

# 沉默信息调节因子3促进肝癌细胞凋亡及其机制研究

陶颖<sup>1</sup> 陈娟<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>中国人民解放军第161医院, 武汉 430012; <sup>2</sup>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** 该文旨在探讨沉默信息调节因子3(sirtuin 3, SIRT3)对肝癌细胞凋亡的影响, 并研究SIRT3调节肝癌细胞凋亡的分子机制。运用流式细胞术检测SIRT3过表达对肝癌细胞系(SMMC-7721和SK-Hep-1)凋亡的影响; 通过siRNA靶向沉默SIRT3并检测SIRT3沉默对肝癌细胞凋亡的影响; 实时荧光定量PCR(Real-time PCR)分析SIRT3对Bcl-2家族成员mRNA水平的影响, 筛选受SIRT3调节的Bcl-2家族成员; Western blot进一步检测SIRT3对目标Bcl-2家族成员蛋白水平的影响; 流式细胞术分析目标Bcl-2家族成员在SIRT3诱导肝癌细胞凋亡中的作用。结果显示, SIRT3过表达促进肝癌细胞凋亡并引起Bax mRNA和蛋白水平升高; SIRT3沉默抑制肝癌细胞凋亡, 同时也抑制Bax蛋白水平表达, Bax沉默显著减少了SIRT3过表达细胞中的凋亡数目。该研究结果提示, SIRT3通过凋亡调节基因Bax诱导肝癌细胞凋亡。

**关键词** 肝细胞癌; 沉默信息调节因子3; Bax

## Silent Information Regulator 3 Promotes Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cells and Its Mechanism

Tao Ying<sup>1</sup>, Chen Juan<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>The People's Liberation Army 161 Hospital, Wuhan 430012, China; <sup>2</sup>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 (sirtuin 3, SIRT3) on the apoptosis of hepatocellular carcinoma (HCC) cells, and the molecular mechanism of SIRT3 regulating HCC cells apoptosis. The influence of SIRT3 overexpression on the apoptosis of HCC cells (SMMC-7721 and SK-Hep-1) was measured by flow cytometry (FCM). SIRT3 expression was downregulated by siRNA targeting SIRT3, then the apoptosis induced by siSIRT3 was detected by FCM. The effect of SIRT3 on the mRNA level of Bcl-2 family members was assayed by Real-time PCR. The protein level of targeting Bcl-2 family member was further tested by Western blot after SIRT3 overexpressed and knockdown. The role of Bcl-2 family members in the HCC cells apoptosis induced by SIRT3 was analyzed by FCM. Our results showed that SIRT3 overexpression promoted HCC cells apoptosis. SIRT3 silent inhibited HCC cells apoptosis. SIRT3 increased the mRNA and protein level of Bax. SIRT3 knockdown inhibited the expression of Bax protein. Bax knockdown significantly decreased the apoptosis ration in cells overexpressed SIRT3. Together, these data indicated that SIRT3 induced HCC cells apoptosis through apoptosis-regulatory gene *Bax*.

**Keywords** HCC; SIRT3; Bax

收稿日期: 2015-12-28 接受日期: 2016-07-06

国家自然科学基金(批准号: 81472271、81201282)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13883874026, E-mail: yixin\_xinyuan@163.com

Received: December 28, 2015 Accepted: July 6, 2016

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

\*Corresponding author. Tel: +86-13883874026, E-mail: yixin\_xinyuan@163.com

网络出版时间: 2016-08-11 13:06:16

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160811.1306.006.html>

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上最具侵袭力和最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>, 在亚洲其死亡率居恶性肿瘤的第二位。尽管手术治疗可以切除肿瘤组织, 但大部分病人在诊断为HCC时已是晚期, 并发生了肝内肝外转移, 不适合外科手术治疗。目前, 即使使用最有效的系统治疗方法, 如阿霉素<sup>[2-3]</sup>、索拉菲尼<sup>[4-5]</sup>, 也只能有限地延长患者的寿命。因此, 阐明HCC发生发展的机制, 研究抑制HCC细胞生长的基因对开发更有效的治疗HCC的方法具有重要的意义。

