

沉默信息调节因子 1 通过诱导 miR-221/222 表达促进细胞自噬

杨文平^{1),2),3)}, 刘新光^{1),2),3)}*

(¹⁾ 广东医科大学衰老研究所, 广东 东莞 523808; (²⁾ 广东省医学分子诊断重点实验室, 广东医科大学, 广东 东莞 523808;

(³⁾ 广东医科大学生物化学与分子生物学研究所, 广东 东莞 523808)

摘要 微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是一类强大的基因表达调控子, 可在转录及转录后水平负调控靶基因的表达来参与生物学过程。沉默信息调节因子 1 (silent information regulator1, SIRT1) 底物众多, 可通过去乙酰化作用参与多种细胞生命活动进程。尽管如此, SIRT1 与非编码 RNA 如 miRNA 的表达调控关系仍有待深入研究。本文利用荧光定量 PCR 检测发现, SIRT1 与 miR-221 和 miR-222 的表达呈正相关; 干扰 SIRT1 后, miR-221/222 呈低水平表达; 而过表达 SIRT1 则促进 miR-221/222 的表达。将 miR-221/222 基因簇启动子区序列插入 pEZX-GA01 构建双荧光素酶报告载体, 与 SIRT1 过表达质粒或干扰序列共转至细胞。结果显示, SIRT1 可显著提高 miR-221/222 启动子区活性, 提示 SIRT1 可在转录水平调节 miR-221/222 的表达。进一步运用 Western 印迹研究发现, 在 HEK293 细胞中过表达 miR-221/222 可促进细胞的自噬能力, 而抑制 miR-221/222 的表达可减弱自噬。此外, 过表达 SIRT1 的同时抑制 miR-221/222 的表达可减弱 SIRT1 的自噬诱导作用。综上所述, SIRT1 可通过诱导 miR-221/222 的表达促进细胞自噬, 其具体作用机制有待进一步探讨。

关键词 微小 RNA-221/222; 沉默信息调节因子 1; 自噬

中图分类号 Q251

SIRT1 Triggers Autophagy through Inducing miR-221/222 Expression

YANG Wen-Ping^{1),2),3)}, LIU Xin-Guang^{1),2),3)}*

(¹⁾ Institute of Aging Research, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China;

(²⁾ Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China;

(³⁾ Institute of Biochemistry & Molecular Biology, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract MicroRNAs (miRNAs) have emerged as critical regulators for target genes expression, and thus are involved in almost all physiological and pathological processes. SIRT1 exerts critical roles in diverse biological processes through deacetylation of substrates. Nonetheless, the relationship between SIRT1 and non-coding RNAs such as miRNAs is still unknown. In this study, we initially silenced SIRT1 in HEK293 cells, and noted that miR-221 and miR-222 were significantly down-regulated using quantitative RT-PCR. Meanwhile, ectopic expression of SIRT1 enhanced miR-221/222 expression levels

收稿日期: 2017-11-08; 修回日期: 2017-12-10; 接受日期: 2018-01-14

国家自然科学基金项目 (No. 81671399, No. 81170327); 广东省普通高校创新团队建设项目 (No. 2015KCXTD022); 广东省普通高校特色创新类项目 (No. 2015KTSCX049) 和东莞市国际科技合作 (含港澳台) (No. 201650812001) 资助

* 通讯作者 Tel: 0769-22896026; E-mail: xgliu@gdmu.edu.cn

Received: November 8, 2017; Revised: December 10, 2017; Accepted: January 14, 2018

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81671399, No. 81170327); Ordinary University Innovation Team Construction Project of Guangdong Province (No. 2015KCXTD022); Unique Innovative Projects in Ordinary University of Guangdong Province (No. 2015KTSCX049) and Dongguan International Science & Technology Cooperation (including Hong Kong, Macao and Taiwan) Project (No. 201650812001)

* Corresponding author Tel: 0769-22896026; E-mail: xgliu@gdmu.edu.cn

in cells suggesting a the positive correlation between SIRT1 and miR-221/222. We further constructed a dual luciferase reporter vector containing the promoter of miR-221/222 cluster, which was co-transfected with SIRT1 over-expression plasmid or interference sequences of SIRT1 into the HEK293 cells. The results uncovered that SIRT1 significantly increased the miR-221/222 promoter activity, indicating that SIRT1 might regulate miR-221/222 at the transcriptional level. Moreover, the Western blot analysis showed that forced expression of miR-221/222 promoted the autophagy of HEK293 cells, while inhibition of miR-221/222 decreased autophagy; Furthermore, inhibition of miR-221/222 significantly reversed the SIRT1-induced autophagy. In conclusion, SIRT1 induced autophagy in HEK293 cells by upregulating the expression of miR-221/222 to significantly promote the autophagy in HEK293 cells. Its mechanism needs to be further studied.

