

下调 SIRT6 对肝癌干细胞干性维持的抑制作用

刘清桂, 苏静, 陈佳佳, 陈费, 杨桃, 向桂齐阳, 王敏君
(海军军医大学(第二军医大学), 上海 200433)

摘要: [目的] 探讨抑制 SIRT6 表达在肝癌干细胞干性维持中的作用及潜在机制。[方法] 在不同肝癌细胞系中构建肝癌干细胞模型(Lv-Pnanog-GFP), 利用流式细胞术分选出不同来源的肝癌干细胞, 采用蛋白免疫印迹(Western blot, WB)和免疫细胞化学(immunocytochemistry, ICC)技术检测 SIRT6 蛋白在肝癌干细胞中的表达水平; 构建 SIRT6 慢病毒短发卡 RNA 感染载体(shSIRT6)感染肝癌干细胞, 采用 WB 技术检测 shSIRT6 的干扰效率; 采用实时定量反转录聚合酶链反应(real-time PCR)检测抑制 SIRT6 后肝癌干细胞的干性基因(*Nanog*、*OCT4*、*CD13*、*SOX2*、*EpCAM*、*CD44*) mRNA 的表达水平, ICC 方法检测 EpCAM 蛋白的表达水平; 采用 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(EdU)试剂盒和细胞增殖活力(CCK8)试剂盒检测抑制 SIRT6 表达后肝癌干细胞的增殖能力; 采用克隆形成和成球实验检测抑制 SIRT6 后肝癌干细胞的自我更新能力; 利用衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)试剂盒检测抑制 SIRT6 后肝癌干细胞的衰老水平。[结果] WB 和 ICC 检测结果显示, *Nanog* 阳性肝癌干细胞中 SIRT6 表达水平明显高于 *Nanog* 阴性肝癌细胞; real-time PCR 检测结果显示, 抑制 SIRT6 后, 肝癌干细胞的干性基因(*Nanog*、*OCT4*、*CD13*、*SOX2*、*EpCAM*、*CD44*) mRNA 表达水平降低。与 real-time PCR 结果一致, ICC 结果也表明, 抑制 SIRT6 后, 干性标志物 EpCAM 的蛋白表达水平降低($P < 0.01$)。细胞增殖检测结果进一步显示, 抑制 SIRT6, 肝癌干细胞的增殖水平降低($P < 0.05$)。克隆形成实验和细胞成球实验结果显示, 抑制 SIRT6 导致肝癌干细胞的克隆形成能力和成球能力一致性降低($P < 0.01$)。SA- β -Gal 活性检测结果显示, 抑制 SIRT6 后, 肝癌干细胞的 SA- β -Gal 活性显著提高($P < 0.01$)。[结论] 肝癌干细胞高表达 SIRT6, 通过抑制 SIRT6 表达可诱导肝癌干细胞发生衰老, 导致其干性标志物表达水平下降, 增殖能力降低, 肝癌干细胞克隆形成和成球能力下降。

关键词: 组蛋白去乙酰化酶; SIRT6; 肝癌干细胞; *Nanog*; 干细胞特性; 衰老

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2020)07-0544-10

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2020.07.A012

Effect of SIRT6 Silencing on Stemness Maintaining of Hepatic Cancer Stem Cells

LIU Qing-gui, SU Jing, CHEN Jia-jia, CHEN Fei, YANG Tao, XIANG Gui-qiyang, WANG Min-jun

(Naval Medical University(Second Military Medical University), Shanghai 200433, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the role of sirtuins6 (SIRT6) on the stemness maintaining of hepatic cancer stem cells. [Methods] Liver cancer stem cells (LCSCs) in human hepatocellular carcinoma cell lines were identified with Lv-Pnanog-GFP model. The expression of SIRT6 in purified LCSCs was detected by Western blot and immunocytochemistry method. Lentivirus of SIRT6-specific siRNA was packaged and transfected into LCSCs, the expression of SIRT6 in LCSCs was detected by Western blotting. Real-time PCR was used to detect mRNA expression of hepatic cancer stem cells stemness markers (*Nanog*, *OCT4*, *CD13*, *SOX2*, *EpCAM* and *CD44*) in LCSCs, immunocytochemistry method was used to detect the protein expression of EpCAM. The proliferation ability of LCSCs was investigated by EdU cell proliferation kit and cell counting kit-8, and the self-renewal ability of LCSCs was investigated by colony formation assay and sphere formation assay. The SA- β -Gal assay was used to evaluate the senescence of LCSCs. [Results] The expression of SIRT6 in LCSCs was significantly higher than that in non-LCSCs. Real-time PCR revealed that the expression of genes involved in stemness (*Nanog*, *OCT4*, *CD13*, *SOX2*, *EpCAM*, *CD44*) was significantly decreased when SIRT6 was knocked down by shRNA. Immunocytochemistry displayed that the EpCAM protein was downregulated compared with control. In addition, EdU incorporation assay and CCK8 assay revealed that the proliferating LCSCs were significantly decreased in SIRT6 silencing

收稿日期: 2020-04-17; 修回日期: 2020-05-30

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31601101); 全军医学科技青年培育计划项目(17QN11)

刘清桂、苏静为共同第一作者

通信作者: 王敏君, E-mail: minjun.2009@163.com

($P<0.05$). Consistently, SIRT6 knockdown inhibited the self-renewal ability of LCSCs, the rate of colony formation and the percentage of sphere formation was markedly decreased compared to shScrambled control ($P<0.01$). Moreover, the SA- β -Gal activity was markedly enhanced ($P<0.01$). [Conclusion] SIRT6 is upregulated in LCSCs. SIRT6 knockdown can suppress the expression of stemness-related makers, inhibit the growth of LCSCs and downregulate self-renewal ability by inducing cellular senescence.

Key words: histone deacetylase; SIRT6; hepatic cancer stem cells; Nanog; stemness; senescence