沉默信息调节因子(silent information regulator, siruin)家族是一组依赖烟碱腺嘌呤二核苷酸(NAD<sup>+</sup>)的III类组蛋白去乙酰化酶<sup>[6]</sup>。人类siruin家族有7个成员, 即SIRT1~7, 它们参与了体内多种生物学进程, 如凋亡、应激反应、DNA修复、细胞周期、代谢和老化等<sup>[7]</sup>, 其作用与癌症、糖尿病、心血管疾病和神经退行性变等疾病的进展密切相关<sup>[8]</sup>。目前, SIRT1是研究得最为深入的siruin家族成员。近年来, SIRT3的功能也逐渐引起了研究人员的重视。研究表明, SIRT3是线粒体内主要的去乙酰化酶, 调节了线粒体代谢和氧化应激调节通路<sup>[9-11]</sup>, SIRT3通过抑制低氧诱导因子1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , HIF1 $\alpha$ )和活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生, 参与了肿瘤的进展<sup>[12-13]</sup>。线粒体信号通路在细胞凋亡过程中具有重要的作用, SIRT3作为一种线粒体蛋白, 参与了食管鳞状细胞癌<sup>[14]</sup>、非小细胞肺癌<sup>[15]</sup>、上皮细胞癌<sup>[16]</sup>、结肠癌和骨肉瘤<sup>[17]</sup>等癌细胞的凋亡过程。然而, 目前关于SIRT3是否参与了HCC细胞的凋亡却鲜有报道, SIRT3调节HCC细胞凋亡的分子机制也尚未明确。本研究将阐明SIRT3与HCC细胞凋亡的关系, 并进一步探讨SIRT3调节HCC细胞凋亡的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SMCC-7721、SK-Hep-1细胞系购于ATCC(American Type Culture Collection)。pcDNA3.1及SIRT3质粒购于Addgene公司。靶向沉默SIRT3表达的siRNA由Invitrogen公司合成。SIRT3抗体(#3627)和Bax抗体(#5023)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抗体及辣根过氧化物酶标记羊抗鼠IgG

购于北京中杉金桥生物技术有限公司。BCA试剂盒购于碧云天生物技术有限公司。质粒转染试剂(06366546001)购于Roche公司。siRNA转染试剂Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Transfection Reagent(11668-019)购于Invitrogen公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养和转染** 以上细胞均培养于含有10% FBS、1%青霉素/链霉素的DMEM培养基中, 在5% CO<sub>2</sub>、37 °C孵箱中常规培养。质粒转染和siRNA转染严格按照试剂说明书操作。转染质粒时首先将2  $\mu$ g质粒与6  $\mu$ L质粒转染试剂混匀, 静置15 min后均匀滴加于6孔板中, 3 d后检测质粒过表达水平及细胞凋亡发生率等。siRNA转染时, 先将100 pmol/L siRNA稀释于250  $\mu$ L opti-MEM中, 再将10  $\mu$ L siRNA转染试剂稀释于另外的250  $\mu$ L opti-MEM中静置5 min, 充分混匀稀释的siRNA和siRNA转染试剂, 静置20 min, 然后均匀滴加于6孔板中。3 d后检测siRNA沉默水平及细胞凋亡水平等。质粒和siRNA共转染采用Lipofectamine<sup>®</sup> 2000转染试剂。首先, 将2  $\mu$ g质粒和50 pmol/L siRNA稀释于250  $\mu$ L opti-MEM中。其次, 将10  $\mu$ L转染试剂稀释于另外的250  $\mu$ L opti-MEM中, 静置5 min, 充分混匀稀释的质粒、siRNA和转染试剂, 静置20 min。然后, 均匀滴加于6孔板中, 3 d后检测质粒过表达及siRNA沉默水平。

**1.2.2 Western blot检测** 收集细胞, 用PBS洗涤2次后, 加入相应体积RIPA裂解缓冲液, 裂解15 min后离心收集裂解液, 用BCA法测定蛋白浓度。取等量(30  $\mu$ g)细胞总蛋白上样, 于10% SDS-PAGE中分离蛋白后, 在Bio-Rad湿式转移电泳槽中, 以90 V电转膜4 h。将转移好的NC膜用5%脱脂奶粉封闭1 h。将经过封闭处理的NC膜孵育于一抗(以封闭液1:2 000稀释一抗), 4 °C摇床孵育过夜, 第2 d将NC膜用TBST洗涤3次, 每次10 min, 室温下摇床孵育二抗2 h, 再用TBST洗涤3次后, ECL显影。以GAPDH为内参。

**1.2.3 实时荧光定量PCR** 细胞转染3 d后, 用Trizol裂解细胞, 提取RNA。DNase I(New England Biolabs)处理样品后采用iScript<sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit(Bio-Rad公司)将RNA逆转录成cDNA, 随后使用FastStart Universal SYBR Green Master Mix(Roche公司)进行Real-time PCR, 以 $\beta$ -actin为内参。每组实验重复3次, 以2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup> 计算目的基因的相对表达水平。