Key words microR-221/222 (miR-221/222); silent information regulator1 (SIRT1); autophagy

沉默信息调节因子 1 (silent information regulator1, SIRT1) 是 NAD^+ 依赖的组蛋白去乙酰化酶, 在不同物种和组织中高度保守。SIRT1 可通过去乙酰化众多底物参与 DNA 损伤修复、细胞周期控制、抑制细胞凋亡、能量代谢、线粒体功能保护、炎症反应、抵抗氧化应激和脂质代谢等多种生物学过程^[1-5]。功能的多样化、复杂化使 SIRT1 的研究成为持久而热门的方向, 然而其发挥生物学功能的具体机制仍需深入研究。

自噬是被高度调节的自噬溶酶体降解的过程。胞浆蛋白质和细胞器通过被隔离入溶酶体, 随后被溶酶体降解。自噬通过去除受损的细胞器和蛋白质聚集体来维持细胞正常功能^[6]。而在某些病理情况下, 如氧化应激和炎症反应等过程中, 自噬过度激活, 造成细胞和组织正常功能受损, 因此细胞内自噬活性的调控极其重要^[7-10]。据文献报道, SIRT1 能直接影响自噬网络关键参与者的乙酰化水平来诱导细胞自噬^[11]。SIRT1 也可通过对自噬的影响来参与肿瘤的发生^[12]。另一方面, SIRT1 可间接通过下游信号传导网络来调节自噬泡形成。SIRT1 通过与 FOXO 和 p53 信号的相互作用来调节自噬降解和寿命延长^[13]。众多研究表明, SIRT1 与自噬关系密切, 但其中具体机制仍有待进一步研究。

微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是近年来涌现的一类强大的基因表达调控子, 为内源性的非编码小 RNA 分子, 对其靶基因进行转录后的调节^[14]。miRNAs 可通过负调控下游靶基因的表达, 广泛参与多种生命进程, 包括增殖、凋亡、自噬、衰老以及肿瘤的发生等, 在细胞各项生命活动过程中同样扮演着极其重要的角色^[15, 16]。miR-221/222 基因簇位于 X 染色体 p11.3 位点, miR-221 和 miR-222 相隔约 726 bp。miR-221 和 miR-222 的核苷酸序列高度相似, 核心种子序列完全相同^[17], 并且有报道 miR-

221 与 miR-222 可以协同作用^[18]。研究表明, miR-221/222 参与多种生命活动的调节, 在多种肿瘤的发生发展中发挥作用^[19, 20]。

SIRT1 底物众多, 可通过去乙酰化作用直接或间接地调控多个底物蛋白质的表达与功能。SIRT1 是否通过调节 miRNAs 的表达以实现其生物学功能? 本论文揭示, 在 HEK293 细胞中, SIRT1 可在转录水平调节 miR-221/222 基因簇的表达。此外, 过表达 miR-221/222 可显著促进细胞自噬, 并且抑制 miR-221/222 的表达可有效减弱 SIRT1 的自噬诱导作用。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基、胎牛血清、低血清培养基、胰酶 (Gibco); Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂、Opti-MEM、Trizol。LC3B 抗体、P62 抗体、GAPDH 抗体 (CST)、SIRT1 抗体。All-in-One miRNA qRT-PCR 检测试剂盒 (GeneCopoeia), PrimeSTAR (TaKaRa), Dual-Luciferase Reporter Assay System, LightCycler96 荧光定量 PCR 仪 (Roche), IX73 倒置荧光显微镜 (Olympus), 可见荧光免疫印迹成像系统 (Azure), Nanodrop-100 型核酸蛋白含量测定仪 (NanoDrop), FB12 单管式化学发光检测仪 (Berthold), 半干印迹系统 (Bio-Rad)。

人胚肾细胞 (HEK293 细胞) 为本室所保存, 双荧光素酶报告系统质粒 (pEZX-GA01) 购自 GeneCopoeia 公司。

1.2 细胞培养

人胚肾细胞 (HEK293 细胞), 在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 于 37 °C, 5% CO_2 饱和湿度条件下进行培养。细胞长满以后, 用 0.25% 胰蛋白酶 (购自 Gibco) 消化后进行细胞传代培养。

1.3 双荧光素酶报告系统

pEZX-GA01 双荧光素酶报告系统具有两个特点:(1)分泌型荧光素酶,直接吸取上清即可检测,无需裂解细胞,能动态检测不同时间点的荧光强度。(2)Gluc 和 SeAP(内参)在同一个质粒上,无需多质粒共转,极大提高转染效率,并且无需再摸索共转质粒的比例。首先获得目的基因 miR-221/222 启动子序列(引物序列见 Table1),片段大小为 925 bp。通过分子克隆将该启动子序列插入 pEZX-GA01 荧光素酶基因,从而获得 pEZX-GA01 报告载体。将 293