肝癌是全球发病率和致死率位居前列的恶性肿瘤之一,而手术切除、放化疗等常见肿瘤治疗方式无法快速有效地治愈肝癌^[1-2]。究其原因在于高异质性的肝癌细胞中存在一群肝癌干细胞(liver carcinoma stem cells, LCSCs),其表面携带特异性抗原,具有分化为普通肝癌细胞和自我更新能力的干性特征,且能抵抗放化疗^[3-4]。因此,靶向肝癌干细胞的新疗法是实现肝癌长期稳定缓解或治愈的有效策略^[5-6]。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)依赖的组蛋白去乙酰化酶 SIRT6(NAD-dependent deacetylase sirtuin-6)具有维持基因组稳定、调节糖脂代谢、炎症反应、细胞凋亡和细胞衰老等多种生物学反应和功能^[7-10]。SIRT6 与肿瘤的发生发展关系密切,在乳腺癌、子宫癌、肝癌、肺癌、皮肤癌等不同癌细胞的各个阶段发挥不同的病理作用^[11]。SIRT6 在肿瘤中扮演双重角色。其一,可作为抑癌因子抑制癌细胞的生长,促进癌细胞发生凋亡,通过信号调节作用来抑制肿瘤的生成^[12-14];其二,可作为潜在的致癌基因,部分癌组织中 SIRT6 表达升高,敲除 SIRT6 能够实现癌细胞生长抑制,降低癌细胞活性,提高细胞凋亡和 DNA 损伤水平^[15-17]。且报道指出 SIRT6 激动剂 MDL-800 能够特异性激活 SIRT6 乙酰化酶活性,阻断细胞周期抑制肝癌细胞增殖,实现体内特异性肿瘤生长抑制作用^[18]。最新研究也显示 SIRT6 活性与物种寿命相关,在长寿物种中 SIRT6 活性增强,其 DNA 修复更具有效性, SIRT6 可作为延缓癌症和衰老相关疾病治疗的有效靶点^[19]。然而,长寿基因 SIRT6 是否参与肝癌干细胞的寿命和功能调节未从得知。因此,本研究通过降低 SIRT6 的表达来研究 SIRT6 在肝癌干细胞干性维持中的作用,初步探寻其潜在的机制,以期为临床上治疗肝癌提供新思路 and 理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞系、细胞培养和细胞分选

细胞系、细胞培养:人肝癌细胞系 HepG2、SK-HEP1 和 SMMC-7721 购自上海细胞库,3 种细胞系均在 37℃、5%CO₂ 的培养箱中,用添加 10%胎牛血清、青霉素(100U/ml)和链霉素(1μg/ml)的 DMEM 培养基培养。

细胞分选:将感染带有 GFP 报告基因的病毒细胞用 PBS 进行洗涤,洗涤后胰酶消化成单细胞,离心收集细胞沉淀。Staining Buffer 重悬洗涤细胞,进而过滤转移至无菌上样管,上机分选,分选出的阳性和阴性细胞,分别收集到含有培养液的离心管中,转移至新的培养皿中继续培养。

1.2 慢病毒干扰感染载体构建、慢病毒包装和细胞感染

慢病毒干扰感染载体构建:克隆载体 pLKO.1 双酶切(AgeI 和 EcoRI)得到 7kb 和 1.9kb 两条条带,根据 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(生工)回收目的片段(7kb);设计 shRNA 引物序列,引物溶解后进行退火处理(95℃,4min);利用 T4 DNA 连接酶将 pLKO.1(7kb)与退火引物进行连接,将连接产物转化后挑取单克隆菌落至 LB 培养液中扩增培养,质粒小抽试剂盒(生工)抽取扩增产物得到目的质粒,对质粒进一步酶切和测序鉴定。

慢病毒包装:复苏培养工具细胞 293T,选取生长状态良好,密度约为 70%~80%的细胞进行病毒包装。取 1/10 培养体积的无血清 MEM 培养液于无菌试管中,再分别加入 8μg 载体质粒、4μg 包装质粒和 2μg 外壳质粒,轻轻混匀后,加入 42μg PEI,混匀静置 15min,混合液逐滴加入 293T 细胞培养皿中,培养箱中培养 8h 后更换新鲜培养液,培养 48h 后收集

含有病毒的培养液,离心过滤后,病毒液分装保存。

细胞感染:培养待感染细胞(密度约为40%),感染前更换新鲜培养液,在加入适量病毒悬液混匀,感染8~12h,吸取旧培养液,PBS洗涤后加入新鲜培养液,继续培养。可重复感染1次,提高感染效率。

1.3 细胞增殖检测实验

生长曲线测定:根据CCK8(cell counting kit-8,日本同仁)细胞增殖检测试剂盒进行操作。将100 μ l细胞悬液(5×10^3)种入96孔板中,接种培养4h待细胞贴壁后,更换培养基血清饥饿处理8h,重新加入新鲜含血清培养基。在12、24和48h分别加入10 μ l CCK8试剂培养2h后用酶标仪测定OD值(450 nm)。

Edu摄入实验:根据Click-iT Plus EdU Imaging Kits(赛默飞)染色步骤检测细胞增殖能力。选择生长状态良好(培养24h)的细胞加入10 μ mol/L EdU-solution溶液进行标记,培养2h后,弃除培养液,PBS洗涤后加入PFA固定细胞,固定后加入0.3% TritonX-100破膜处理,PBST洗涤细胞,利用5%BSA封闭20min,直接加入Click-iT Plus reaction cocktail染色液,避光条件下室温染色30min,弃除染色液PBS洗去多余染液,加入10 μ g/ml Hoechst33342进行细胞核复染,甘油封片,在荧光显微镜下进行观察。

1.4 克隆形成和成球实验

克隆形成实验:6孔板中加入2ml培养液于培养箱中预热,再分别接种合适密度细胞数(2000个/孔),于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱培养并定期观察细胞,期间3d更换1次培养液,培养时间为15d。培养完成后,4%PFA固定细胞,并利用结晶紫对细胞进行染色。克隆形成率(%)=每孔克隆数目/接种细胞总数 $\times$ 100%(单克隆 >1 mm)。

成球实验:成球培养基为DMEM/F12+1%甲基纤维素+1 $\times$ B-27+1 $\times$ N2+20ng/ml hEGF+20ng/ml h β FGF+10ng/ml hHGF。采用低吸附六孔板进行细胞培养,培养液预热后接种适宜密度的细胞,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的培养箱中培养,定期观察细胞,3d补1次培养液,培养7d,显微镜下观察统计直径大于75 μ m的细胞球数。成球率=每孔细胞球总数/接种细胞总数 $\times$ 100%。

1.5 免疫细胞化学和衰老相关半乳糖苷酶染色

免疫细胞化学染色:弃去细胞培养液,4%PFA固定细胞后PBS洗涤3次,0.3%TritonX-100处理5min,PBST洗涤3次,封闭液封闭20min。加入一抗

4 $^{\circ}$ C过夜,PBST洗涤3次,加入带荧光的二抗,37 $^{\circ}$ C孵育30min,PBST洗涤3次,加入含DAPI的抗荧光衰减封片剂,封片,荧光显微镜下拍照观察后统计分析。

衰老相关半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色:根据染色试剂盒(碧云天)说明书进行染色,细胞固定后,加入新鲜染色工作液,调节pH为6.0,37 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日洗掉染色液后,核固红复染,观察胞质内有墨绿色沉淀为阳性细胞。

1.6 蛋白免疫印迹检测和实时定量反转录聚合酶链反应

蛋白免疫印迹检测:选取生长状态良好,密度为90%的细胞弃除培养基并PBS清洗后,用细胞刮刮取细胞,低温离心收集细胞,加入细胞裂解液RIPA和蛋白酶抑制剂,冰上裂解30min,4 $^{\circ}$ C,13 000r/min离心5min,收集上层总蛋白溶液,取微量蛋白进行定量分析,剩余加入SDS上样缓冲液变性处理。分别制备10%分离胶、浓缩胶后,进行加样电泳、转膜、封闭,再分别孵育一抗、二抗,加入ECL发光液后在曝光仪器中进行显影观察和分析。

