%~70%。通过反转录病毒包装质粒Gag-pol、pVSV-G和目标基因质粒在293T细胞系产生病毒液。用3 mL病毒液、1 mL培养基和8 μg/mL的聚凝胺感染MCF7 SIRT3KO细胞系,通过嘌呤霉素筛选构建空载(Vector)、SIRT3 WT和SIRT3 K288R细胞系。

1.2.6 细胞线粒体组分分离 收集1×10⁸个细胞,用PBS洗涤细胞2遍,用冰浴预冷的PBS轻轻重悬细胞沉淀,取少量细胞用于计数,剩余细胞在4℃下600×g离心5 min,弃上清液,加入1 mL线粒体分离液[210 mmol/L甘露醇、70 mmol/L蔗糖、5 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、1 mmol/L EGTA、0.5 mg/mL BSA]至细胞或组织中,轻轻吹打细胞,冰上放置10~15 min;把细胞悬液转移到玻璃匀浆器中,匀浆30下左右。细胞匀浆液在4℃下600×g离心10 min,沉淀主要为细胞核组分,小心将上清液转移到另一个离心管中,在4℃下3 500×g离心10 min,小心去除上清组分,沉淀即为分离得到的细胞线粒体。

1.2.7 免疫沉淀实验 收集1×10⁸个细胞的线粒体组分,用PBS冲洗1~2遍,加入300 μL细胞裂解缓冲液[含50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)、300 mmol/L NaCl、0.3% NP40和1%蛋白酶抑制剂],13 500×g离心后取上清液。取1/10裂解液作为阳性对照样本,剩余裂解液加入1 μL相应的抗体,在4℃下摇床孵育过夜。将10 μL蛋白A琼脂糖纯化树脂加入上述细胞裂解液并在4℃下摇床孵育2~3 h。在4℃下4 500×g离心5 min,将琼脂糖纯化树脂离心至管底;将上清液小心吸去,再将琼脂糖纯化树脂用裂解缓冲液洗3次。最后,进行Western blotting分析。

1.2.8 阿霉素耐药性实验 以 1×10^5 个/孔的密度将MCF7细胞接种到96孔板中,加入含有10%血清的RPMI 1640培养基,在各孔中分别加入终浓度为10、5、2.5、1.25 $\mu\text{g/mL}$ 阿霉素处理24、48、72 h,以未加阿霉素处理的细胞作为对照组,用分光光度计读取波长540 nm处的吸光度值 $[D(540\text{ nm})]$,通过公式 $[\text{细胞活性} = (D_{\text{样本}}/D_{\text{对照}}) \times 100\%]$ 计算细胞活性,确定SIRT3 K288R乳腺癌细胞在体外对于化疗药物的敏感性。分别计算阿霉素在3个细胞株的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。

1.3 统计学分析

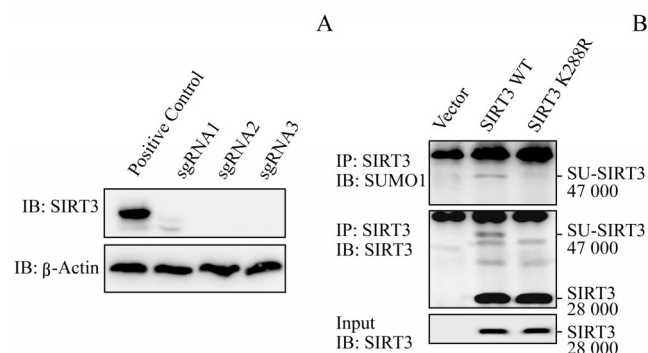
采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2组间比较采用独立样本 t 检验,所有实验至少重复3次,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立SIRT3 SUMO化修饰位点突变的MCF7细胞系