Table 1 miRNA and primer sequences

miRNA	Sense Primer(5'-3')	Antisense Primer(5'-3')
miRNA mimics sequences		
Agomir-221	AGCUACAUUGUCUGCGGGUUUC	AACCCAGCAGACAAUGUAGCUUU
Agomir-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	CCAGUAGCCAGAUGUAGCUUU
Agomir NC	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
Antagomir-221	GAAACCCAGCAGACAAUGUAGCU	
Antagomir-222	ACCCAGUAGCCAGAUGUAGCU	
Antagomir-222	ACCCAGUAGCCAGAUGUAGCUA	
Primer sequences		
miR-221/222 promoter	F:AGTAGATCTCTAGCCACCTTATCGAAAATAGCATTCCTC R: AGTGAATTCCAGAAGGCAAAGGATCACCCAGCT	

1.4 Western 印迹分析

吸弃细胞培养板中的培养液上清,用预冷 1 × PBS 润洗 2 次,以 100 μL 的用量(12 孔板)加入 1 × SDS 细胞裂解液,充分裂解细胞后转移至 1.5 mL 离心管中。用沸水加热 15 min,并在 12 000 g,4℃ 离心 10 min,转移上清至新的离心管,−80 ℃ 保存备用。根据目标蛋白质分子量制备相应浓度的 SDS PAGE 胶(8% ~ 15%),将前述制备好的样品充分混匀上样,进行电泳分离。电泳完成后用凝胶进行 PVDF 转膜,恒压 15 V 进行半干转,转膜时间约 30 min。转膜结束用 1 × TBS 洗膜 3 min,再加入适量 3% BSA(或 5% 脱脂奶粉)封闭液,置于摇床上缓慢摇动,室温 1 ~ 2 h 或者 4 ℃ 过夜进行封闭。封闭结束用 TBS /T 洗膜 3 次,每次 5 min。洗膜后加入一定比例稀释一抗液,置于摇床上缓慢摇动室温孵育 2 h,或 4 ℃ 过夜。用 TBS /T 洗膜 3 次后加入二抗液,室温下缓慢摇动孵育 1 h 用 TBS /T 洗膜 3 次,并用 ECL 液 进行曝光显色。

1.5 总 RNA 提取

弃去细胞培养液上清,用 1 × PBS 润洗 2 次,加入 0.5 mL Trizol 液裂解细胞(12 孔板每孔用量),转

细胞按 4 × 10⁴/孔接种于 48 孔板,部分细胞用 Lipofectamine RNAiMAX 进行 siSIRT1 的反转,24 h 后用 Lipofectamine 2000 转染 pEZX-GA01 报告载体(1 000 ng)。另一部分细胞培养 24 h(细胞密度约 50%),用 Lipofectamine 2000 将 SIRT1(500 ng)与 pEZX-GA01 报告载体(500 ng)共转到 293 细胞,24 h 换液。转染 48 h 时吸取培养基上清液,运用 Secrete-Pair™ Dual Luminescence Assay Kit 试剂盒处理细胞,并用 FB12 单管式化学发光检测仪测定荧光素酶活性。

移裂解液至 1.5 mL 无 RNA 酶的离心管中振荡混匀,放置 5 min 并加入 200 μL 氯仿,振荡混匀后于 4 ℃,12 000 g,离心 15 min 进行分相,转移上层水相至新的无 RNA 酶的离心管中,加入等体积异丙醇以沉淀 RNA,室温静置 10 min,在 4 ℃,16 000 g 离心 30 min,弃上清后用 70% 乙醇再沉淀 1 次。弃去乙醇,放置于冰上,加入适量 DEPC 水溶解沉淀,保存于 −80 ℃ 备用。

1.6 miRNA 荧光定量 PCR

利用 All-in-One miRNA qRT-PCR 检测试剂盒(GeneCopoeia),按照说明书操作,反转录提取的 1 μg 总 RNA,定量 PCR 同样采用 All-in-One miRNA qRTPCR 试剂盒,根据说明书利用 miRNA 特异引物与接头引物进行实时定量 PCR 反应,同时选择 U48 作为内参基因。PCR 反应于 LightCycler 96 实时定量 PCR 仪(Roche)中按如下程序进行:Pre-Incubation:50 ℃(2 min),95 ℃(2 min),1 个循环;Amplification:95 ℃(15 s),60 ℃(60 s),40 个循环;Melting:95 ℃(10 s),65 ℃(60 s),97 ℃(1 s),1 个循环;Cooling:37 ℃(30 s),1 个循环。

