

· 论 著 ·

SUMO-1 基因在肝癌中的表达及意义*

郭武华¹,袁丽华²,肖志华²,张吉翔^{2△}

(南昌大学第二附属医院:1.肿瘤科;2.消化科 330006)

摘要:目的 研究肝癌传代细胞、肝癌标本及癌旁肝组织中 SUMO-1 基因的表达及意义。方法 采用 RT-PCR、Western blot 方法在 mRNA 及蛋白水平检测肝癌传代细胞、肝癌标本及癌旁肝组织中 SUMO-1 基因的表达。结果 在 mRNA 及蛋白水平, SUMO-1 基因在肝癌传代细胞 SMMC-7721、Hep3B、HepG2 及肝癌标本中均明显高表达,而癌旁肝组织中 SUMO-1 基因明显低表达,肝癌组织和癌旁肝组织中 SUMO-1 表达差异有统计学意义($P < 0.001$)。结论 SUMO-1 基因在肝癌中高表达, SUMO-1 可能为肝癌诊断和治疗中的一个靶点。

关键词:SUMO-1;基因表达;肝癌

中图分类号:R735.7

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2009)24-3115-03

Expression and clinical significance of SUMO-1 in hepatocellular carcinoma

GUO Wu-hua¹, YUAN Li-hua², XIAO Zhi-hua², et al.

(1. Department of Oncology; 2. Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and clinical significance of SUMO-1 in SMMC-7721, HepG2, Hep3B, hepatocellular carcinomas (HCC) and liver tissues surrounding HCC. **Methods** The mRNA and protein of SUMO-1 in SMMC-7721, HepG2, Hep3B, HCCs and liver tissue surrounding HCCs were examined by means of RT-PCR and Western blot. **Results** The expression level of SUMO-1 mRNA and protein elevated significantly in SMMC-7721, HepG2, Hep3B and hepatocellular carcinoma tissues. Although the quantities of SUMO-1 mRNA and protein varied in liver tissues surrounding HCC, there was a significant difference between hepatocellular carcinoma tissues and their surrounding liver tissues ($P < 0.001$). **Conclusion** The expression of SUMO-1 in HCCs shows marked contrast enhancement relative to the liver tissues surrounding HCC. SUMO-1 may be an interesting target in the diagnosis and treatment of HCC.

Key words: SUMO-1; Gene express; Hepatocellular carcinoma

泛素样小分子修饰因子 (small ubiquitin-like modifier, SUMO) 是泛素样蛋白 (ubiquitin-like protein, Ublp) 家族中的一员, 主要作用为参与蛋白翻译后功能的修饰。和泛素的作用不同, SUMO 修饰 (SUMOylation) 不是引起靶蛋白的降解, 而是调节靶蛋白的功能, 在转录、DNA 修复、核质物质转运及染色体分离等方面发挥重要的作用^[1-2]。SUMO-1 是 SUMO 家族成员之一, SUMO-1 修饰可抑制 p53 基因的活性^[3-4], 促使癌症的发生、发展和转移^[5]。本实验通过研究 SUMO-1 基因在肝癌细胞株、临床肝癌标本及癌旁肝组织中的表达水平, 探讨 SUMO-1 基因在肝癌诊断和治疗中的价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系和细胞培养 肝癌细胞株 SMMC-7721、HepG2 和 Hep3B, 由本院分子实验室提供。细胞培养: SMMC-7721 培养在含 10% 胎牛血清 (PAA)、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 培养箱条件为 37 °C, 饱和湿度, 5% CO₂; HepG2 和 Hep3B 培养在含 10% 胎牛血清 (PAA)、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 MEM 培养液中, 培养箱条件为 37 °C, 饱和湿度, 5% CO₂。

1.1.2 标本来源 肝癌组织及癌旁肝组织来自本院肝胆外科 2007 年 11 月至 2009 年 3 月切除的肝癌病例, 肝细胞性肝癌。共收集到 26 例标本, 男 22 例, 女 4 例。

1.1.3 仪器设备 PCR 热循环仪 (GeneAmp® PCR System 9600), Western blot 仪器 (Bio-Rad), GeneGenius Match (Syn-gene) 全自动凝胶成像分析系统。

1.1.4 主要试剂 RNA 提取试剂 Trizol (Invitrogen); RT-PCR 试剂: Oligo(dT) (Promega), M-MLV RT 5 × buffer (Promega), dNTP (Generay Biotech), Rnase 抑制剂 (Promega), M-MLV 逆转录酶 (Promega), Master Mix (2 × Taq PCR) (Tiangen), DNA ladder (Tiangen); Western blot 试剂: 总蛋白提取试剂 (applygen), 人 SUMO-1 一抗 (兔多克隆抗体, ABZOOM), 人 β-actin 一抗 (兔多克隆抗体, Santa Cruz)、二抗 (羊抗兔, ZSGB-B10)。