为了特异性地研究SIRT3蛋白对乳腺癌细胞的影响,我们首先构建了将SIRT3敲除的MCF7细胞系。将构建好的pX330-sgRNA转染至MCF7细胞,用Western blotting检测SIRT3蛋白条带,验证转染效率,并筛选阴性克隆,用未转染的MCF7细胞作阳性对照。结果(图1A)可见sgRNA1、sgRNA2和sgRNA3转染后均无SIRT3条带,说明SIRT3无表达;故sgRNA1、sgRNA2和sgRNA3均成功构建出了SIRT3敲除的MCF7细胞系,即MCF7-SIRT3KO细胞,可用于单克隆细胞培养。

为了进一步研究SIRT3的SUMO化对乳腺癌的影响,我们在MCF7-SIRT3KO细胞的基础上,分别转入SIRT3 WT质粒和SIRT3 K288R质粒。得到SIRT3 WT和SIRT3 K288R稳转细胞株,以感染空病毒载体的MCF7-SIRT3KO细胞作为对照(Vector组)。然后,用免疫共沉淀和Western blotting鉴定稳转细胞系(图1B),在Input中,SIRT3 WT和SIRT3 K288R可见相对分子质量28 000的蛋白条带,而Vector组无条带,表明2株细胞系均成功转入SIRT3质粒。用SIRT3抗体做免疫沉淀,并用SIRT3和SUMO1抗体检测,结果显示SIRT3 WT有SUMO化修饰,即存在一个相对分子质量为47 000的条带,而在SIRT3 K288R则没有,表明SIRT3 K288R能够使MCF7细胞的SIRT3 SUMO化修饰缺失,可用于研究SIRT3去SUMO化修饰在乳腺癌细胞的作用。



Note: A. MCF7-SIRT3KO lines identified by Western blotting (IB). B. Vector, SIRT3 WT and SIRT3 K288R cell lines identified by immunoprecipitation (IP) and Western blotting. SU-SIRT3—SUMOylated SIRT3.

图1 通过免疫沉淀和Western blotting鉴定构建的SIRT3 SUMO位点突变细胞系
Fig 1 Confirmation of SIRT3 SUMOylation deficiency cell line by immunoprecipitation and Western blotting