1.7 细胞转染

Agomir-221/222、Agomir NC 或 Antagomir-221/222、AntagomirNC 利用 RNAiMAX 转染试剂进行转染。以 12 孔板为例,转染前 24 h 进行细胞种板,每孔(5~10)⁴ 个细胞。将 Agomir-221 或其对照序列 Agomir NC 稀释于 200 μL Opti-MEM 中(终浓度 50 nmol/L),每管加入 2 μL RNAiMAX,混匀后室温孵育 5 min。将 RNAiMAX/RNA 混合液加入细胞培养板中,每孔的总体积为 1 mL,放置于细胞培养箱中培养。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。实验结果用平均值±标准误(mean±SEM)表示。两组间差异用 Student's *t* test 检验分析,两组以上的组间差异则采用单因素方差分析 one-way analysis of variance(ANOVA)进行检验分析。*P*<0.05 则被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SIRT1 促进 miR-221/222 的表达

为研究 SIRT1 与 miR-221/222 在基因水平的表达关系,首先在 HEK293 细胞中转染 SIRT1 的过表达质粒,Fig. 1 A 的 Western 印迹结果显示,细胞中 SIRT1 蛋白显著高表达,Fig. 1B 的荧光定量 PCR 结果表明,细胞中 SIRT1 mRNA 表达显著升高。以上结果提示,质粒成功转染入细胞并发挥作用。Fig. 1C 的荧光定量 PCR 结果进一步显示,细胞中过表达 SIRT1 促进 miR-221 和 miR-222 的表达。进一步在 293 细胞中转染 SIRT1 干扰片段,Fig. 1D 和 E 的结果显示,siSIRT1 可显著沉默 SIRT1 的表达,Fig. 1F 的结果显示,干扰 SIRT1 后 miR-221 和 miR-222 的表达水平下调,提示 siSIRT1 可抑制 miR-221/222 的表达。

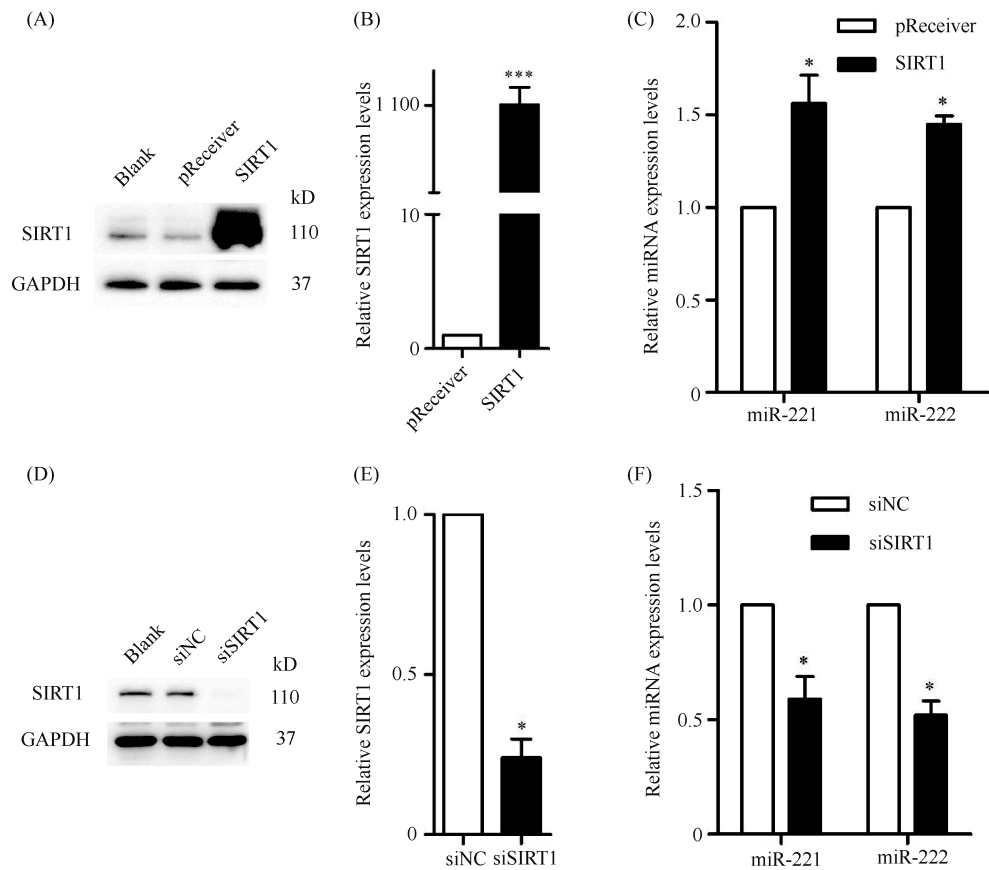


Fig.1 SIRT1 enhanced the expression of miR-221/222 HEK293 cells were transfected with SIRT1 plasmids or siSIRT1 for 24 hours respectively. (A) Western blot was performed to check the expression of SIRT1 protein when SIRT1 was over-expressed. GAPDH was used as a loading control. (B) qRT-PCR was carried out to determine the SIRT1 mRNA expression lever when SIRT1 was over-expressed. GAPDH was used as an internal control. (C) The expression of miR-221/222 was examined by qRT-PCR when SIRT1 was over-expressed. U48 was used as an internal control. (D) Western blot showed the expression of SIRT1 protein in HEK293 cells after transfection with siSIRT1. (E) The expression level of SIRT1 mRNA was measured by real-time qRT-PCR after HEK293 cells were transfected with siSIRT1. (F) The expression of miR-221/222 was analyzed after SIRT1 was inhibited by siRNA. (Bars, SEM. * *P* < 0.05; ****P* < 0.001, comparison between two groups)