1.2.4 细胞凋亡检测 细胞转染3 d后,按照 Annexin V细胞凋亡检测试剂盒(Invitrogen公司)说明书检测细胞凋亡。在 $1 \times 10^5$ 细胞中加入100  $\mu$ L膜联蛋白结合液(annexin-binding buffer),再加入5  $\mu$ L Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 annexin V和1  $\mu$ L 100  $\mu$ g/mL碘化丙啶染色液(PI working solution),避光孵育15 min,最后加入400  $\mu$ L annexin-binding buffer,混匀后送流式细胞仪检测细胞凋亡。

### 1.3 统计分析

采用SPSS 17.0软件进行统计,两样本均数间的比较采用配对*t*检验,多样本均数间的比较采用单因素方差分析,所有试验数据以平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ S.D.)表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SIRT3过表达对肝癌细胞凋亡的影响

在前期的预实验中我们发现,SIRT3在SMMC-

7721和SK-Hep-1细胞中的表达水平显著低于人类正常肝细胞。因此,我们在这两个细胞系中分析了SIRT3对肝癌细胞凋亡的影响。首先,我们在SMMC-7721和SK-Hep-1细胞中瞬时转染了SIRT3过表达质粒和对照质粒,3 d后,提取细胞总蛋白,通过Western blot证实SIRT3成功过表达(图1)。运用流式细胞术检测发现转染Vector和SIRT3后,SMMC-7721细胞凋亡率分别为(8.27 $\pm$ 0.99)%和(21.42 $\pm$ 3.14)%,SK-Hep-1细胞凋亡率分别为(8.45 $\pm$ 1.37)%和(24.06 $\pm$ 2.83)%。这些数据说明,过表达SIRT3显著促进了SMMC-7721和SK-Hep-1细胞凋亡( $P < 0.05$ ,图2)。

### 2.2 SIRT3沉默对肝癌细胞凋亡的影响

为了确认以上发现,我们在SMMC-7721和SK-Hep-1细胞中转染了靶向沉默SIRT3表达的siRNA(siSIRT3)及siCont,3 d后,提取细胞总蛋白,通过Western blot证实SIRT3的沉默是有效的(图3)。同时,运用流式细胞术检测凋亡发现,转染

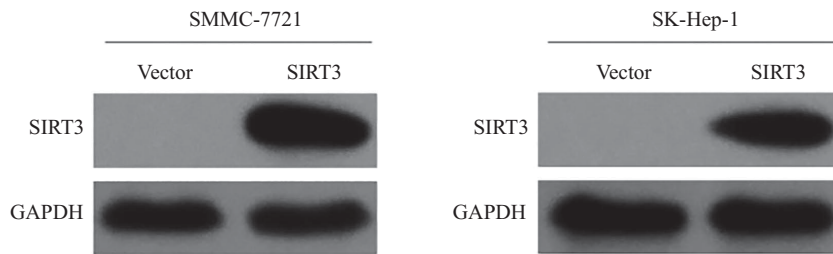
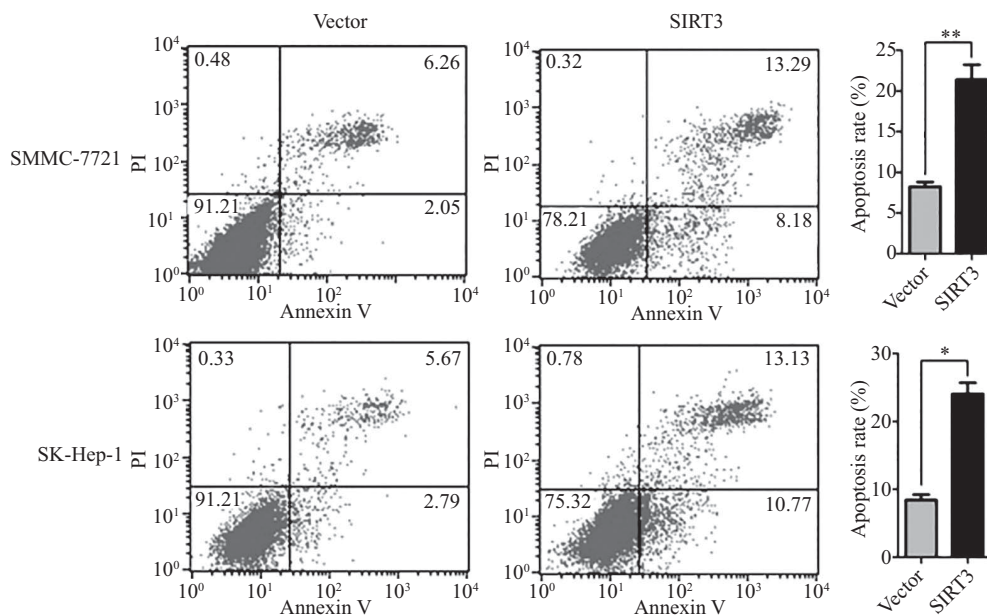