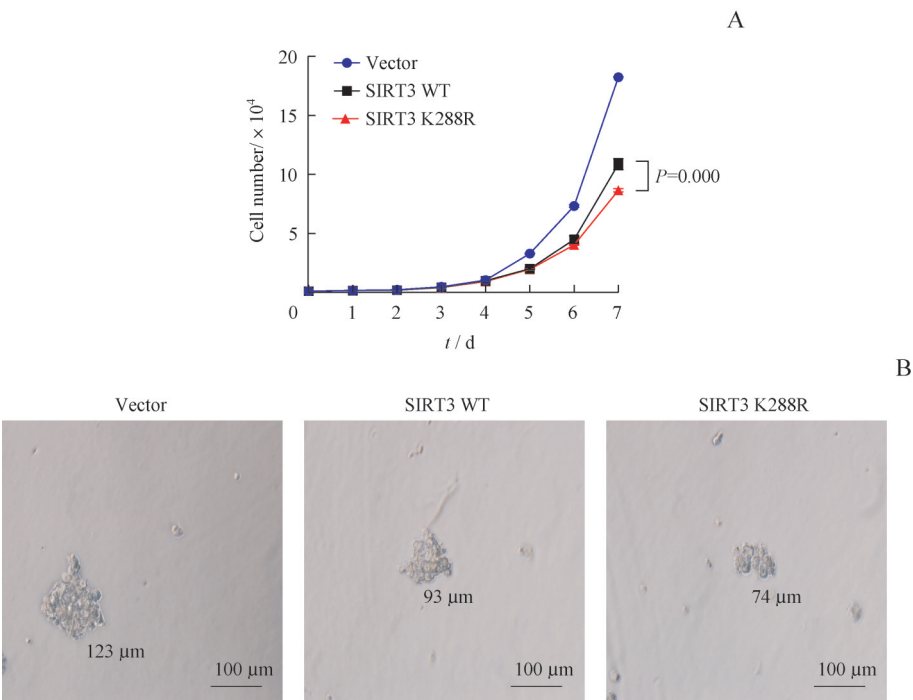
2.2 SIRT3去SUMO化修饰对乳腺癌细胞增殖的影响

乳腺癌细胞的增殖对乳腺癌的恶化、转移及治疗耐药性均有明显的促进作用,控制癌细胞的增殖已经成为遏制肿瘤对机体进一步侵袭的有效手段。SIRT3的SUMO化修饰能减弱SIRT3的活性,进而降低蛋白质的去乙酰化水平^[18],但SIRT3的SUMO化修饰是否影响乳腺癌细胞的增殖并不清楚。我们使用超低吸附6孔板将Vector、SIRT3 WT和SIRT3 K288R细胞株培养于无血清的MEGM培养基中,连续7 d每隔24 h对细胞进行计数,测定细胞的生长曲线,以检测SIRT3去SUMO化修饰对乳腺癌细胞增殖速率的影响。结果(图2A)显示,相同培养时间下,SIRT3 K288R细胞株的增殖速率明显低于SIRT3 WT和Vector细胞系,表明SIRT3不能发生SUMO化修饰时,即SIRT3活性增强时对乳腺癌细胞的增殖速率有抑制作用。

同时,我们使用超低吸附6孔板将Vector、SIRT3 WT和SIRT3 K288R细胞株培养于无血清的MEGM培养基中(添加B27和EGF)10 d。培养过程中在显微镜下对非黏附性乳腺球群细胞测量直径大小;发现SIRT3 K288R细胞株直径最小(图2B),表明其增殖最缓慢。综上所述,我们的研究表明SIRT3的去SUMO化修饰对乳腺癌细胞的增殖有抑制作用。

2.3 SIRT3去SUMO化修饰对肿瘤细胞耐药性的影响

癌细胞的耐药性增强使得癌细胞能有效逃脱临床药物的治疗,这使得肿瘤治疗面临着严峻的挑战。阿霉素是一类广谱抗肿瘤药物,用于乳腺癌等肿瘤的治疗。为了进一步研究SIRT3去SUMO化修饰对肿瘤耐药性的影响,我们对Vector、SIRT3 WT和SIRT3 K288R细胞系进行了阿霉素耐药性实验。通过分析3株细胞系在化疗药物处理下的活性差异,我们发现在细胞培养24、48和72 h

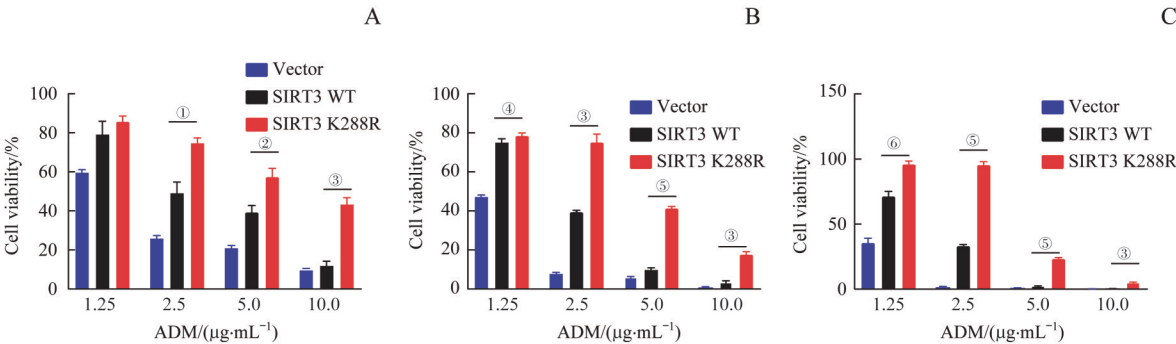


Note: A. Seven-day Growth curves of Vector, SIRT3 WT and SIRT3 K288R cells. B. Full-field views of single wells in the 96-well plates under microscopy (×100), and the values representing the diameters of the cell clumps.