2.2 SIRT1 促进 miR-221/222 启动子区域活性

为进一步研究 SIRT1 与 miR-221/222 之间的调控关系,将双荧光素酶报告载体和 SIRT1 过表达质粒共转染入 293 细胞, Fig. 2 A 结果显示,过表达 SIRT1 可显著提高 miR-221/222 启动子活性。此外,进一步在 293 细胞中转染 siSIRT1 和双荧光素酶报告质粒, Fig. 2B 结果表明,沉默 SIRT1 的表达,可显著抑制 miR-221/222 启动子活性。以上结果提示, SIRT1 可在转录水平调节 miR-221/222 的表达。

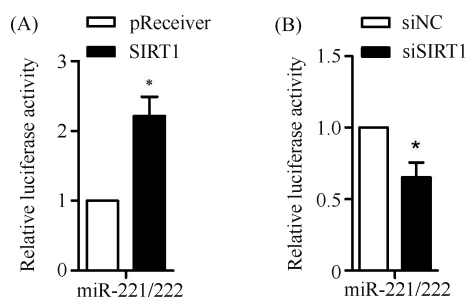


Fig. 2 SIRT1 promoted the activity of miR-221/222 promoter

(A) HEK293 cells were co-transfected with SIRT1 and pEZ-GA01 luciferase reporter plasmid as indicated for 48 hours. The relative luciferase activity was detected. U48 was used as an internal control. (B) The relative luciferase activity was detected after HEK293 cells were co-transfected with siSIRT1 and pEZ-GA01 luciferase reporter plasmid as indicated for 48 hours (Bars, SEM).

* $P < 0.05$, comparison between two groups)

2.3 Agomir-221/222 促进 HEK293 细胞自噬

为探究 miR-221/222 对细胞表型的影响,利用化学方法合成 miR-221 和 miR-222 的模拟物 Agomir-221 和 Agomir-222,以及 miR-221 和 miR-222 的抑制剂 Antagomir-221 和 Antagomir-222。将 miR-221/222 的模拟物或抑制剂转染至 293 细胞,48 h 时收集 RNA 样品。 Fig. 3 A 的 qPCR 结果显示, Agomir-221/Agomir-222 可在 HEK293 细胞中显著表达 miR-221/miR-222。 Fig. 3B 的结果表明, Antagomir-221/Antagomir-222 显著抑制 miR-221/miR-222 的表达。在 293 细胞中单独转染或共转染 miR-221/miR-222 的模拟物或抑制剂,24 h 时用一组细胞加雷帕霉素 (2.5 $\mu\text{mol/L}$) 诱导自噬,另一组细胞不加雷帕霉素处理,24 h 时均收集蛋白质样品,进一步利用 Western 印迹检测自噬相关蛋白质的表达, Fig. 3C 结果显示,加用雷帕霉素诱导自噬时 miR-221 和 miR-222 过表达可提高 LC3-II 的表达水平,自噬特异性降解蛋白质 p62 的表达也减弱;而抑制 miR-221 和 miR-222 的表达则抑制 LC3-II 的表达,

且促进 p62 的表达。 Fig. 3D 结果表明,不加用雷帕霉素时蛋白质 LC3B-II 和 p62 表达水平无变化,说明 miR-221 和 miR-222 过表达对细胞本底水平的自噬无调节作用。为进一步明确过表达 miR-221 和 miR-222 时 LC3II 升高的原因,在转染 miR-221/miR-222 的模拟物 24 h 时加 chloroquine (CQ) (50 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞 4 h,收集蛋白质样品进行检测。 Fig. 3E 结果表明,加入 CQ 处理后,LC3BII 聚集增多,说明自噬体合成确实增加。由上可见,miR-221/222 可促进 HEK293 细胞的自噬能力,抑制 miR-221/222 的表达可减弱 HEK293 细胞的自噬能力。

