

# 过表达SIRT3抑制裸鼠异位移植人肝细胞癌的生长及其机制研究

陈祥 任吉华 冉龙宽 陶娜娜 李宛蔚 周洪钟 刘波 陈娟\*  
(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016)

**摘要** 该文旨在研究人肝细胞癌异位移植瘤裸鼠模型中沉默信息调节因子3(silent information regulator 3, SIRT3)对肝细胞癌生长的影响及其机制。建立稳定过表达SIRT3和pcDNA3.1的SK-Hep-1细胞株;将稳定过表达SIRT3和pcDNA3.1的细胞悬液分别注射入裸鼠皮下,实时监测两组移植瘤的生长,25 d后剥离出移植瘤并称重;免疫组织化学检测移植瘤中SIRT3、Ki67的表达水平;应用定量逆转录PCR(qRT-PCR)筛选SIRT3影响移植瘤生长的下游靶向分子,Western blot检测下游靶向分子Bax的表达量以及移植瘤中cleaved-PARP(poly ADP-ribose polymerase)的表达水平。结果显示,过表达SIRT3组移植瘤的体积和重量都小于pcDNA3.1组;过表达SIRT3组移植瘤中Ki67的表达水平较pcDNA3.1组降低;过表达SIRT3上调Bax的mRNA和蛋白质水平并促进PARP的剪切。该文结果提示,SIRT3可能通过Bax凋亡信号通路抑制人肝细胞癌异位移植瘤的生长。

**关键词** 肝细胞癌;移植瘤;SIRT3;Bax;生长;细胞凋亡

## Overexpression of SIRT3 Inhibits Human Hepatocellular Carcinoma Growth in Ectopic Xenograft Nude Mouse Model and Its Mechanism

Chen Xiang, Ren Jihua, Ran Longkuan, Tao Nana, Li Wanyu, Zhou Hongzhong, Liu Bo, Chen Juan\*  
(Key Laboratory of Molecular Biology on Infection Diseases of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** This study investigated the effect of silent information regulator 3 (SIRT3) on the growth of HCC in ectopic xenograft nude mouse model and its possible molecular mechanism. SK-Hep-1 cells were established with stable overexpression of SIRT3 or pcDNA3.1, respectively. Then, these cells were injected to the subcutaneous of nude mice, respectively. The growth of ectopic xenograft in SIRT3 group and pcDNA3.1 group were monitored at regular intervals. The ectopic xenograft were stripped out and weighed at 25th day after injection. Expression levels of SIRT3 and Ki-67 were determined by immunohistochemical staining. Downstream target molecules, which may participate in the SIRT3 pathway that regulated the growth of transplantation tumor, were analyzed by reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). Bax and cleaved-PARP were detected by Western blot. The results showed that SIRT3 overexpression could decrease the size and weight of ectopic xenograft and downregulate the expression of Ki-67. Furthermore, overexpression of SIRT3 raised the Bax in mRNA and protein levels, and promoted the protein cleavage of PARP. These results demonstrated that SIRT3 might inhibit

收稿日期: 2015-09-28 接受日期: 2015-11-06

国家自然科学基金(批准号: 81472271、81201282)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-68486780, E-mail: yixin\_xinyuan@163.com

Received: September 28, 2015 Accepted: November 6

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81472271, 81201282)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-68486780, E-mail: yixin\_xinyuan@163.com

网络出版时间: 2015-12-24 17:09:03

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151224.1709.006.html>

the growth of human HCC ectopic xenograft by Bax signaling pathway in apoptosis.