图1 Western blot检测SMMC-7721和SK-Hep-1细胞中SIRT3的过表达水平

Fig.1 The overexpressions of SIRT3 in SMMC-7721 and SK-Hep-1 cells measured by Western blot



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

图2 流式细胞术检测SIRT3过表达对SMMC-7721和SK-Hep-1细胞凋亡的影响

Fig.2 The effect of SIRT3 overexpression on the apoptosis of SMMC-7721 and SK-Hep-1 cells determined by flow cytometry

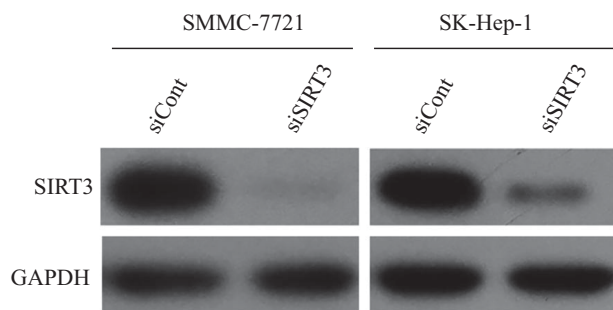


图3 Western blot检测SMMC-7721和SK-Hep-1细胞中SIRT3的沉默效果

Fig.3 The efficiency of SIRT3 knockdown in SMMC-7721 and SK-Hep-1 cells measured by Western blot

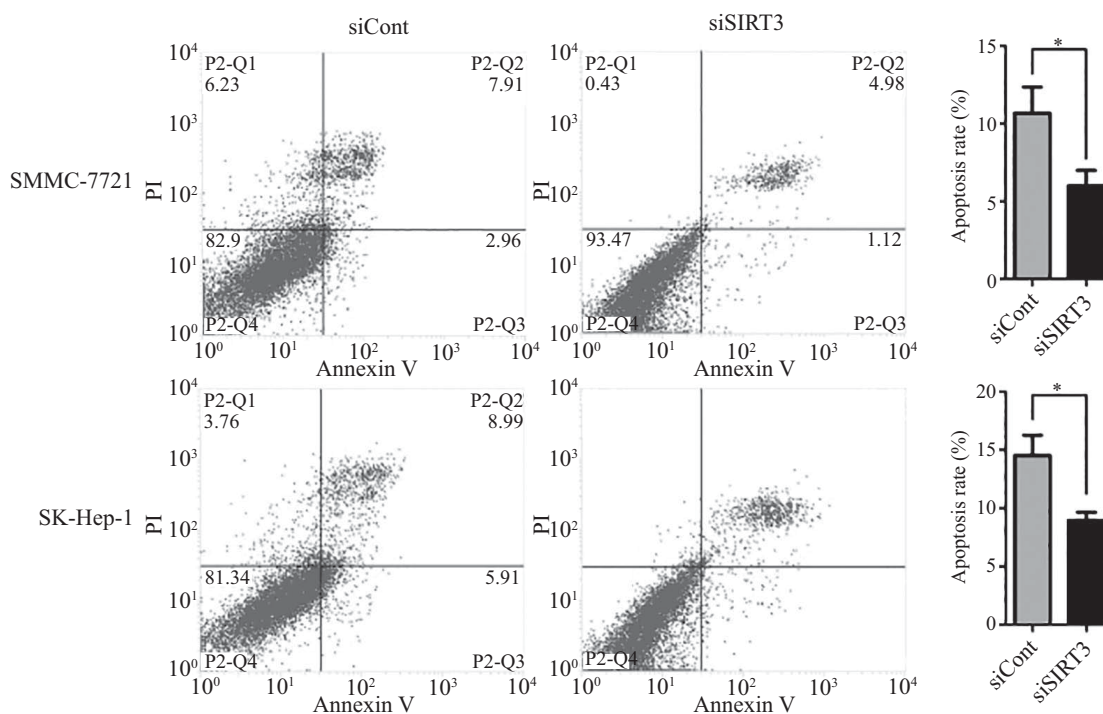
\* $P < 0.05$ .