2.4 抑制 miR-221/222 表达可使 SIRT1 的自噬诱导作用减弱

为进一步探究 miR-221/222 与 SIRT1 之间的调控关系,利用 HEK293 细胞转染 Antagomir-221/222 片段 24 h,再转染 SIRT1 质粒入细胞,24 h 后加用雷帕霉素 (2.5 $\mu\text{mol/L}$) 促进自噬,加药 24 h 后收蛋白质样品进行 Western 印迹分析。 Fig. 4 结果显示:相比对照组,抑制 miR-221/222 的实验组 LC3BII 蛋白的表达减弱,说明抑制 miR-221/222 的表达可使 SIRT1 的自噬诱导作用减弱。

3 讨论

本文发现在 HEK293 细胞中,miR-221 和 miR-222 在 SIRT1 干扰时呈低水平表达,并且过表达 miR-221/222 可促进 HEK293 细胞的自噬表型。此外,过表达 SIRT1 的同时抑制 miR-221/222 的表达可减弱 SIRT1 的自噬诱导作用。以上结果提示, SIRT1 可通过诱导 miR-221/222 的表达促进 HEK293 细胞自噬。

近年来众多研究表明,miRNAs 能从转录后水平调控 SIRT1 的表达,研究还发现,SIRT1 也能调节 miRNAs 的表达: p53-miR34 a-SIRT1-p53 这一环路已经被证实^[21,22]。 SIRT1 是否能调控更多的 miRNAs? 其中调控的机制又如何? 这些问题仍有待更深入系统的研究。 miR-221/222 广泛参与多种生理或病理的生物学进程,作为典型的肿瘤因子,其异常表达与多种肿瘤的发生发展密切相关,包括肝癌、人脑胶质瘤、宫颈癌和结肠癌等。 miR-221/222 通过靶向作用于 TIMP2 促进人胶质瘤细胞侵袭和血管生成^[23]。此外,miR-221/222 能够促进前列腺癌细胞增殖、抑制细胞凋亡^[24]。本研究的结果提示:过表达 SIRT1 的同时抑制 miR-221/222 的表达可减弱 SIRT1 的自噬诱导作用,说明 SIRT1 可通过