**Keywords** hepatocellular carcinoma; xenograft; SIRT3; Bax; growth; apoptosis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球范围内常见的恶性肿瘤,其恶性程度高,占肝原发性恶性肿瘤的85%~90%<sup>[1]</sup>。同时,肝细胞癌也是我国最常见的恶性肿瘤之一,目前我国肝癌发病人数占全球的55%,死亡人数占全球肝癌死亡人数的45%<sup>[2-3]</sup>。肝细胞癌严重危害我国人民的健康,已经成为我国恶性肿瘤杀手的第2位<sup>[4]</sup>。虽然,随着医学的不断发展,肝癌的治疗取得了许多重大的进步,但大部分病人在就诊时已是HCC晚期,错过了手术治疗的最佳时机,这使得肝癌的5年生存率仍不超过5%<sup>[5]</sup>。因此,阐明肝细胞癌发生发展过程中的分子调节机制,对完善HCC治疗方案具有重要的意义。

沉默信息调节因子(silent information regulator, Sirtuin)家族是第Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶,依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)发挥去乙酰化的活性<sup>[6]</sup>, Sirtuin家族在人类组织中拥有7个成员,即SIRT1~7,它们参与的生物学进程包括细胞代谢<sup>[7]</sup>、细胞凋亡<sup>[8]</sup>、炎症<sup>[9]</sup>、分化<sup>[10]</sup>、肿瘤发生<sup>[11-13]</sup>等。自2000年以来, Sirtuin家族越来越受到关注, SIRT3的生物学功能也逐步得到探究。研究发现, SIRT3主要定位于线粒体<sup>[14]</sup>;在线粒体代谢<sup>[15]</sup>、氧化应激<sup>[16]</sup>、调节基因组稳定性<sup>[17]</sup>方面发挥着重要的作用;还有研究表明, SIRT3的基因多态性与寿命相关<sup>[18]</sup>;此外, SIRT3与肿瘤的关系也十分紧密,参与了非小细胞肺癌、结肠癌等癌症的发生发展<sup>[19]</sup>,但其与肝细胞癌的关系尚未清楚。本研究利用裸鼠异位移植瘤模型来探究SIRT3对肝癌细胞生长的影响,有助于阐明肝癌发生发展的机制,为临床肝癌治疗提供新的依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人肝细胞癌株SK-Hep-1购于ATCC(American Type Culture Collection); 4~5周大裸鼠购于重庆医科大学实验动物中心; pcDNA3.1及pcDNA3.1-SIRT3质粒购于Addgene公司; SIRT3抗体(#3627)、Bax抗体(#5023s)、PARP抗体(#9542)购于Cell Signaling Technology公司; 辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG购于GE公司; GAPDH及辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG购于中杉金桥公司; Ki-67抗体(BS1454)

购于美国Bioworld公司; BCA蛋白定量试剂盒购于美国Thermo公司; Trizol试剂购于碧云天生物技术有限公司; 逆转录试剂盒购于美国Bio-Rad公司; 实时荧光定量PCR荧光染料、质粒转染试剂(06366546001)购于罗氏公司; 免疫组织化学套装试剂盒购于美国Vector公司。

### 1.2 细胞培养

SK-Hep-1培养于含有10% FBS、1%青/链霉素的DMEM培养基中,于37℃、5% CO<sub>2</sub>的孵箱中培养。

### 1.3 质粒转染

在6孔板中均匀接种SK-Hep-1细胞 $1 \times 10^5$ 个。培养24 h后进行转染,于200  $\mu$ L无血清培养基opti-MEM中依次加入2  $\mu$ g质粒及6  $\mu$ L罗氏转染试剂,充分混匀后室温静置15 min,滴加入无抗生素的DMEM培养基中。

### 1.4 G418筛选浓度的确定

接种SK-Hep-1细胞 $2 \times 10^4$ 于24孔板中,24 h后,分别加入终浓度为0、100、200、300、400  $\mu$ g/mL的G418,每2~3 d更换培养基。待细胞增殖至80%汇合度时,传代 $2 \times 10^4$ 细胞于24孔板中继续处理,持续筛选2周,14 d全部细胞死亡的G418浓度为筛选浓度(即300  $\mu$ g/mL),用于后续稳定细胞株的筛选。