实时定量反转录聚合酶链反应:采用Trizol法抽提细胞总RNA,测RNA浓度和质量,选择高质量RNA进行反转录获取cDNA,反转录条件为42 $^{\circ}$ C 30min,37 $^{\circ}$ C 1h。以cDNA为模板进行扩增,扩增条件为:95 $^{\circ}$ C预变性,10min,95 $^{\circ}$ C变性10s,55 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C退火20s,72 $^{\circ}$ C延伸20s,40个循环后,72 $^{\circ}$ C充分延伸5min。采用2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对表达量的统计分析。

1.7 统计学处理

采用Graphpad Prism6.0统计软件进行数据分析,所有实验均重复3次以上,实验数据采用平均值 $\pm$ 标准差表示。统计分析两两比较采用t检验进行统计学分析,P小于0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肝癌干细胞中SIRT6的表达

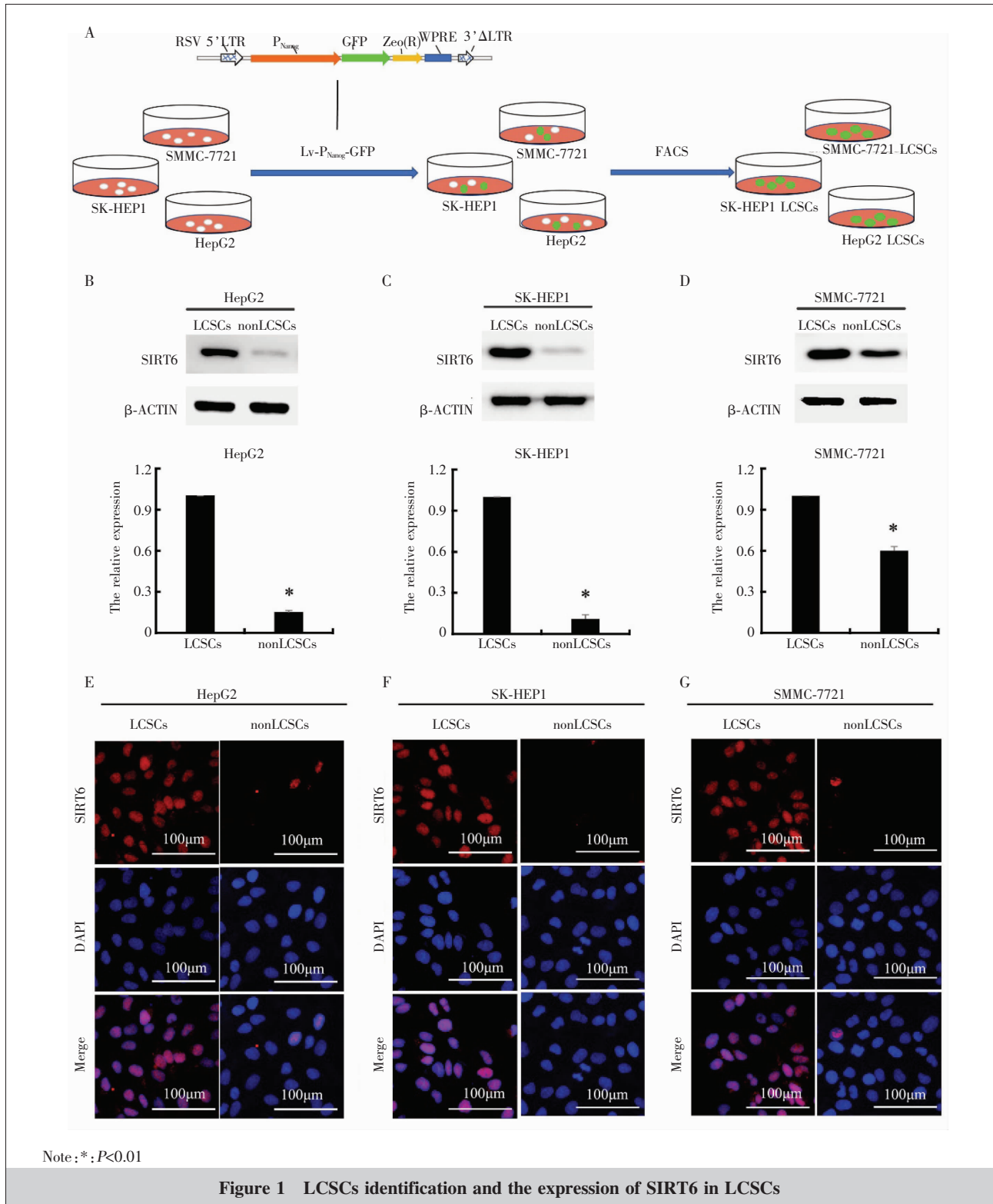
利用Nanog启动子调控的绿色荧光蛋白报告系统(Figure 1A),从人肝癌细胞系HepG2、SK-HEP1和SMMC-7721中分别筛选出Nanog阳性的肝癌干细胞(LCSCs)和Nanog阴性非肝癌干细胞(non-LCSCs)。如图1B~1G(Figure 1B~1G)所示,3种人肝癌细胞系来源LCSCs和non-LCSCs的蛋白免疫印迹

和免疫细胞化学结果一致显示, 相比较于 non-LC-SCs, LCSCs 中 SIRT6 表达水平明显提高 ($P<0.01$)。

2.2 慢病毒感染载体 shSIRT6 构建及验证

为了进一步理解 SIRT6 在 LCSCs 中作用, 我们

选择感染效率高可长期稳定表达的慢病毒为载体, 构建了 4 条 shRNA (shSIRT6-1、shSIRT6-2、shSIRT6-3、shScrambled)。利用 4 条 shRNA 分别对 SMMC-7721、SK-HEP1 和 HepG2 来源 LCSCs 进行感染。蛋