图2 3组细胞的7 d生长曲线和非黏附性乳腺球群细胞
Fig 2 Seven-day growth curves of cells and non-adherent breast cancer cell clumps in 3 groups

时,阿霉素浓度为2.5、5和10 μg/mL的条件下,SIRT3 K288R细胞株的活性均显著高于SIRT3 WT和Vector细胞系,表明SIRT3 SUMO位点突变后,乳腺癌细胞的耐药性增强。同时,随着阿霉素浓度的增加,SIRT3 K288R

细胞株的活性由低于SIRT3 WT逐渐转变成高于SIRT3 WT,我们在细胞培养24、48和72 h时均观察到了这种现象(图3),进一步提示SIRT3 SUMO化能提高乳腺癌细胞在体外对于化疗药物的敏感性。



Note: ① $P=0.001$, ② $P=0.004$, ③ $P=0.000$, ④ $P=0.040$, SIRT3 K288R vs SIRT3 WT.

图3 3种细胞株经不同浓度阿霉素处理24 h(A)、48 h(B)和72 h(C)后的活性比较

Fig 3 Cell viability of 3 cell lines treated with various concentrations of ADM for 24 h (A), 48 h (B), and 72 h (C)

计算阿霉素的IC₅₀,其值越高,说明细胞对阿霉素的耐药性越强。阿霉素不同时间处理下Vector、SIRT3 WT和SIRT3 K288R细胞系的IC₅₀见表4,我们发现SIRT3 K288R的IC₅₀在3个时间点均高于Vector和SIRT3 WT,表明SIRT3 SUMO化修饰位点突变的MCF7细胞对阿霉素的耐药性最强,即SIRT3去SUMO化修饰使乳腺癌细胞系的耐药性增强。

表3 阿霉素处理3种细胞不同时间的IC₅₀(μg·mL⁻¹)

Tab 3 IC₅₀ of ADM in 3 cell lines for different time(μg·mL⁻¹)

Time	Vector	SIRT3 WT	SIRT3 K288R
24 h	2.179	3.634	6.930
48 h	2.386	3.708	6.892
72 h	2.307	4.646	5.053

3 讨论

根据 Warburg 效应,即使在有氧的情况下,肿瘤细胞仍然优先地利用葡萄糖进行糖酵解从而获取能量^[27]。脂肪酸合成及氧化代谢活跃是恶性肿瘤普遍具有的特异性之一^[28]。而去乙酰化酶 SIRT3 促进氧化磷酸化和脂肪酸氧化的代谢,从而能够降低糖酵解水平,起到抑制肿瘤增殖的作用。SIRT3 的 SUMO 化修饰能够抑制其活性,去 SUMO 化修饰可增强其活性,因此 SIRT3 去 SUMO 化修饰后具有抑制肿瘤细胞增殖的潜质。

SUMO 化修饰在乳腺癌中扮演着重要的角色,它可以控制乳腺癌细胞类型的转变^[29],还能调控细胞有丝分裂中纺锤体的功能进而影响乳腺癌的发生发展过程^[30]。也有报道, SUMO 化修饰的乳腺癌 1 号基因编码蛋白(breast cancer suppressor protein, BRCA1)调控 DNA 损伤反应,而 *BRCA1* 的突变与高风险的乳腺癌有极大的相关性^[31]。对癌症中 SUMO 化修饰作用的研究将成为癌症治疗的新方向。雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性乳腺癌患者的 ROS 明显高于 ER 阴性患者,并且在 ER 阳性患者中,ROS 与肿瘤大小和组织转移相关^[32],因此我们选择 ER 阳性的 MCF7 细胞系作为研究对象,探索 SIRT3 去 SUMO 化修饰对乳腺癌细胞增殖和耐药性的影响。为了研究 SIRT3 去 SUMO 化修饰对乳腺癌的影响,我们在 SIRT3KO MCF7 细胞的基础上,构建了 SIRT3 WT 和 SIRT3 K288R 的稳转细胞株。我们发现在 SIRT3 的