1.1.5 PCR 引物 从网址 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 的 GenBank 中获得人 SUMO-1 和 β-actin 基因序列, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 由 Generay Biotech 公司合成, 各引物序列, 见表 1。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 法检测各组细胞、组织 SUMO-1 和 β-actin mRNA 的表达 采用 Trizol 提取 SMMC-7721、HepG2、Hep3B、肝癌组织及癌旁肝组织总 RNA, 合成 cDNA。PCR 扩增每组 SUMO-1 基因的表达, 以 β-actin 作为内参照。SUMO-1 PCR 第一阶段通过 94 °C 5min 预变性, 然后 94 °C 35s、51 °C 35s、72 °C 35s 30 个循环, 第三阶段 72 °C 延迟延

* 基金项目: 江西省教育厅基金资助项目 (NO. GJJ09107)。△ 通讯作者, E-mail: jixiangz@tom.com。

表 1 PCR 反应引物

基因	引物	引物序列	产物长度(bp)
SUMO-1	Sense	5'-AGGAGGCAAAACCTTCAACT -3'	245
	Anti-sense	5'-TTCTTCTCCATTCCCAGTT-3'	
β -actin	Sense	5'-ACACTGTGCCATCTACGAGG -3'	621
	Anti-sense	5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3'	

伸 7min。 β -actin PCR 第一阶段通过 94℃ 5min 预变性,然后 94℃ 35s,54℃ 35s,72℃ 35s 30 个循环,第三阶段 72℃ 延迟延伸 7min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳(含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭),在紫外线灯下观察结果,通过 GeneGenius Match 全自动凝胶成像分析系统测条带的灰度值。各组 SUMO-1 的表达量为 SUMO-1 密度值与各自 β -actin 灰度值的比值。

1.2.2 Western Blot 法检测各组细胞、组织 SUMO-1 和 β -actin 蛋白的表达 将细胞、组织裂解,提取总蛋白。SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白通过电转移至硝酸纤维素膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 2h,一抗孵育过夜,二抗孵育 2h,电化学发光试剂显色,经曝光、显影、定影后通过 GeneGenius Match 全自动凝胶成像分析系统测条带的灰度值。以各自 β -actin 值为参照,计算 SUMO-1 蛋白的表达量。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 12.0 统计软件进行数据处理。

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测 SMMC-7721、HepG2、Hep3B、肝癌组织及癌旁肝组织 SUMO-1 mRNA 的表达情况,结果显示 SMMC-7721、HepG2、Hep3B(图 1)及肝癌组织(图 2)中 SUMO-1 基因均显著高表达,而癌旁肝组织中 SUMO-1 基因表达明显较低(图 3)。26 例临床标本肝癌中 SUMO-1/ β -actin 灰度值比的均数为 1.80 \pm 0.35,而癌旁肝组织中 SUMO-1/ β -actin 灰度值比的均数为 0.28 \pm 0.11,两组差异有统计学意义($P < 0.001$),肝癌中 SUMO-1 mRNA 的表达明显高于癌旁肝组织。

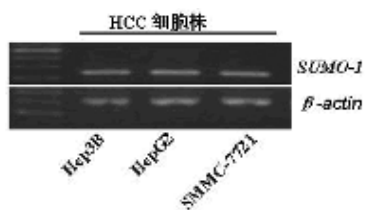


图 1 SMMC-7721、HepG2 及 Hep3B 中 SUMO-1 mRNA 的表达水平

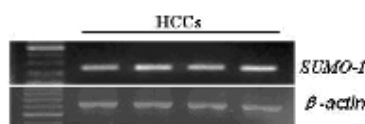


图 2 肝癌组织中 SUMO-1 mRNA 的表达水平

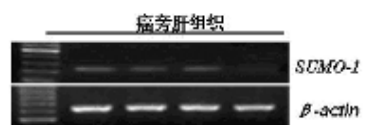


图 3 癌旁肝组织中 SUMO-1 mRNA 的表达

2.2 Western blot 检测 SMMC-7721、HepG2、Hep3B、肝癌组织及癌旁肝组织 SUMO-1 蛋白的表达情况,结果显示 SMMC-

7721、HepG2、Hep3B(图 4)及肝癌组织(图 5)中 SUMO-1 蛋白的表达量明显较高,而癌旁肝组织(图 6)中 SUMO-1 蛋白表达明显较低。肝癌中 SUMO-1/ β -actin 灰度值比的均数为 0.715 \pm 0.082,而癌旁肝组织中 SUMO-1/ β -actin 灰度值比的均数为 0.189 \pm 0.0714,两组差异有统计学意义($P < 0.001$)。