### 1.5 构建稳定过表达SIRT3的细胞株

接种SK-Hep-1细胞 $1 \times 10^5$ 于6孔板中。培养24 h后,罗氏转染试剂转染pcDNA3.1和pcDNA3.1-SIRT3质粒,24 h后换液,并用300  $\mu$ g/mL的G418进行筛选培养,待细胞增殖至汇合度80%时传代,持续筛选2周,收集剩余细胞的蛋白质,Western blot检测过表达效率。

### 1.6 建立肝癌异位移植瘤模型

将稳定过表达SIRT3的SK-Hep-1细胞株用300  $\mu$ g/mL的G418维持培养,台盼蓝染色计数细胞,注射800万个细胞至4~5周龄的雄性裸鼠皮下,注射区域为后腿根部,pcDNA3.1、pcDNA3.1-SIRT3组各5只。每5 d监测移植瘤的体积,待移植瘤生长至1.0~1.5 cm大小时对裸鼠处死,剥离出移植瘤,测量移植瘤的体积并称重。

### 1.7 免疫组织化学

将移植瘤组织块于4%多聚甲醛中固定过夜,制成厚度为7~10  $\mu$ m的石蜡切片。将切片于50℃孵

箱中过夜。第2 d放入烤箱中, 60 °C 20 min, 随即放入新鲜的二甲苯中。二甲苯I 45 s, 二甲苯II 45 s, 然后在无水乙醇I、无水乙醇II、90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇、双蒸水中将切片水化, 各为30 s。0.3% Triton X-100中处理20 min, TBS洗后将组织切片在微波炉中用柠檬酸盐修复液进行抗原修复, 再用3%过氧化氢封闭组织切片中内源性过氧化氢酶。TBS浸洗10 min, 共3次。使用Vector试剂盒中的羊血清室温封闭2 h, 浸洗后用TBS稀释一抗(ki67 1/100、SIRT3 1/200), 将切片放于湿盒中, 于4 °C孵育一抗过夜。用TBS室温浸洗3次, 10 min/次, 再用50 μL二抗室温孵育1 h, 浸洗后再用50 μL SABC室温孵育1 h。DAB染色2 min, 浸洗后苏木素复染2 min。再于70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、100%乙醇I、100%乙醇II中将组织切片脱水, 用中性树脂封片, 显微镜拍照观察。

### 1.8 RNA提取及qRT-PCR检测

先预冷研钵, 切取黄豆大小的移植瘤组织块于研钵内, 反复加入液氮, 将组织块研磨成细粉状, 加入1 mL Trizol, 吹打混匀, 吸入至离心管中, 经提取得到RNA, 将1 μg RNA逆转录(美国Bio-Rad公司逆转录试剂盒), 以β-actin为内参进行qRT-PCR检测。qRT-PCR引物见表一。

### 1.9 Western blot

移植瘤组织块及细胞于RIPA裂解液中裂解, 将裂解产物4 °C 16 000 ×g离心5 min, 吸取上清于另一

新的EP管中。用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度, SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白质, 每孔上蛋白质量30 μg, 将蛋白质转至NC膜(RPN303D, GE公司), 5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 4 °C摇床孵育一抗过夜(1:3 000稀释), 室温孵育二抗2 h。以GAPDH为内参。

### 1.10 统计分析

采用SPSS 20.0软件进行统计学分析, 两组间比较采用配对t检验, 以P<0.05为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 构建稳定过表达SIRT3的SK-Hep-1细胞株

首先, 我们接种 $1 \times 10^5$  SK-Hep-1细胞于6孔板中, 培养24 h后转染pcDNA3.1、pcDNA3.1-SIRT3质粒,

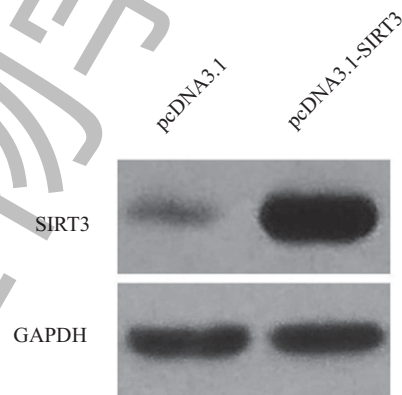


图1 Western blot检测SIRT3在SK-Hep-1细胞中的过表达水平  
Fig.1 The overexpression level of SIRT3 in SK-Hep-1 was detected by Western blot