图4 流式细胞术检测SIRT3沉默对SMMC-7721和SK-Hep-1细胞凋亡的影响

Fig.4 The effect of SIRT3 knockdown on the apoptosis of SMMC-7721 and SK-Hep-1 cells determined by flow cytometry

siCont和siSIRT3后, SMMC-7721细胞凋亡率分别为(10.66±2.91)%、(5.99±2.71)%, SK-Hep-1细胞中细胞凋亡率分别为(14.50±3.04)%、(8.95±1.19)%。以上结果说明, SIRT3沉默可以明显抑制SMMC-7721和SK-Hep-1细胞凋亡( $P < 0.05$ , 图4)。以上数据揭示, SIRT3可明显促进肝癌细胞凋亡。

### 2.3 SIRT3对肝癌细胞中Bax表达的影响

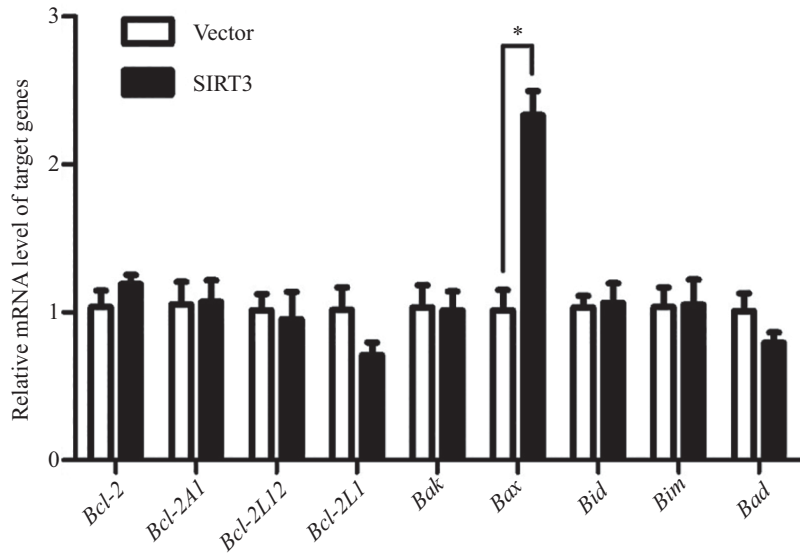
线粒体信号通路在肝癌细胞凋亡过程中发挥着关键的调节作用, 而Bcl-2家族是线粒体凋亡通路的重要调节因子。为了阐明SIRT3调节肝癌细胞凋亡的分子机制, 我们用Real-time PCR在SK-Hep-1细胞中检测了Bcl-2家族基因的表达, 发现当转染

Vector和SIRT3后, *Bax* mRNA水平相对值分别为1.01±0.24和2.33±0.28, 过表达SIRT3使*Bax* mRNA水平明显升高( $P < 0.05$ )。而对其他Bcl-2家族成员的mRNA表达未见显著影响(图5)。同时, 我们用Western blot检测发现, 过表达SIRT3可以显著增高SMMC-7721和SK-Hep-1细胞中Bax的蛋白表达水平(图6), SIRT3沉默可以明显抑制SMMC-7721和SK-Hep-1细胞中Bax的蛋白表达水平(图7)。

### 2.4 SIRT3通过促进Bax信号通路诱导肝癌细胞凋亡

为确定SIRT3是否通过Bax信号通路促进肝癌细胞凋亡, 我们在SK-Hep-1细胞中过表达了SIRT3,





\* $P < 0.05$ .

图5 Real-time PCR分析过表达SIRT3对SK-Hep-1细胞中Bcl-2家族基因mRNA水平表达的影响  
Fig.5 The effect of overexpression SIRT3 on the mRNA expression level of Bcl-2 family in SK-Hep-1 cells analyzed by Real-time PCR

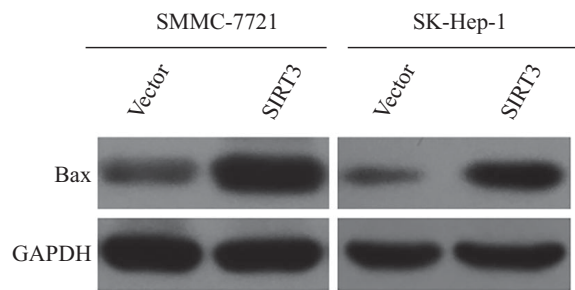


图6 Western blot检测在SMMC-7721和SK-Hep-1细胞中过表达SIRT3对Bax蛋白水平表达的影响  
Fig.6 The effect of overexpression SIRT3 on the protein expression level of Bax in SMMC-7721 and SK-Hep-1 cells determined by Western blot