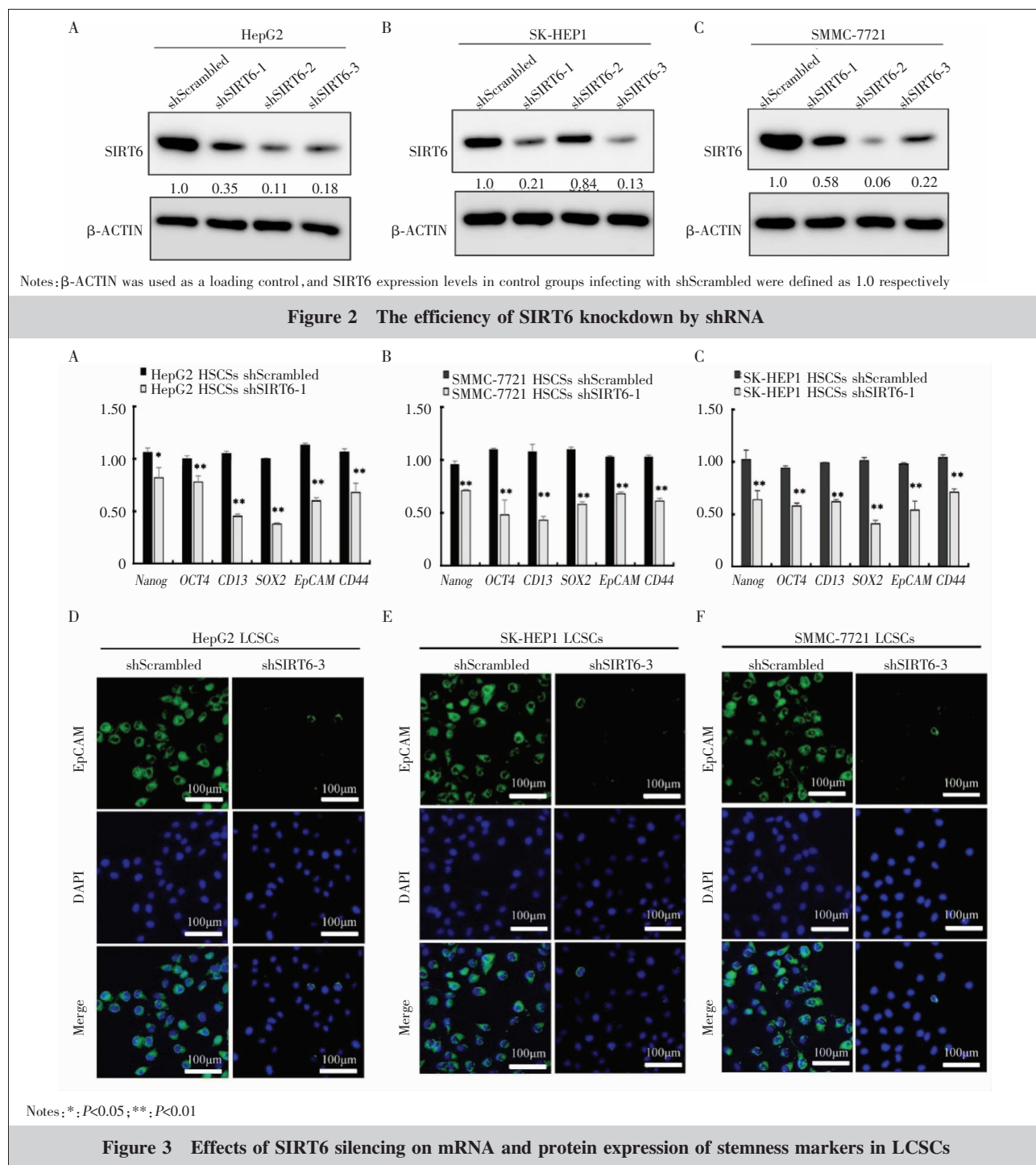


白免疫印迹结果显示,相比于对照组(shScrambled), shSIRT6-1 对 3 种来源的 LCSCs 的感染效率较高, 干扰后 SIRT6 蛋白的表达水平小于对照组的 1/4 (Figure 2)。因此选择shSIRT6-3 进行后续实验。

2.3 抑制 SIRT6 对肝癌干细胞的干性标志物表达的影响

为了探究 SIRT6 对肝癌干细胞干性标志物表

达的影响,肝癌干细胞敲减 SIRT6 后,检测干性标志物的表达水平。mRNA 表达水平检测结果显示,抑制 SIRT6 后 LCSCs 干性标志物的 RNA 表达水平显著下降 ($P<0.05$), 包括 *Nanog*、*OCT4*、*CD13*、*SOX2*、*EpCAM*、*CD44*(Figure 3A~3C)。进一步利用细胞化学染色结果也显示,抑制 SIRT6 后,LCSCs 干性标志蛋白 EpCAM 的阳性率也明显降低 ($P<0.01$)(Figure 3D~



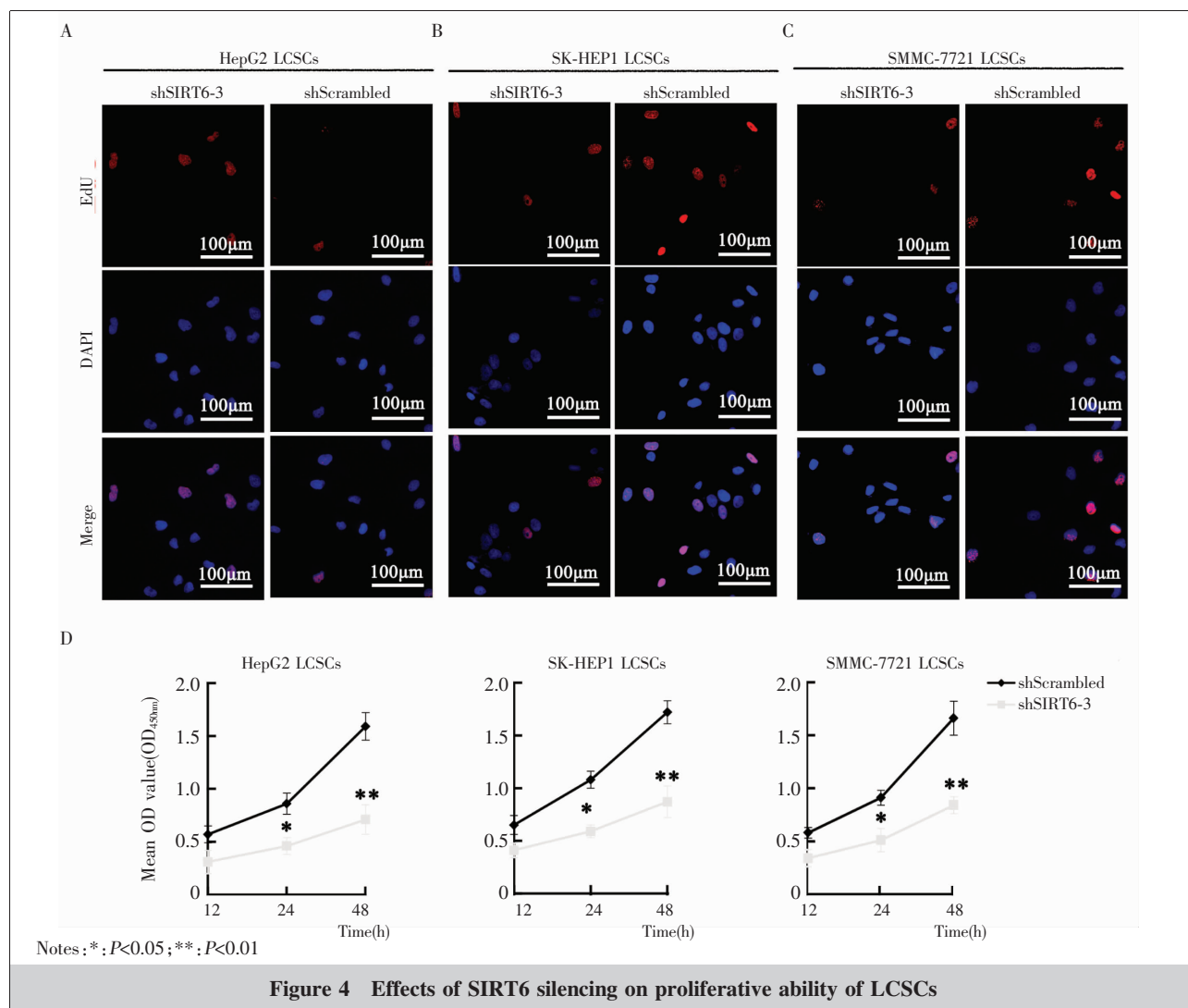
3F)。以上结果一致反映,抑制 SIRT6 后会导致 LCSCs 的干性标志物表达水平下降。