表1 qRT-PCR引物序列

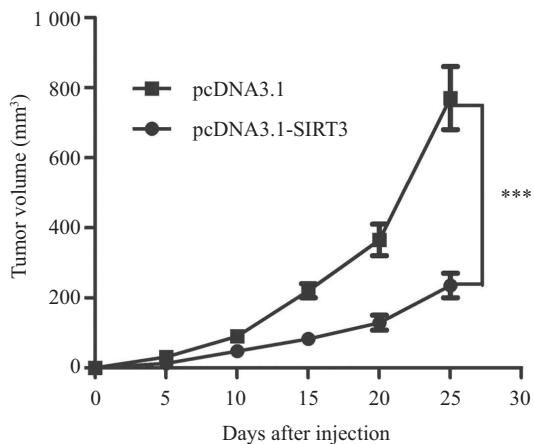
Table 1 Primer sequences of qRT-PCR

目的基因 Target genes	引物序列 Primer sequence
<i>Bim</i>	F: 5'-GGC AAA GCA ACC TTC TGA TG-3' R: 5'-CTT GTG GCT CTG TCT GTA GG-3'
<i>Bax</i>	F: 5'-GCG AGT GTC TCA AGC GCA TC-3' R: 5'-CCA GTT GAA GTT GCC GTC AGA A-3'
<i>Bcl-2</i>	F: 5'-TTG AGG AAG TGA ACA TTT CGG TG-3' R: 5'-AGG TTC TGC GGA CTT AGG TC-3'
<i>Bcl2A1</i>	F: 5'-AAT GTT GCG TTC TCA GTC CA-3' R: 5'-ATG CCG TCT TCA AAC TCC TT-3'
<i>Bid</i>	F: 5'-CCT CCA AAG CTG TTC TGA CA-3' R: 5'-ATC AGT CTG CAG CTC ATC GT-3'
<i>Bad</i>	F: 5'-CTC CAC ATC CCG AAA CTC C-3' R: 5'-TCA GCC CTC CCT CCA AAG-3'
<i>Mcl-1</i>	F: 5'-GCG ACG GCG TAA CAA ACT-3' R: 5'-ACC CAT CCC AGC CTC TTT-3'
<i>SIRT3</i>	F: 5'-AGA GGT TCT TGC TGC ATG TG-3' R: 5'-ACC AAG TCC CGG TTG ATG-3'
<i>β-actin</i>	F: 5'-CTC TTC CAG CCT TCC TTC CT-3' R: 5'-AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG-3'

24 h后加入300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的G418进行筛选培养、并于筛选2周后进行过表达效率检测。Western blot显示, SIRT3的过表达是有效的(图1), 揭示SIRT3稳定过表达的细胞株成功构建。

## 2.2 SIRT3抑制移植瘤的生长

我们分别培养了稳定过表达SIRT3和pcDNA3.1的SK-Hep-1细胞, 待增殖至细胞汇合度为80%~90%, 经胰蛋白酶消化、台盼蓝计数, 分别将 $8 \times 10^6$ 表达SIRT3和pcDNA3.1的SK-Hep-1细胞悬液注射入裸