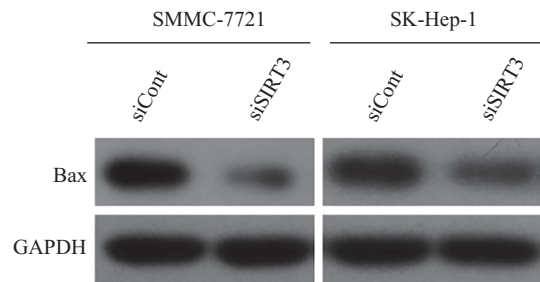


图7 Western blot检测在SMMC-7721和SK-Hep-1细胞中SIRT3沉默对Bax蛋白水平表达的影响  
Fig.7 The effect of SIRT3 knockdown on the protein expression level of Bax in SMMC-7721 and SK-Hep-1 cells determined by Western blot

并同时沉默了Bax的表达。Western blot证实, SIRT3的过表达和Bax的沉默都是有效的, 而且SIRT3过表达时Bax的表达增加(图8)。流式细胞术检测结果显示, SK-Hep-1细胞中共转染Vector和siCont、SIRT3

和siCont、SIRT3和siBax、Vector和siBax后, 细胞凋亡发生率分别为 $(9.34 \pm 2.65)\%$ 、 $(23.01 \pm 4.08)\%$ 、 $(10.59 \pm 2.53)\%$ 和 $(8.91 \pm 1.15)\%$ 。分析后发现, SIRT3过表达导致SK-Hep-1细胞凋亡发生率明显增加, 而

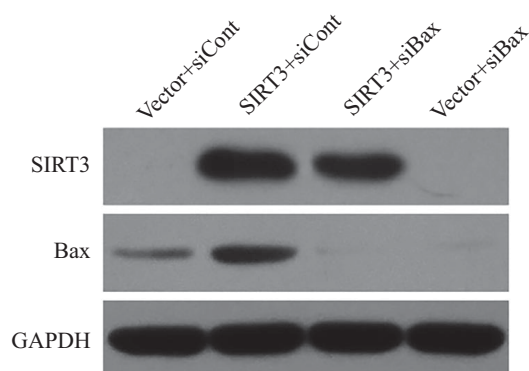
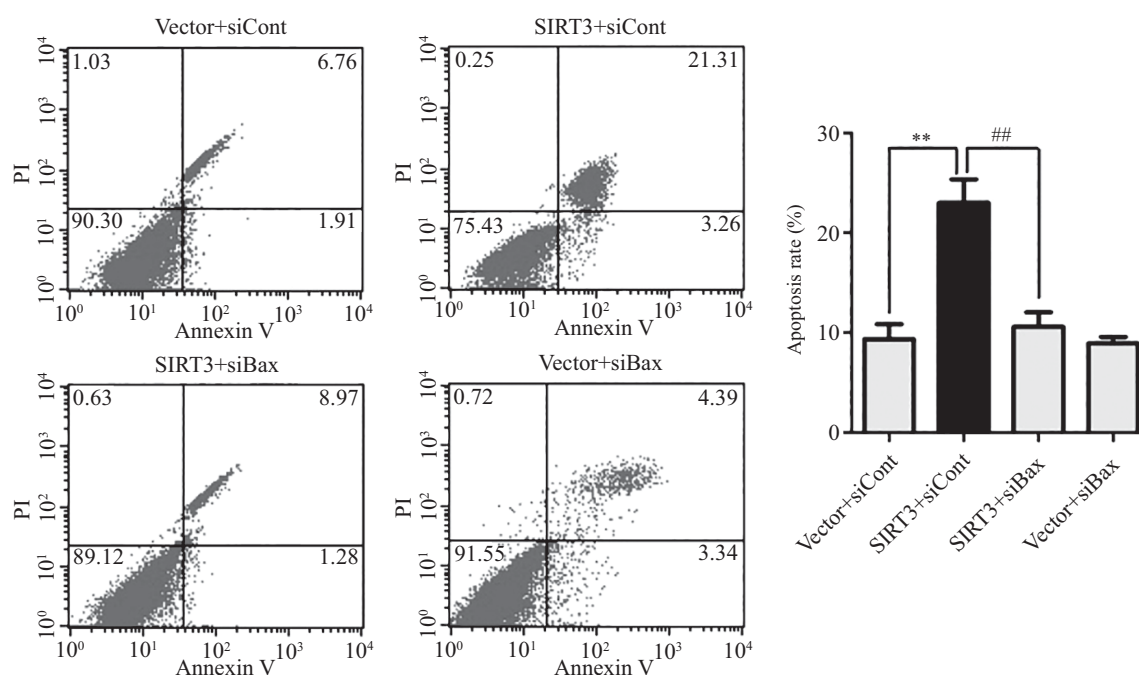