2.4 抑制 SIRT6 对肝癌干细胞增殖能力的影响

EdU 染色结果显示,抑制 SIRT6 表达后 HepG2 来源的 LCSEdU 阳性细胞比例从 $(38.46\% \pm 5.27\%)$ 降低到 $(18.19\% \pm 2.53\%)$,SK-HEP1 来源的 LCSC 阳性率从 $(50.02\% \pm 6.21\%)$ 降低到 $(27.24\% \pm 4.68\%)$,SMMC-7721 来源 LCSCs 的阳性率也从 $(44.85\% \pm 2.36\%)$ 降低到 $(25.14\% \pm 2.93\%)$ 。抑制 SIRT6 表达后,EdU 阳性率明显降低($P < 0.01$),表明抑制 SIRT6 可减少 LCSCs 中增殖细胞的数量,降低 LCSCs 的增殖水平(Figure 4A~4C)。CCK8 细胞增殖活性测定结果进一步证实,抑制 SIRT6 表达后,肝癌干细胞的增殖作用明显降低($P < 0.05$)(Figure 4D)。由此可见,下调 SIRT6 后对肝癌干细胞的增殖产生了抑制作用。

2.5 抑制 SIRT6 对肝癌干细胞自我更新能力的影响

克隆形成实验结果显示,抑制 SIRT6 后,LCSCs 的克隆形成率均明显降低,克隆体积也明显减小($P < 0.01$)(Figure 5A~5C)。HepG2 来源的 LCSCs 的克隆形成率高达 $(43.44\% \pm 1.48\%)$,抑制 SIRT6 后克隆形成率降低为 $(14.19\% \pm 1.92\%)$ 。类似的,SK-HEP1 和 SMMC-7721 来源 LCSCs 在 SIRT6 抑制之后,克隆形成率降低约 1/2(SK-HEP1: $30.61\% \pm 2.57\%$ vs $14.28\% \pm 1.92\%$;SMMC-7721: $33.67\% \pm 0.59\%$ vs $16.33\% \pm 2.73\%$)。而且悬浮成球结果也显示,抑制 SIRT6 后 HepG2 来源的 LCSCs 的成球率由 $(9.18\% \pm 0.40\%)$ 减低为 $(3.06\% \pm 0.67\%)$,SK-HEP1 和 SMMC-7721 来源 LCSCs 也分别由 $(4.08\% \pm 1.14\%)$ 和 $(15.30\% \pm 1.27\%)$ 减低为 $(0.89\% \pm 0.11\%)$ 和 $(4.08\% \pm 0.34\%)$ (Figure 5D~5E)。以上结果证实抑制 SIRT6 后肝癌干细胞的克隆形



成能力和成球能力都明显降低,抑制 SIRT6 可以实现 LCSCs 自我更新能力的抑制作用。

2.6 抑制 SIRT6 表达肝癌干细胞衰老水平的改变

SA- β -Gal 染色结果显示,抑制 SIRT6 后 LCSCs 的 SA- β -Gal 活性明显提高 ($P<0.01$)。在 HepG2 来源的 LCSCs 中,降低 SIRT6 后 SA- β -Gal 阳性率由 ($4.08\%\pm 1.12\%$) 提高到 ($48.97\%\pm 3.98\%$);在 SK-HEP1 来源的 LCSCs 中降低 SIRT6 后 SA- β -Gal 阳性率由 ($2.04\%\pm 0.80\%$) 提高到 ($25.51\%\pm 1.56\%$),在 SMMC-7721 来源的 LCSCs 中降低 SIRT6 后 SA- β -Gal 阳性率由 ($1.02\%\pm 0.46\%$) 提高到 ($11.22\%\pm 1.02\%$) (Figure 6)。且细胞形态观察结果也显示,降低 SIRT6 后 LCSCs 的体积变大,细胞形态表现出衰老细胞的扁平特征。以上结果证实抑制 SIRT6 表达导致肝癌干细胞干性标志物表达下降,增殖能力和自我更新能

力降低的主要因素在于 LCSCs 启动了衰老反应。

3 讨论

肝癌干细胞是肿瘤中具有干细胞特性的细胞亚群。这群细胞是肿瘤中的“顽固分子”,其对药物以及放化疗的敏感性低,且具有极高的致瘤性,是肿瘤复发、侵袭迁移的主要危险因素^[3]。Nanog 是肝癌干细胞的重要转录因子。研究报告显示,高表达 Nanog 与肝癌患者的不良预后相关,而且 Nanog 启动子调控的绿色荧光蛋白报告系统筛选的 Nanog 阳性肝癌干细胞具有干性特征,体外及体内条件下均能表现出干细胞特有的自我更新和分化潜能^[20-21]。随着癌细胞概念的提出,利用 Nanog 筛选肝癌干细胞已经成为肝癌干细胞研究的经典途径之一。