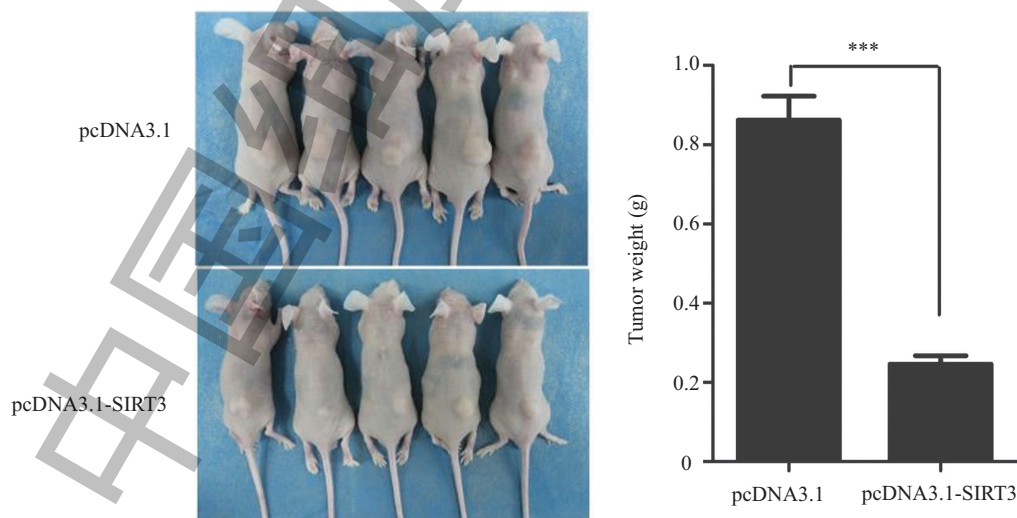


移植瘤体积=长 $\times$ 宽 $\times$ 高, 数据以mean $\pm$ S.D.形式表示。\*\*\* $P < 0.001$ , 与pcDNA3.1组比较。

The volume of the ectopic xenograft equal to  $L \times W \times H$ . Each data represents the mean $\pm$ S.D.. \*\*\* $P < 0.001$  vs pcDNA3.1 group.

图2 实时监测SIRT3对移植瘤生长的影响

Fig.2 Monitoring the effect of SIRT3 overexpression on the growth of ectopic xenograft



左图为注射后第25 d两组移植瘤的实体图, 右图为两组移植瘤的重量统计结果(mean $\pm$ S.D.), \*\*\* $P < 0.001$ 。

The left graph is the entity graph of the two groups of ectopic xenograft at 25<sup>th</sup> day after injection. The right graph is the weight of the two groups of ectopic xenograft, and represents the mean $\pm$ S.D.. \*\*\* $P < 0.001$ .

图3 SIRT3对移植瘤重量的影响

Fig.3 The influences of SIRT3 on the tumor weight of ectopic xenograft

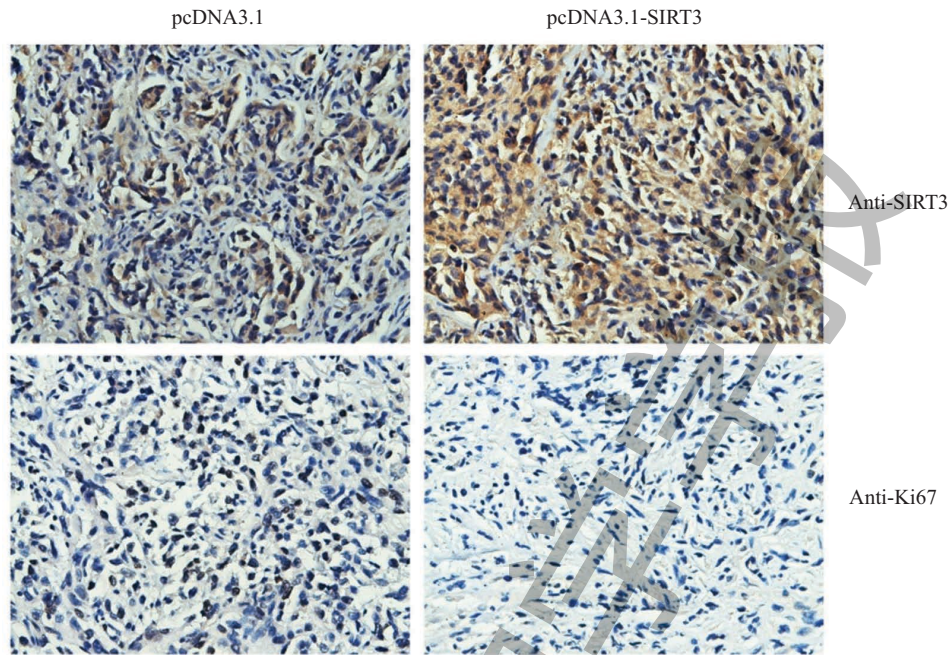
鼠皮下, 每5 d监测移植瘤的体积。结果显示, 过表达SIRT3组移植瘤的体积明显小于对照组( $P < 0.001$ ) (图2)。25 d后对裸鼠进行处死, 剥离出移植瘤并称重, 结果显示, 过表达SIRT3组移植瘤的重量明显低于对照组( $P < 0.001$ ) (图3)。