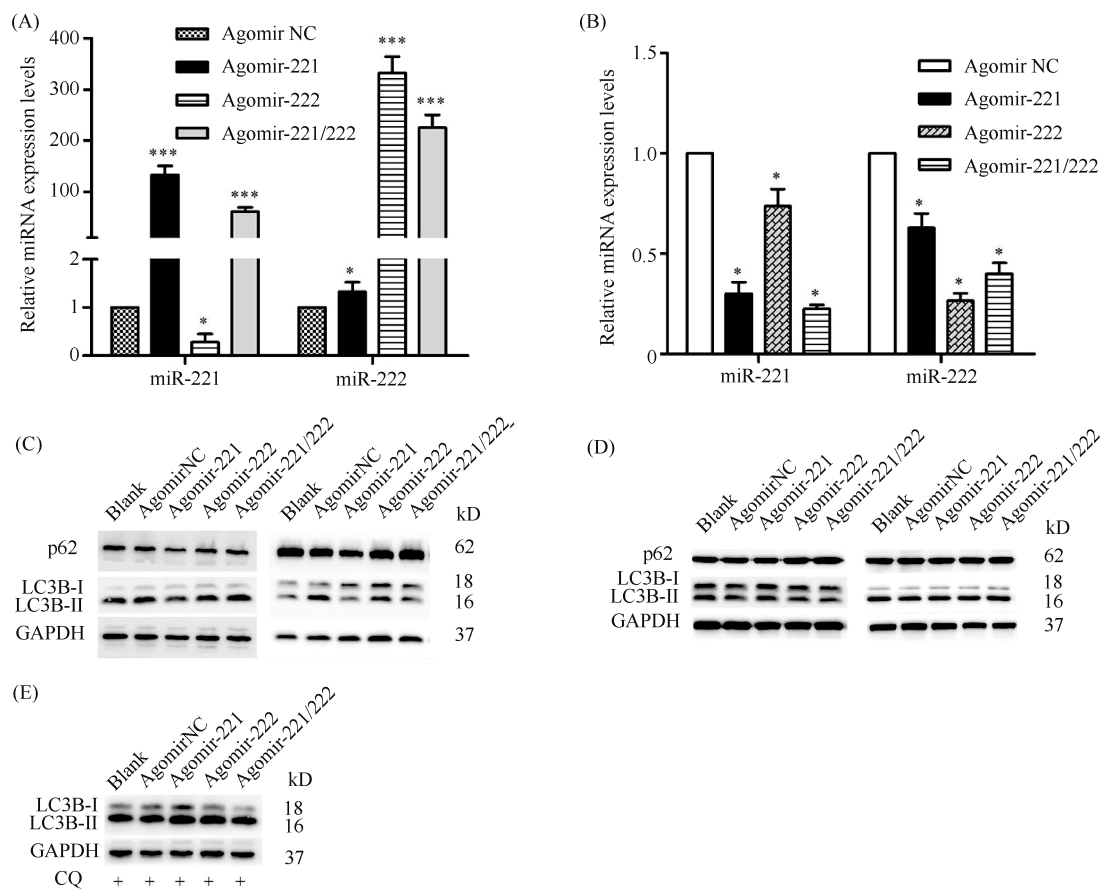


Fig. 3 Autophagy was enhanced by miR-221/222 in HEK293 cells (A) The expression levels of miR-221/222 were measured by real-time qRT-PCR after transfected with Agomir-221/Agomir-222 for 24 hours. U48 was used as an internal control. (B) The expression levels of miR-221/222 were measured by real-time qRT-PCR after transfected with Antagomir-221/Antagomir-222 for 24 hours. (C) HEK293 cells were treated with Rapamycin (2.5 μ mol/L) for 24 hours after the overexpression or inhibition of miR-221/222. GAPDH was used as a loading control. (D) Western blot was carried out to examine the autophagy related proteins p62 and LC3B-I/II expression levels in HEK293 cells after the overexpression or inhibition of miR-221/222 without Rapamycin. (E) Western blot was carried out to examine the LC3B-I/II expression levels in HEK293 cells which were treated with chloroquine (CQ) (50 μ mol/L) for 4 hours after the overexpression of miR-221/222 (bars, SEM. * $P < 0.05$, comparison between two groups)

调控 miR-221/222 参与细胞生命活动。

为进一步探究 SIRT1 与 miR-221/222 相互作用的具体机制,本文运用双荧光素酶报告载体证实了 SIRT1 促进 miR-221/222 启动子区域活性,提示 SIRT1 可能通过作用于 miR-221/222 启动子区域来发挥作用。已有文献报道,NF- κ B 和 c-Jun 两个转录因子通过与 miR-221/222 启动子区域结合来诱导 miR-221/222 转录,导致肿瘤的发生和发展^[25]。转录因子 AP-1 可通过结合并激活 miR-221/222 启动子区域参与 MET 通路^[26]。FOXO 是一类重要自噬调控因子,其活性主要受 SIRT1 的去乙酰化调节。SIRT1-FOXO-自噬通路参与多种疾病调节^[27-29]。本文通过转录因子预测软件 JASPAR,预测了 SIRT1 相关转录因子的信息,最终筛选出了与二者联系均

比较紧密的转录因子: AP-1、NF- κ B 及 FOXO3a。Western 印迹结果显示,在 HEK293 细胞中这 3 个转录因子的表达与二者的变化并没有明显的相关性,提示这些转录因子并不是二者之间作用的桥梁,二者具体作用机制仍有待探索。生物体内生命活动极其复杂,有文献报道,miR-221 和 miR-222 在小鼠心血管中通过调节 p27/CDK2/mTOR 轴,抑制自噬作用促进心衰^[30, 31],说明 miR-221/222 的自噬作用可能存在组织和细胞特异性。miR-221/222 的靶基因众多,与自噬表型相关的靶基因仍有待挖掘,这对于进一步了解和治疗相关的疾病具有重要意义。

SIRT1 和 miRNA 在当今的研究中一直比较热门,并已有大量研究成果,加深了人们对相关领域的理解,然而其强大的功能和在生物体内复杂的网状

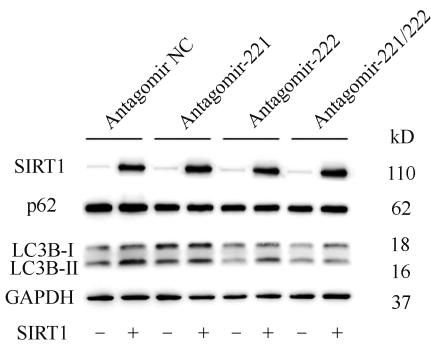


Fig. 4 Antagomir-221/222 attenuated the autophagy induced by SIRT1 induced in HEK293 cells After Antagomir-221/222 and SIRT1 plasmids were transfected into HEK293 cells for 24 hours, the cells were treated with Rapamycin (2.5 μ mol/L) for 24 hours. Western blot data showed the expression levels of related autophagia proteins. GAPDH was used as a loading control

调控仍有很多并不清楚,依然吸引着人们对其进行更深入的研究。将 SIRT1 的研究与 miR-221/222 进行关联,将有助于加深对二者更深层次的认识,为解决相关临床疾病的防治打下基础,亦可对 SIRT1 与其他非编码 RNA 如 lncRNA、环状 RNA 等之间关系的研究提供新思路,进一步加深对生物体内复杂的网状调控的认识。

参考文献 (References)

[1] Chang HC, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism [J]. Trends Endocrinol Metab, 2014, **25** (3):138-145

[2] Yang H, Bi Y, Xue L, *et al.* Multifaceted modulation of SIRT1 in cancer and inflammation [J]. Crit Rev Oncog, 2015, **20**(1-2): 49-64