图8 Western blot检测SK-Hep-1细胞中SIRT3过表达及Bax沉默的效果

Fig.8 The efficiency of SIRT3 overexpression and Bax knockdown in SK-Hep-1 cells detected by Western blot



\*\* $P < 0.01$ , SIRT3+siCont组与Vector+siCont组相比较; # $P < 0.01$ , SIRT3+siCont组与SIRT3+siBax组相比较。

\*\* $P < 0.01$ , SIRT3+siCont group compared with Vector+siCont group; # $P < 0.01$ , SIRT3+siCont group compared with SIRT3+siBax group.

图9 流式细胞术分析Bax沉默对SIRT3诱导的SK-Hep-1细胞凋亡的影响

Fig.9 The effect of Bax knockdown on the apoptosis of SK-Hep-1 cells induced by SIRT3 analyzed by flow cytometry

当Bax沉默时SK-Hep-1细胞的凋亡发生率则明显减少( $P < 0.01$ , 图9)。结果说明, Bax沉默拮抗了SIRT3所诱导的肝癌细胞凋亡, SIRT3可能通过促进Bax信号通路诱导肝癌细胞凋亡。

### 3 讨论

目前, SIRT3在细胞凋亡过程中的作用是富有争议的。一些研究结果揭示, SIRT3具有抗凋亡的作用。有研究发现, SIRT3通过去乙酰化8-羟基鸟嘌呤DNA糖苷酶1(oxoguanine glycosylase 1, OGG1)

在线粒体DNA损伤修复和抗凋亡细胞死亡中发挥了关键作用<sup>[18]</sup>。在食管鳞状细胞癌中, SIRT3表达下调可能通过p21/Bcl-2/Bax信号通路诱导了细胞凋亡<sup>[19]</sup>。Sundaresan等<sup>[20]</sup>发现, SIRT3可以保护心肌细胞免受氧化应激和基因毒性反应诱导的细胞死亡, 有利于细胞存活。在人间充质干细胞(young human mesenchymal stromal/stem cells, hMSCs)中, 过表达SIRT3可以增加hMSCs对氧化应激反应的抵抗, 降低细胞凋亡<sup>[21]</sup>。而另一些研究结果揭示, SIRT3具有促凋亡的作用。Marfe等<sup>[22]</sup>报道山奈酚

(kaempferol,一种黄酮类化合物)在白血病细胞中通过增加Bax、SIRT3的表达和活化caspase-3诱导了氧化应激和细胞凋亡。在肺腺癌细胞A549中, SIRT3增加了Bax/Bcl-2和Bad/Bcl-xL的比值, 促进了凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)的核定位, 进而诱导了细胞凋亡<sup>[23]</sup>。我们认为, SIRT3发挥抗凋亡还是促凋亡的作用可能取决于不同的组织细胞系或刺激因子所激活的信号通路。在我们的研究中发现, SIRT3过表达促进了HCC细胞凋亡, SIRT3沉默抑制了HCC细胞凋亡。

我们进一步的研究结果显示, SIRT3激活了HCC细胞中的线粒体凋亡信号通路。已知多种蛋白参与了线粒体凋亡的调节, 特别是Bcl-2家族蛋白在其中发挥了重要的作用。Bcl-2家族包括了至少20个成员, 分别具有促凋亡或抗凋亡的作用<sup>[24]</sup>, 其中, Bax位于细胞不可逆损伤通路的上游, 调节线粒体凋亡反应。在死亡刺激物作用时, Bax被活化, 并从细胞核转位到线粒体, 进而启动线粒体介导的凋亡<sup>[25]</sup>。本研究发现, 在HCC细胞中过表达SIRT3促进了Bax mRNA和蛋白水平的升高。据文献报道, GSK-3 $\beta$ 是Bax凋亡信号通路常见的激活激酶, 可以促进Bax的表达和活化<sup>[26-27]</sup>。因此, 我们推测, SIRT3可能通过GSK-3 $\beta$ 间接调节了Bax的表达, 但这一假设仍然需要多种实验进一步验证。为深入分析Bax在SIRT3诱导肝癌细胞凋亡中的作用, 我们沉默了Bax的表达, 实验数据证实, Bax沉默能部分拮抗SIRT3过表达所诱导的细胞凋亡。这些结果揭示, Bax活化可能是SIRT3诱导HCC细胞凋亡的分子机制。综上所述, 本研究为HCC靶向治疗的发展提供了新的策略。