## 2.3 SIRT3下调肝细胞癌移植瘤增殖标志物Ki-67的表达

将剥离出的肝细胞癌移植瘤组织块于4%多聚甲醛中固定过夜, 制作成石蜡切片, 免疫组织化学检测组织中SIRT3、肿瘤增殖标志物Ki-67的表达水平。结果显示, 过表达SIRT3组比对照组SIRT3的表达水平明显增强, 过表达SIRT3组比对照组肿瘤增殖标志物Ki-67的表达水平显著降低(图4)。

## 2.4 SIRT3上调移植瘤中Bax的表达

有文献报道, SIRT3在肺腺癌中呈低表达水平, 过表达SIRT3能够上调线粒体凋亡信号通路中Bax/Bcl-2、Bad/Bcl-x1的比率, 进而促进肺腺癌细胞A549的凋亡<sup>[20]</sup>。Bcl-2家族是线粒体凋亡信号通路的关键调节因子, 为探讨SIRT3影响肝细胞癌皮下移植瘤生长的分子机制, 应用qRT-PCR检测了移植瘤Bcl-2家族基因的mRNA表达水平。结果显示, SIRT3过表达时能显著上调Bax的mRNA表达水平( $P < 0.01$ ), 而Bcl-2家族其他成员的mRNA表达水平未见明显差异(图5); 同时, Western blot检测发现, 过表达SIRT3也可以显著上调Bax的蛋白质水平和促进PARP的剪切(图6)。

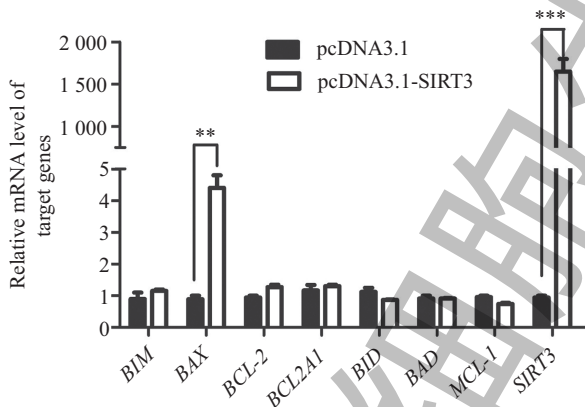


免疫组织化学检测移植瘤中SIRT3、Ki-67的表达水平。

The expression levels of SIRT3 and Ki-67 were determined by immunohistochemical staining.

图4 过表达SIRT3对肿瘤增殖标志物Ki-67的影响(40×)

Fig.4 Overexpression of SIRT3 influences the tumor proliferation markers Ki-67 (40×)



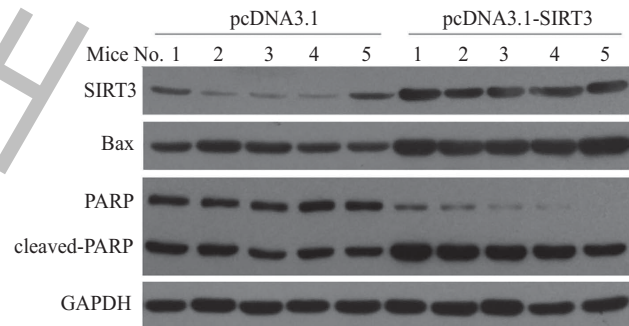
\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图5 应用qRT-PCR分析SIRT3对Bcl-2家族基因mRNA表达水平的影响