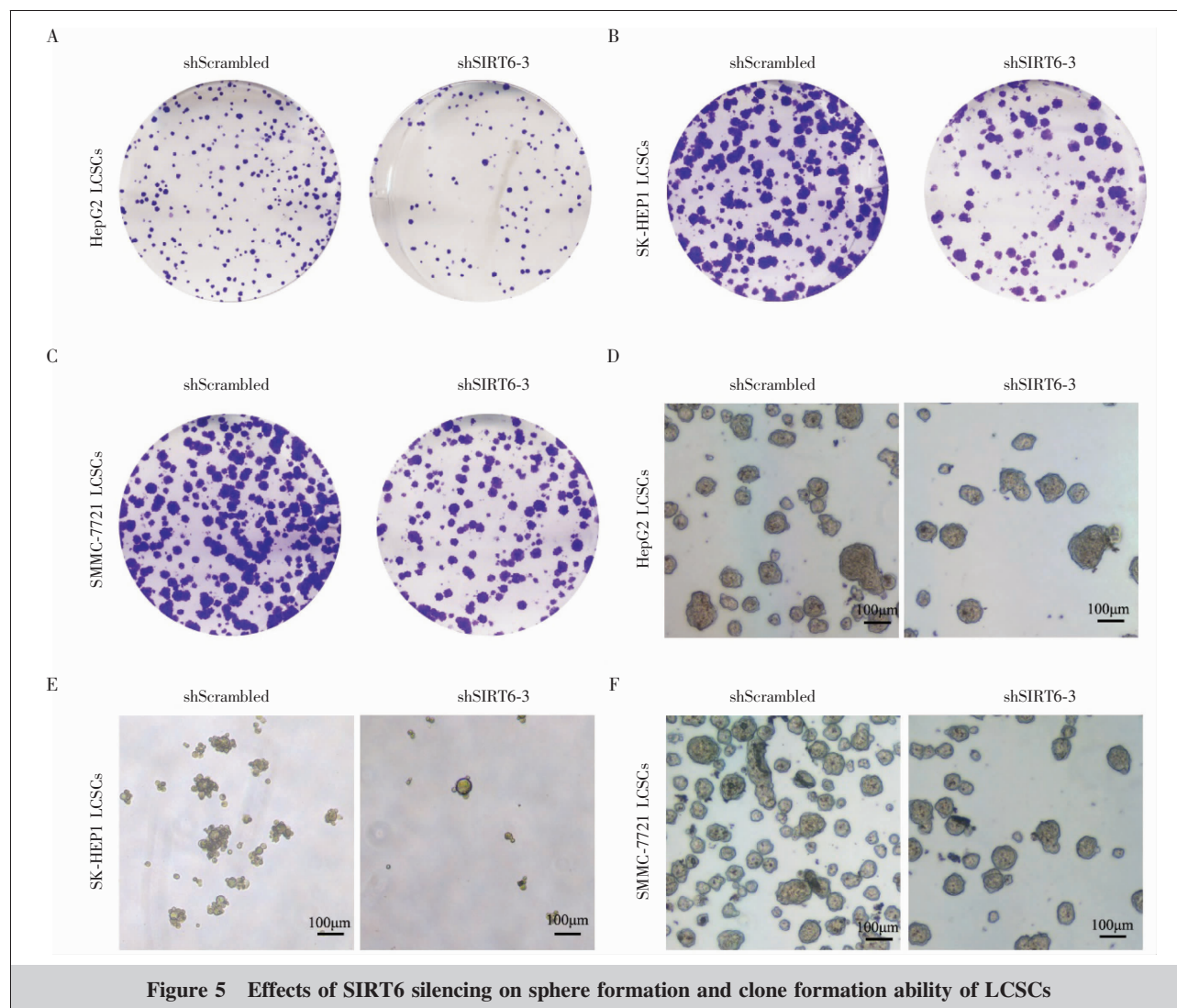
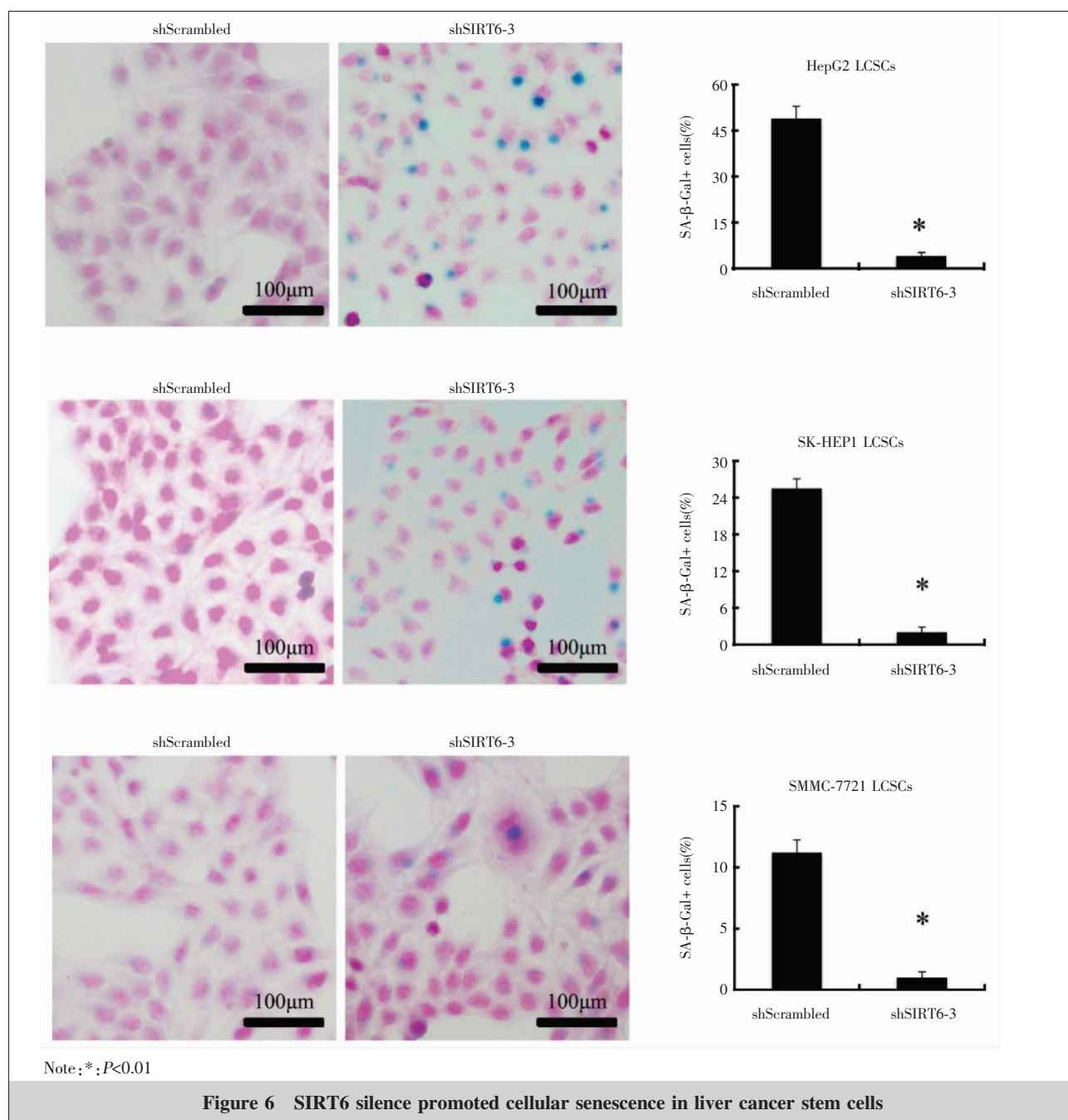