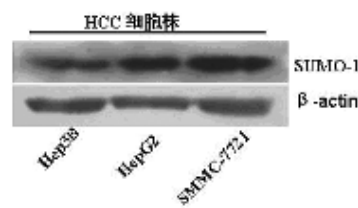


图 4 SMMC-7721、HepG2 及 Hep3B 中 SUMO-1 蛋白的表达水平

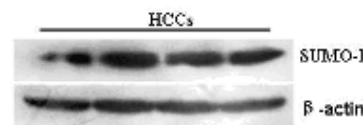


图 5 肝癌组织 SUMO-1 蛋白的表达水平

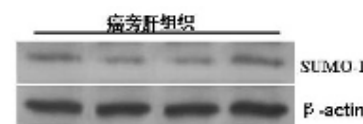


图 6 癌旁肝组织 SUMO-1 蛋白的表达水平

3 讨 论

3.1 SUMO-1 是 SUMO 家族中的一员,SUMO 在进化中高度保守,目前在脊椎动物中至少发现 4 种 SUMO 家族蛋白,分别是 SUMO-1、SUMO-2、SUMO-3 和 SUMO-4。SUMO-2 和 SUMO-3 结构有 96% 相同,而 SUMO-2/3 和 SUMO-1 仅有 46% 的结构是相同的^[1]。SUMO 家族蛋白在 C 末端均有一个向外突出的结构,而泛素没有,但不同的 SUMO 家族成员突出结构的氨基酸序列是不同的^[6]。和泛素一样,SUMO 蛋白主要参与蛋白翻译后功能的修饰(SUMOylation)。SUMO 和泛素竞争结合同一底物的同一个作用点^[7],因此被 SUMO 修饰的蛋白不能再和泛素结合。和其他泛素样蛋白功能不同,SUMO 结合到靶蛋白后不是引靶蛋白降解,而是通过和靶蛋白共价结合后调节靶蛋白的功能。SUMO 修饰的底物蛋白非常广泛,参与多种蛋白翻译后功能的调节。SUMO 修饰包括活化、结合、连接和解离,涉及多个酶多个步骤的催化过程。SUMO 的前体蛋白在蛋白酶的水解作用下形成成熟的 SUMO 分子,SUMO 在 SUMO 催化酶的 E1 作用下形成硫酯键,然后 SUMO 被转移到 SUMO 结合酶 E2(Ubc9),结合到靶蛋白。SUMO 连接酶 E3 通过加速 Ubc9 结合到底物蛋白或提供一个区域促进 Ubc9 和底物蛋白间的相互作用^[8]。SUMO 共价修

饰底物是动态可逆的过程^[9],目前已发现多种类似酵母 Ubl1 样的蛋白酶,称为 SENP (Sentrin-specific protease, SENP),具有保守的半胱氨酸蛋白酶结构域,和 SUMO 蛋白的成熟和功能调节有关^[10]。SUMO 修饰还受靶蛋白翻译后其他修饰因素的影响,SUMO 修饰和磷酸化是两个对立的生化过程,但磷酸化对 SUMO 修饰也可产生积极的调节作用^[1,11]。

3.2 SUMO 修饰和肿瘤关系密切,可促进癌症的发生、发展和转移^[12]。增殖细胞核抗原(PCNA)在细胞增殖的启动上起重要作用,是反映细胞增殖状态的良好指标。在酿酒酵母,PCNA 被 SUMO E3 连接酶 siz1 修饰,促进染色体重排的发生^[13]。染色体重排是导致遗传不稳定的重要原因之一,遗传不稳定可导致抑癌基因的失活和原癌基因的激活,这说明 SUMO 修饰可能是肿瘤发生的促进因素之一。端粒延长是恶性肿瘤细胞的特征表现之一,SUMO 修饰对端粒长度的维持的主要机制端粒酶和同源重组两种途径均起重要的调节作用^[14-15],因此 SUMO 对肿瘤的发生及发展有重要影响。在乳腺癌,SUMO 蛋白影响雌激素受体对转录辅助因子复合物的信号级联反应^[16],表皮生长因子刺激可快速改变 SUMO 修饰底物的变化^[17],提示 SUMO 修饰和肿瘤信号转导通路、生长控制密切相关。NF-kappa B 家族成员在调节机体免疫、细胞生存、肿瘤发展及化疗抵抗中发挥重要的作用,许多因素和 NF-kappa B 的调节有关,包括磷酸化、乙酰化、亚硝基化及泛素化。近来发现,SUMO 修饰在 NF-kappa B 信号调节中发挥重要作用^[18]。