Fig.5 The effects of SIRT3 on mRNA expression levels of Bcl-2 family detected by qRT-PCR

### 3 讨论

近年来,随着Sirtuin家族被广泛研究,SIRT3在肿瘤中的作用也逐渐被证实,总体而言,SIRT3在肿瘤发生发展中具有双重调节的作用<sup>[21]</sup>。一方面,SIRT3促进癌细胞的凋亡,抑制癌症的发生,如Allison等<sup>[22]</sup>报道,SIRT3通过下调Bcl-2的表达促进结肠癌细胞HCT116的凋亡;在白血病细胞中,SIRT3通过上调Bax的表达和活化caspase-3诱导氧化应激和细



pcDNA3.1组为对照组。

pcDNA3.1 group as control group.

图6 Western blot分析SIRT3对Bax和剪切PARP蛋白表达水平的影响

Fig.6 The effects of SIRT3 on protein levels of Bax and cleaved PARP detected by Western blot

胞凋亡<sup>[23]</sup>。另一方面,SIRT3抑制癌细胞的凋亡,促进癌症的发生。有文献报道,SIRT3通过调控P53抑制膀胱癌的凋亡<sup>[24]</sup>;Alhazzazi等<sup>[25]</sup>也报道,SIRT3在口腔癌中呈高表达水平,并能够促进口腔癌细胞的增殖,与口腔癌患者不良预后有关。因此,SIRT3在细胞凋亡中的作用富有争议,抑或其功能具有肿瘤特异性。

在本研究中,将稳定过表达SIRT3和pcDNA3.1的SK-Hep-1细胞注射入裸鼠皮下,构建肝细胞癌裸鼠皮下移植瘤模型,发现过表达SIRT3抑制了肝细胞

癌皮下移植瘤的生长。而影响肿瘤生长的因素有很多,如凋亡增加、细胞周期阻滞、血管生成减少等等,其中细胞凋亡增加是影响肿瘤细胞生长的重要因素。众所周知,线粒体凋亡信号通路是细胞凋亡的主要途径之一,Bcl-2家族又是其中的关键因子。Bcl-2家族按功能可分为促凋亡和抗凋亡二类,前者包括Bax、Bid、Bak等;后者包括Bcl-xl、Mcl-1、Bcl-w等。这些促凋亡和抗凋亡成员存在于线粒体,竞争性的调控细胞的凋亡。因此,我们初步探讨了SIRT3影响肝细胞癌皮下移植瘤生长的机制,检测了肝细胞癌皮下移植瘤中Bcl-2家族和PARP的表达水平,发现过表达SIRT3能上调Bax的表达,促进PARP的剪切。这提示,Bax可能是SIRT3调控肝癌细胞凋亡的下游靶向分子,SIRT3可能通过激活线粒体凋亡信号通路中的Bax介导肝癌细胞的凋亡,从而影响肝细胞癌皮下移植瘤的生长。综上所述,本研究发现,SIRT3可能通过Bax信号通路抑制肝细胞癌皮下移植瘤的生长,对临床肝癌治疗方法的发展具有重要的意义。