Figure 5 Effects of SIRT6 silencing on sphere formation and clone formation ability of LCSCs

SIRT6 属于组蛋白去乙酰化酶蛋白家族成员,于细胞核内表达,在肝癌、神经退化等老年相关疾病中扮演保护角色,是抗衰老和治疗衰老疾病研究的重要靶点^[22-23]。前期研究显示肝癌细胞中降低 SIRT6 表达,可以导致细胞发生 DNA 损伤,诱导细胞衰老从而降低肿瘤的生长速度^[24]。本研究进一步发现肝癌干细胞高表达 SIRT6,且 SIRT6 的表达是肝癌干细胞干性维持的重要调节因子。

肝癌干细胞具有高表达干性相关基因的特征,

主要有 *Nanog*、*CD13*、*CD44*、*EpCAM* 等。基因表达和蛋白水平检测结果显示,抑制 SIRT6 的表达降低了肝癌干细胞干性标志物的表达。肝癌干细胞作为恶性肿瘤难以治疗的关键原因在于肝癌干细胞表现出强大的增殖能力,可以快速增殖分化产生大量的肝癌细胞。相关报道指出,SIRT6 具有促进肿瘤生长的作用,参与细胞增殖和细胞凋亡的调控^[17]。肝癌细胞中通过高表达醌氧化还原酶 1 可以防止 SIRT6 蛋白的泛素化降解,从而促进肝癌细胞发生增殖^[25]。



降低 SIRT6 的表达,可以增加肝癌细胞对放化疗的敏感性,降低肝癌细胞的活力,增强肝癌细胞的凋亡反应^[26]。细胞增殖检测结果显示抑制 SIRT6 后,肝癌干细胞的增殖能力明显降低,进一步提示 SIRT6 可作为肝癌干细胞治疗的潜在靶点。此外,肝癌干细胞的自我更新能力也是恶性肿瘤难于治愈的关键。通过经典的克隆形成实验和成球能力实验,我们发现干扰 SIRT6 的表达有利于肝癌干细胞自我更新能力的抑制。

SIRT6 被视为“长寿基因”,在 DNA 损伤修复和维持端粒长度中起积极作用。SIRT6 敲除的转基因小鼠基因组稳定性下降,出现早衰症状,表现出功能退化和代谢失常等老化特征^[27]。反之,SIRT6 过表达具有延长小鼠寿命的作用^[28]。此外,研究显示寿命越长的物种,其 SIRT6 的活性越强,DNA 损伤修复能力越好^[19]。通过在低 SIRT6 表达水平的衰老髓核细胞(nucleus pulposus cells)中过表达 SIRT6,可以激活髓核细胞的自噬反应,抑制细胞衰老和凋亡,减弱老年个体的椎间盘退化病症^[29]。本研究通过干扰 SIRT6 表达,发现肝癌干细胞在低表达 SIRT6 的条件下,可自发启动衰老反应。根据研究报道显示利用激活原癌基因、调节信号通路等途径诱导癌细胞衰老可以有效降低肿瘤的形成,实现肿瘤生长抑制,防止肿瘤的恶性转化。因此,我们猜测肝癌干细胞的衰老是其干性特征降低的潜在原因。

综上所述,我们认为 SIRT6 是肝癌干细胞干性维持的关键因子,抑制 SIRT6 表达可以诱导肝癌干细胞发生衰老,进而实现肝癌干细胞干性的抑制,减低肝癌细胞干性基因表达,限制肝癌细胞增殖,降低成球和克隆形成能力。随着对肝癌干细胞认识的不断深入,诱导肝癌干细胞衰老或可成为肝癌治疗的新方向。

参考文献:

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394–424.
- [2] Cai Z, Liu Q. Understanding the Global Cancer Statistics 2018: implications for cancer control [J]. *Sci China Life Sci*, 2019. [Epub ahead of print]
- [3] Wang N, Wang S, Li MY, et al. Cancer stem cells in hep-

atocellular carcinoma: an overview and promising therapeutic strategies[J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2018, 10: 1–25.

- [4] Tsui YM, Chan LK, Ng IO. Cancer stemness in hepatocellular carcinoma: mechanisms and translational potential[J]. *Br J Cancer*, 2020. [Epub ahead of print]
- [5] Prasad S, Ramachandran S, Gupta N, et al. Cancer cells stemness: a doorstep to targeted therapy [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(4): 165424.
- [6] Eun K, Ham SW, Kim H. Cancer stem cell heterogeneity: origin and new perspectives on CSC targeting [J]. *BMB Rep*, 2017, 50(3): 117–125.
- [7] Sebastian C, Zwaans BM, Silberman DM, et al. The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism[J]. *Cell*, 2012, 151(6): 1185–1199.
- [8] Michishita E, McCord RA, Berber E, et al. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin[J]. *Nature*, 2008, 452(7186): 492–496.
- [9] Li J, Yu D, Chen S, et al. Sirt6 opposes glycochenodeoxycholate-induced apoptosis of biliary epithelial cells through the AMPK/PGC-1 α pathway [J]. *Cell Biosci*, 2020, 10: 43.
- [10] Naiman S, Huynh FK, Gil R, et al. SIRT6 promotes hepatic beta-oxidation via activation of PPAR α [J]. *Cell Rep*, 2019, 29(12): 4127–4143.
- [11] de Ceu Teixeira M, Sanchez-Lopez E, Espina M, et al. Sirtuins and SIRT6 in Carcinogenesis and in Diet [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4945.
- [12] Zhang J, Liu H, Pan H, et al. The histone acetyltransferase hMOF suppresses hepatocellular carcinoma growth [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 452(3): 575–580.
- [13] Zhang ZG, Qin CY. Sirt6 suppresses hepatocellular carcinoma cell growth via inhibiting the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(3): 882–888.
- [14] Marquardt JU, Fischer K, Baus K, et al. Sirtuin-6-dependent genetic and epigenetic alterations are associated with poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma patients [J]. *Hepatology*, 2013, 58(3): 1054–1064.
- [15] Liu Y, Xie QR, Wang B, et al. Inhibition of SIRT6 in prostate cancer reduces cell viability and increases sensitivity to chemotherapeutics [J]. *Protein Cell*, 2013, 4(9): 702–710.
- [16] Ding Y, Wu S, Huo Y, et al. Inhibition of Sirt6 suppresses tumor growth by inducing G1/S phase arrest in renal cancer cells [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12 (7): 2526–2535.