SUMO 化修饰位点突变的乳腺癌细胞增殖受到了抑制,这与已报道的 SIRT3 SUMO 化修饰位点突变增强氧化磷酸化和脂肪酸氧化代谢,糖酵解受抑是能够相互印证的。

在正常细胞中, SIRT3 维持线粒体代谢、增强抗氧化系统,保护细胞免受自身凋亡。而在肿瘤细胞中, SIRT3 能通过产生较低水平的 ROS,减少细胞凋亡和自噬,提高细胞活性,从而能够抵抗化疗诱导的氧化应激,使其获得较高的细胞存活率。有研究表明,通过特异 siRNA 沉默 SIRT3 在 MCF7 和 T47D 细胞系中的表达,能够增加化疗药物诱导的氧化应激,从而提高乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性,患者的生存曲线也显示高 SIRT3 表达的乳腺癌预后较差^[11]。通过对 SIRT3 WT 和 SIRT3 K288R 细胞株给予不同浓度的阿霉素,我们发现 SIRT3 K288R 细胞株均比 SIRT3 WT 细胞株耐药,而随着阿霉素处理浓度的逐渐增加, SIRT3 WT 的活性由明显高于 SIRT3 K288R 转变成明显低于 SIRT3 K288R,表明 SIRT3 K288R 的耐药性高于 SIRT3 WT。SIRT3 SUMO 化位点突变性细胞系与野生型对比,在使用不同浓度的阿霉素处理不同的时间后, SIRT3 K288R 的 IC₅₀ 在 3 个时间点(24 h、48 h 和 72 h)均高于 Vector 和 SIRT3 WT,进一步证明 SIRT3 的去 SUMO 化修饰能够显著增强肿瘤细胞对阿霉素的耐药性。这些结果都表明, SIRT3 的 SUMO 化修饰能够改变肿瘤细胞的生长和代谢状态。该结论可为治疗乳腺癌的潜在靶点提供更多的理论方向。

参·考·文·献

- [1] Pavlova NN, Thompson CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism[J]. Cell Metab, 2016, 23(1): 27-47.
- [2] Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, et al. Cancer metabolism: a therapeutic perspective[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2017, 14(1): 11-31.
- [3] Leone RD, Powell JD. Metabolism of immune cells in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2020, 20(9): 516-531.
- [4] Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and cancer[J]. Cell, 2016, 166(3): 555-566.
- [5] Wang YP, Sharda A, Xu SN, et al. Malic enzyme 2 connects the Krebs cycle intermediate fumarate to mitochondrial biogenesis[J]. Cell Metab, 2021, 33(5): 1027-1041. e8.
- [6] Krug K, Jaehnig EJ, Satpathy S, et al. Proteogenomic landscape of breast cancer tumorigenesis and targeted therapy[J]. Cell, 2020, 183(5): 1436-1456. e31.
- [7] Carrico C, Meyer JG, He W, et al. The mitochondrial acylome emerges: proteomics, regulation by sirtuins, and metabolic and disease implications[J]. Cell Metab, 2018, 27(3): 497-512.
- [8] Hebert AS, Dittenhafer-Reed KE, Yu W, et al. Calorie restriction and SIRT3 trigger global reprogramming of the mitochondrial protein acetylome[J]. Mol Cell, 2013, 49(1): 186-199.
- [9] Inuzuka H, Gao D, Finley LW, et al. Acetylation-dependent regulation of Skp2 function[J]. Cell, 2012, 150(1): 179-193.
- [10] Dong XC, Jing LM, Wang WX, et al. Down-regulation of SIRT3 promotes ovarian carcinoma metastasis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 475(3): 245-250.
- [11] Torrens-Mas M, Pons DG, Sastre-Serra J, et al. SIRT3 silencing sensitizes breast cancer cells to cytotoxic treatments through an increment in ROS production[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(2): 397-406.
- [12] Bergaggio E, Riganti C, Garaffo G, et al. IDH2 inhibition enhances proteasome inhibitor responsiveness in hematological malignancies[J]. Blood, 2019, 133(2): 156-167.
- [13] Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, et al. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress[J]. Cancer Cell, 2010, 17(1): 41-52.
- [14] Li M, Chiang YL, Lyssiotis CA, et al. Non-oncogene addiction to SIRT3 plays a critical role in lymphomagenesis[J]. Cancer Cell, 2019, 35(6): 916-931. e9.
- [15] Cheng J, Bawa T, Lee P, et al. Role of desumoylation in the development of prostate cancer[J]. Neoplasia, 2006, 8(8): 667-676.
- [16] He J, Cheng J, Wang T. SUMOylation-mediated response to mitochondrial stress[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(16): 5657.
- [17] Seeler JS, Dejean A. SUMO and the robustness of cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2017, 17(3): 184-197.
- [18] Wang T, Cao Y, Zheng Q, et al. SENP1-Sirt3 signaling controls mitochondrial protein acetylation and metabolism[J]. Mol Cell, 2019, 75(4): 823-834. e5.
- [19] He J, Shangguan X, Zhou W, et al. Glucose limitation activates AMPK coupled SENP1-Sirt3 signalling in mitochondria for T cell memory development[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4371.