### 参考文献 (References)

- 1 El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132(7): 2557-76.
- 2 Schutte K, Bornschein J, Malfertheiner P. Hepatocellular carcinoma—epidemiological trends and risk factors. *Dig Dis* 2009; 27(2): 80-92.
- 3 McGlynn KA, Tsao L, Hsing AW, Devesa SS, Fraumeni JF Jr. International trends and patterns of primary liver cancer. *Int J Cancer* 2001; 94(2): 290-6.
- 4 Yuen MF, Hou JL, Chutaputti A. Hepatocellular carcinoma in the Asiapacific region. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24(3): 346-53.
- 5 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94(2): 153-6.
- 6 Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 2000; 403(6771): 795-800.
- 7 Cuperlovic-Culf M, Touaibia M, St-Coeur PD, Poitras J, Morin P, Culf AS. Metabolic effects of known and novel HDAC and SIRT inhibitors in glioblastomas independently or combined with temozolomide. *Metabolites* 2014; 4(3): 807-30.
- 8 Sarma P, Bag I, Ramaiah MJ, Kamal A, Bhadra U, Pal Bhadra M. Bisindole-PBD regulates breast cancer cell proliferation via SIRT-p53 axis. *Cancer Biol Ther* 2015; 20: 1-16.
- 9 Sharma M, Mohapatra J, Wagh A, Patel HM, Pandey D, Kadam S, *et al.* Involvement of TACE in colon inflammation: A novel mechanism of regulation via SIRT-1 activation Cytokine. *Cytokine* 2014; 66(1): 30-9.
- 10 Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: Insights into their biological function. *Biochem J* 2007; 404(1): 1-13.
- 11 Song NY, Surh YJ. Janus-faced role of SIRT1 in tumorigenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1271: 10-19.
- 12 Park SH, Zhu Y, Ozden O, Kim HS, Jiang H, Deng CX, *et al.* SIRT2 is a tumor suppressor that connects aging, acetylome, cell cycle signaling, and carcinogenesis. *Transl Cancer Res* 2012; 1(1): 15-21.
- 13 Alhazzazi TY, Kamarajan P, Verdin E, Kapila YL. Sirtuin-3 (SIRT3) and the hallmarks of cancer. *Genes Cancer* 2013; 4(3/4): 164-71.
- 14 Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of Sirtuins. *Nature* 2009; 460(7255): 587-91.
- 15 Hallows WC, Lee S, Denu JM. Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(27): 10230-5.
- 16 Koyama T, Kume S, Koya D, Araki S, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, *et al.* SIRT3 attenuates palmitate-induced ROS production and inflammation in proximal tubular cells. *Free Radic Biol Med* 2011; 51(6): 1258-67.
- 17 Tao R, Coleman MC, Pennington JD, Ozden O, Park SH, Jiang H, *et al.* Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol Cell* 2010; 40(6): 893-904.
- 18 Bellizzi D, Rose G, Cavalcante P, Covelto G, Dato S, de Rango F, *et al.* A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics* 2005; 85(2): 258-63.
- 19 Chen Y, Fu LL, Wen X, Wang XY, Liu J, Cheng Y, *et al.* Sirtuin-3 (SIRT3), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive function in cancer. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1047.
- 20 Xiao K, Jiang J, Wang W, Cao S, Zhu L, Zeng H, *et al.* Sirt3 is a tumor suppressor in lung adenocarcinoma cells. *Oncol Rep* 2013; 30(3): 1323-8.
- 21 Alhazzazi TY, Kamarajan P, Verdin E, Kapila YL. SIRT3 and cancer: Tumor promoter or suppressor? *Biochim Biophys Acta* 2011; 1816(1): 80-8.
- 22 Allison SJ, Milner J. SIRT3 is pro-apoptotic and participates in distinct basal apoptotic pathways. *Cell Cycle* 2007; 6(21): 2669-77.
- 23 Marfe G, Tafani M, Indelicato M, Sinibaldi-Salimei P, Reali V, Pucci B, *et al.* Kaempferol induces apoptosis in two different cell lines via Akt inactivation, Bax and SIRT3 activation, and mitochondrial dysfunction. *J Cell Biochem* 2009; 106(4): 643-50.
- 24 S Li, Banck M, Mujtaba S, Zhou MM, Sugrue MM, Walsh MJ. p53-Induced growth arrest is regulated by the mitochondrial Sirt3 deacetylase. *PLoS One* 2010; 5(5): e10486.
- 25 Henson B, Li F, Coatney DD, Carey TE, Mitra RS, Kirkwood KL, *et al.* An orthotopic floor-of-mouth model for locoregional growth and spread of human squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2007; 36(6): 363-70.