- [17] Zhang C, Yu Y, Huang Q, et al. SIRT6 regulates the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma via the ERK1/2 signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(2):1575–1582.
- [18] Huang Z, Zhao J, Deng W, et al. Identification of a cellularly active SIRT6 allosteric activator [J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14(12):1118–1126.
- [19] Tian X, Firsanov D, Zhang Z, et al. SIRT6 is responsible for more efficient dna double-strand break repair in long-lived species[J]. *Cell*, 2019, 177(3):622–638.
- [20] Shan J, Shen J, Liu L, et al. Nanog regulates self-renewal of cancer stem cells through the insulin-like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2012, 56(3):1004–1014.
- [21] Luo Y, Yang Z, Su L, et al. Non-CSCs nourish CSCs through interleukin-17E-mediated activation of NF-kappaB and JAK/STAT3 signaling in human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2016, 375(2):390–399.
- [22] Tasselli L, Zheng W, Chua KF. SIRT6: novel mechanisms and links to aging and disease [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2017, 28(3):168–185.
- [23] Jesko H, Wencel P, Strosznajder RP, et al. Sirtuins and their roles in brain aging and neurodegenerative disorders [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(3):876–890.
- [24] Lee N, Ryu HG, Kwon JH, et al. SIRT6 depletion suppresses tumor growth by promoting cellular senescence induced by DNA damage in HCC [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11):e0165835.
- [25] Zhou HZ, Zeng HQ, Yuan D, et al. NQO1 potentiates apoptosis evasion and upregulates XIAP via inhibiting proteasome-mediated degradation SIRT6 in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Commun Signal*, 2019, 17(1):168.
- [26] Xia YQ, Hua RJ, Juan C, et al. SIRT6 depletion sensitizes human hepatoma cells to chemotherapeutics by downregulating MDR1 expression[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:194.
- [27] Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6[J]. *Cell*, 2006, 124(2):315–329.
- [28] Kawahara TL, Michishita E, Adler AS, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span [J]. *Cell*, 2009, 136(1):62–74.
- [29] Chen J, Xie JJ, Jin MY, et al. Sirt6 overexpression suppresses senescence and apoptosis of nucleus pulposus cells by inducing autophagy in a model of intervertebral disc degeneration[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2):56.

MRI 纹理特征定量分析用于 T_{2,3} 期直肠癌精准分期的初步研究

王斌杰¹, 周彦汝², 姜澳田¹, 王长福¹, 李长波¹, 杨晓慧³, 张 岚²

(1. 河南大学淮河医院, 河南大学医学影像研究所, 河南 开封 475000; 2. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000; 3. 河南大学数学与统计学院, 河南 开封 475000)

摘要: [目的] 探讨磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)纹理特征定量分析用于鉴别 T_{2,3} 期直肠癌异质性及精准分期的价值。[方法] 回顾性分析 15 例经手术病理证实 T₂ 及 T₃ 期病例, 且在术前两周内行直肠 MRI 高分辨率平扫, 每个病例选取显示病变较为满意 T₂WI 轴位图像的若干层面, 其中 T₂ 期 8 例选取 41 层, T₃ 期 7 例选取 40 层, 在 MaZda 软件中勾画病变感兴趣区 (region of interest, ROI) 提取病变纹理特征, 用该软件提供的纹理特征选择方法中的交互信息 (mutual information, MI)、Fisher 系数 (Fisher coefficient, Fisher)、分类错误概率联合平均相关系数 (classification error probability combined with average correlation coefficients, POE+ACC) 3 种方法联合 (Fisher+POE+ACC+MI, FPM) 对提取纹理进行降维处理得到 30 个纹理特征, 然后用该软件提供的纹理特征分类分析方法非线性分类分析 (nonlinear discriminant analysis, NDA) 对 81 个样本进行分类分析。采用组间与组内的平方和比例 (between-category to within-category sums of squares, BW) 和决策曲线分析法 (decision curve analysis, DCA) 筛选出 3 个最优特征, 并比较两者差异。利用二元 Logistic 回归及 ROC 曲线计算三者独立及联合的诊断效能。[结果] 81 层图像分类的准确性为 92.6%, 以 T₂ 期图像作为阴性组、T₃ 期图像作为阳性组计算敏感性为 93.0%, 特异性为 93.2%, 漏诊率为 7.0%, 误诊率为 6.8%。以 BW 及 DCA 方法筛选出两组最优特征相同, 前 3 个最优特征为 S(4, 0) 平方和 (sum of squares, SumOfSqs)、S(5, 0) SumOfSqs、S(3, 0) SumOfSqs, 效能排序有差异, 三者联合的敏感性和特异性分别为 85.0% 和 70.4%, 独立的敏感性和特异性分别为 80.0% 和 62.9%, 80.0% 和 62.9%, 72.5% 和 60.3%。三者联合及独立的敏感性和特异性均低于 30 个纹理 NDA 分类结果。[结论] T_{2,3} 期直肠癌异质性有明显差异, MRI 纹理特征定量分析能为 T_{2,3} 期直肠癌的术前精准分期提供可靠客观依据。

关键词: 直肠癌; 纹理特征分析; T 分期; 精准分期; 磁共振成像

中图分类号: R735.3⁷ 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2020)07-0554-07

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2020.07.A013

Preliminary Study on Precise Staging of Rectal Cancer Stage T_{2,3} Based on Quantitative Analysis of MRI Texture Features

WANG Bin-jie¹, ZHOU Yan-ru², JIANG Ao-tian¹, WANG Chang-fu¹, LI Chang-bo¹, YANG Xiao-hui³, ZHANG Lan²

(1. Huaihe Hospital and Research Institute of Medical Image, Henan University, Kaifeng 475000, China; 2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 3. School of Mathematics and Statistics, Henan University, Kaifeng 475000, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the quantitative analysis of MRI texture features in differentiating heterogeneity and precisely staging for rectal cancer stage T_{2,3}. [Methods] Clinical and imaging data of 15 patients with stage T_{2,3} rectal cancer confirmed by postoperative pathology, who underwent rectal high-resolution MRI scan two weeks before operation, were retrospectively analyzed. The images which were more satisfied with the axial T₂WI were selected, and 41 images were selected in 8 stage T₂ cases and 40 images were selected in 7 stage T₃ cases. By MaZda software, the region of interest (ROI) of the lesion was delineated for extracting the texture features. The mutual information (MI), Fisher coefficient (Fisher), and classification error probability combined with average correlation coefficients (POE+ACC) were provided by the software. The Fisher, POE+ACC and MI, and FPM (combination of Fisher, POE+ACC and MI) were used for screening texture features, then 30 texture features were obtained. Nonlinear classification analysis (NDA) was used for classifying 81 samples. Three optimal features were screened by the methods of BW (between-category to within-with-the-sums, BW) and DCA (decision curve analysis, DCA), then comparing the differences of the result. The diagnostic efficacy of three single features, and their combination was analyzed by using binary Logistic regression and ROC curve. [Results] The accuracy of image classification in 81 samples was 92.6%. The sensitivity of T₂ image as negative group and T₃ image as posi-

收稿日期: 2020-02-22; 修回日期: 2020-05-20

基金项目: 2020 年度河南省重点研发与推广专项 (202102310087); 河南省医学科技攻关计划 (201404026)

通信作者: 王长福, E-mail: hkwc@126.com