### 参考文献 (Referances)

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132(7): 2557-76.
- Yeo W, Mok TS, Zee B, Leung TW, Lai PB, Lau WY, *et al.* A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(20): 1532-8.
- Fornier A, Hessheimer AJ, Isabel Real M, Bruix J. Treatment of hepatocellular carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 60(2): 89-98.
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, *et al.* Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359(4): 378-90.
- Imai S, Armstrong C M, Kaeberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 2000; 403(6771): 795-800.
- Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13(4): 225-38.
- Bosch-Presegue L, Vaquero A. The dual role of sirtuins in cancer. *Genes Cancer* 2011; 2(6): 648-62.
- Yu WP, Scott SA, Dong WF. Induction of ID1 expression and apoptosis by the histone deacetylase inhibitor (trichostatin A) in human acute myeloid leukaemic cells. *Cell Prolif* 2008; 41: 86-97.
- Schnur N, Seuter S, Katryniok C, Rådmark O, Steinhilber D. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A mediates upregulation of 5-lipoxygenase promoter activity by recruitment of Sp1 to distinct GC-boxes. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1771(10): 1271-82.
- Zhang QC, Jiang SJ, Zhang S, Ma XB. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A enhances anti-tumor effects of docetaxel or erlotinib in A549 cell line. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(7): 3471-6.
- Fenic I, Hossain HM, Sonnack V, Tchatalbachev S, Thierer F, Trapp J, *et al.* *In vivo* application of histone deacetylase inhibitor trichostatin-a impairs murine male meiosis. *J Androl* 2008; 29(2): 172-85.
- Campanero MR, Herrero A, Calvo V. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces GADD45 gamma expression via Oct and NF-Y binding sites. *Oncogene* 2008; 27(9): 1263-72.
- Yang M, Yang C, Pei Y. Effects of downregulation of SIRT3 expression on proliferation and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma EC9706 cells and its molecular mechanisms. *Biomed Mater Eng* 2014; 24(6): 3883-90.
- Li H, Feng Z, Wu W, Li J, Zhang J, Xia T. SIRT3 regulates cell proliferation and apoptosis related to energy metabolism in non-small cell lung cancer cells through deacetylation of NMNAT2. *Int J Oncol* 2013; 43(5): 1420-30.
- Allison SJ, Milner J. SIRT3 is pro-apoptotic and participates in distinct basal apoptotic pathways. *Cell Cycle* 2007; 6(21): 2669-77.
- Wang JX, Yi Y, Li YW, Cai XY, He HW, Ni XC, *et al.* Down-regulation of sirtuin 3 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma after resection. *BMC Cancer* 2014; 14: 297.
- Cheng Y, Ren X, Gowda AS, Shan Y, Zhang L, Yuan YS, *et al.* Interaction of Sirt3 with OGG1 contributes to repair of mitochondrial DNA and protects from apoptotic cell death under oxidative stress. *Cell Death Dis* 2013; 4: e731.
- Yang M, Yang C, Pei Y. Effects of downregulation of SIRT3 expression on proliferation and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma EC9706 cells and its molecular mechanisms. *Biomed Mater Eng* 2014; 24(6): 3883-90.
- Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, Rajamohan SB, Gupta MP. SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by

- deacetylation of Ku70. *Mol Cell Biol* 2008; 28(20): 6384-401.
- 21 Wang XQ, Shao Y, Ma CY, Chen W, Sun L, Liu W, *et al.* Decreased SIRT3 in aged human mesenchymal stromal/stem cells increases cellular susceptibility to oxidative stress. *J Cell Mol Med* 2014; 18(11): 2298-310.
- 22 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.
- 23 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.
- 24 Fabregat I, Roncero C, Fernandez M. Survival and apoptosis: Adysregulated balance in liver cancer. *Liver* 2007; 27(2): 155-62.
- 25 Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813(4): 521-31.
- 26 Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci* 2004; 24(44): 9993-10002.
- 27 Zhang L, Zhang Y, Xing D. LPLI inhibits apoptosis upstream of Bax translocation via a GSK-3beta-inactivation mechanism. *J Cell Physiol* 2010; 224(1): 218-28.