- [20] DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, et al. Breast cancer statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(6): 438-451.
- [21] Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, et al. Breast cancer[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 66.
- [22] Jabbour E, Ravandi F, Kebriaei P, et al. Salvage chemoimmunotherapy with inotuzumab ozogamicin combined with mini-hyper-CVD for patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: a phase 2 clinical trial[J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(2): 230-234.
- [23] Horwitz S, O'Connor OA, Pro B, et al. Brentuximab vedotin with chemotherapy for CD30-positive peripheral T-cell lymphoma (ECHELON-2): a global, double-blind, randomised, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2019, 393(10168): 229-240.
- [24] Cesarman E, Damania B, Krown SE, et al. Kaposi sarcoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2019, 5(1): 9.
- [25] Basho RK, Gilcrease M, Murthy RK, et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway for the treatment of mesenchymal triple-negative breast cancer: evidence from a phase 1 trial of mTOR inhibition in combination with liposomal doxorubicin and bevacizumab[J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(4): 509-515.
- [26] Cai L, Tu J, Song L, et al. Proteome-wide mapping of endogenous SUMOylation sites in mouse testis[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2017, 16(5): 717-727.
- [27] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation[J]. *Science*, 2009, 324(5930): 1029-1033.
- [28] Guri Y, Colombi M, Dazert E, et al. mTORC2 promotes tumorigenesis via lipid synthesis[J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(6): 807-823. e12.
- [29] Bogachek MV, Chen Y, Kulak MV, et al. Sumoylation pathway is required to maintain the basal breast cancer subtype[J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(6): 748-761.
- [30] Kessler JD, Kahle KT, Sun T, et al. A SUMOylation-dependent transcriptional subprogram is required for Myc-driven tumorigenesis[J]. *Science*, 2012, 335(6066): 348-353.
- [31] Morris JR, Boutell C, Keppler M, et al. The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress[J]. *Nature*, 2009, 462(7275): 886-890.
- [32] Madeddu C, Gramignano G, Floris C, et al. Role of inflammation and oxidative stress in post-menopausal oestrogen-dependent breast cancer[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(12): 2519-2529.

[收稿日期] 2021-03-04

[本文编辑] 瞿麟平

“双一流”暨高水平地方高校建设项目

一流学科——口腔医学

优化学科布局，坚持有所为、有所不为的理念，强化优势专业、凸显学科特色；建立起以国际战略科学家组成的领军人才为主导、相关人才为补充和配套的学科人才集群；加大科研投入，扩充学科体量，提升科研水平；改革学科建设成效考核方式，创造良好创新氛围。部分优势学科如口腔颌面外科、口腔修复科等进入世界一流学科行列。