3.3 肿瘤的形成和发展是一个多步骤、多阶段过程,这其中有多种癌基因、抑癌基因、抗凋亡基因、逆转录酶等的激活和凋亡^[19]。肝癌是消化系统常见的恶性肿瘤,临床治疗效果仍然很差。肝癌发病的分子机制目前还远未弄清,许多癌基因的激活和抑癌基因的失活或突变与肝癌的发生有关。作为一个重要的调节基因,SUMO 参与许多蛋白功能的调节,调节肿瘤的发生、发展和转移。通过对肝癌细胞株及临床肝癌标本进行 SUMO-1 mRNA 及蛋白检测可以看到,SUMO-1 mRNA 及蛋白的表达在细胞和组织中同步,在 mRNA 及蛋白水平肝癌细胞株及临床肝癌标本 SUMO-1 基因的表达明显高于癌旁肝组织。从 SUMO-1 基因在肝癌及肝癌细胞中高表达而在癌旁肝组织中低表达可以推测,SUMO-1 基因和肝癌的发生、发展存在明显的相关性,SUMO-1 基因可能是诊断和治疗肝癌的一个的靶点。

参考文献:

- [1] Di Bacco A, Ouyang J, Lee HY, et al. The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell division [J]. *Mol* 2006, 26(12):4489.
- [2] Martin S, Nishimune A, Mellor JR, et al. SUMOylation regulates kainate-receptor-mediated synaptic transmission [J]. *Nature*, 2007, 447(7142):321.
- [3] Buschmann T, Fuchs SY, Lee CG, et al. SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53 [J]. *Cell*, 2000, 101(7):753.
- [4] Carter S, Bischof O, Dejean A, et al. C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53 [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(4):428.
- [5] Kim KI, Baek SH. SUMOylation code in cancer development and metastasis [J]. *Mol Cells*, 2006, 22(3):247.
- [6] Johnson ES. Protein modification by SUMO [J]. *Annu Rev Biochem*, 2004, 73:355.
- [7] Ulrich HD. Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems; a plea of no contest [J]. *Trends Cell Biol*, 2005, 15(10):525.
- [8] Anckar J, Hietakangas V, Denessiouk K, et al. Inhibition of DNA binding by differential sumoylation of heat shock factors [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(3):955.
- [9] Itahana Y, Yeh ET, Zhang Y. Nucleocytoplasmic shuttling modulates activity and ubiquitination-dependent turnover of SUMO-specific protease 2 [J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26(12):4675.
- [10] Ihara M, Koyama H, Uchimura Y, et al. Noncovalent binding of small ubiquitin-related modifier (SUMO) protease to SUMO is necessary for enzymatic activities and cell growth [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(22):16465.
- [11] Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, et al. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(1):45.
- [12] Ulrich HD. Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems; a plea of no contest [J]. *Trends Cell Biol*, 2005, 15(10):525.
- [13] Wang J, Hu W, Cai S, et al. The intrinsic affinity between E2 and the Cys domain of E1 in ubiquitin-like modifications [J]. *Mol Cell*, 2007, 27(2):228.
- [14] Torres-Rosell J, Sunjevaric I, De Piccoli G, et al. The Smc5-Smc6 complex and SUMO modification of Rad52 regulates recombinational repair at the ribosomal gene locus [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(8):923.
- [15] Xhemalce B, Riising EM, Baumann P, et al. Role of SUMO in the dynamics of telomere maintenance in fission yeast [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(3):893.
- [16] Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Badra FA, et al. SUMO and estrogen receptors in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 107(2):195.
- [17] Ganesan AK, Kho Y, Kim SC, et al. Broad spectrum identification of SUMO substrates in melanoma cells [J]. *Proteomics*, 2007, 7(13):2216.
- [18] Mabb AM, Miyamoto S. SUMO and NF-kappa B ties [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(15):1979.
- [19] 邓开, 王洪林. survivin 基因在肿瘤中的研究进展 [J]. *重庆医学*, 2008, 37(10):1111.

(收稿日期:2009-06-02 修回日期:2009-07-03)