[3] Simmons G Jr, Pruitt WM, Pruitt K. Diverse roles of SIRT1 in cancer biology and lipid metabolism [J]. Int J Mol Sci, 2015, **16**(1): 950-965

[4] Hwang JW, Yao H, Caito S, *et al.* Redox regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence [J]. Free Radic Biol Med, 2013, **61**: 95-110

[5] Li X. SIRT1 and energy metabolism [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2013, **45**(1): 51-60

[6] Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research [J]. Cell Res, 2014, **24**(1): 9-23

[7] Zhou J, Liao W, Yang J, *et al.* FOXO3 induces FOXO1-dependent autophagy by activating the AKT1 signaling pathway [J]. Autophagy, 2012, **8**(12): 1712-1723

[8] Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity [J]. Nat Rev Immunol, 2013, **13** (10): 722-737

[9] Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs [J]. Cell Death Differ, 2015, **22**(3): 377-388

[10] Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, *et al.* Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival [J]. Antioxid Redox Signal, 2014, **21**(1): 66-85

[11] Ng F, Tang BL. Sirtuins' modulation of autophagy [J]. J Cell Physiol, 2013, **228**(12): 2262-2270

[12] Qiu G, Li X, Che X, *et al.* SIRT1 is a regulator of autophagy: Implications in gastric cancer progression and treatment [J]. FEBS Lett, 2015, **589**(16): 2034-2042

[13] Salminen A, Kaamiranta K. SIRT1: regulation of longevity via autophagy [J]. Cell Signal, 2009, **21**(9): 1356-1360

[14] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, **116**(2): 281-297

[15] Hammond SM. An overview of microRNAs[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, **87**: 3-14

[16] Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy[J]. Trends Mol Med, 2014, **20**(8): 460-469

[17] Galardi S, Mercatelli N, Giorda E, *et al.* miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1 [J]. J Biol Chem, 2007, **282**(32): 23716-23724

[18] Liu S, Sun X, Wang M, *et al.* A microRNA 221- and 222-mediated feedback loop maintains constitutive activation of NFkappaB and STAT3 in colorectal cancer cells [J]. Gastroenterology, 2014, **147**(4): 847- 859. e11

[19] Garofalo M, Quintavalle C, Romano G, *et al.* miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy [J]. Curr Mol Med, 2012, **12**(1): 27-33

[20] Song J, Ouyang Y, Che J, *et al.* Potential value of miR-221/222 as diagnostic, prognostic, and therapeutic biomarkers for diseases [J]. Front Immunol, 2017, **8**: 56

[21] Tian XF, Ji FJ, Zang HL, *et al.* Activation of the miR-34a/SIRT1/p53 signaling pathway contributes to the progress of liver fibrosis via inducing apoptosis in hepatocytes but not in HSCs [J]. PLoS One, 2016, **11** (7): e0158657

[22] Lou G, Liu Y, Wu S, *et al.* The p53/miR-34a/SIRT1 positive feedback loop in quercetin-induced apoptosis [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, **35**(6): 2192-2202

[23] Yang F, Wang W, Zhou C, *et al.* MiR-221/222 promote human glioma cell invasion and angiogenesis by targeting TIMP2 [J]. Tumour Biol, 2015, **36**(5): 3763-3773

[24] Wang L, Liu C, Li C, *et al.* Effects of microRNA-221/222 on cell proliferation and apoptosis in prostate cancer cells [J]. Gene, 2015, **572**(2): 252-258

[25] Galardi S, Mercatelli N, Farace MG, *et al.* NF-kB and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma cells [J]. Nucleic Acids Res, 2011, **39**(9): 3892-3902

[26] Garofalo M, Di Leva G, Romano G, *et al.* miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation [J]. Cancer Cell, 2009, **16** (6): 498-509

[27] Giannakou ME, Partridge L. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival [J]. Trends Cell Biol, 2004, **14**(8): 408-412

[28] Kim M, Chung H, Yoon C, *et al.* Increase of INS-1 cell apoptosis under glucose fluctuation and the involvement of FOXO-SIRT pathway [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2012, **98** (1): 132-139

[29] Hariharan N, Maejima Y, Nakae, J, *et al.* Deacetylation of FoxO by Sirtl plays an essential role in mediating starvation-induced autophagy in cardiac myocytes [J]. Circ Res, 2010, **107**(12): 1470-1482

[30] Su M, Chen Z, Wang C, *et al.* Cardiac-specific overexpression of miR-222 induces heart failure and inhibits autophagy in mice [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, **39**(4): 1503-1511

[31] Su M, Wang J, Wang C, *et al.* MicroRNA-221 inhibits autophagy and promotes heart failure by modulating the p27/CDK2/mTOR axis [J]. Cell Death Differ, 2015, **22**(6): 986-999