

· 论 著 ·

SUMO-1 mRNA 诊断肝癌的价值研究*

郭武华¹, 袁丽华², 肖志华², 罗良平¹, 余婷¹, 张吉翔^{2,△}

(南昌大学第二附属医院/江西省分子生物重点实验室:1. 肿瘤科;2. 消化科 330006)

摘要:目的 研究肝癌中 SUMO-1 mRNA 表达水平及诊断肝癌的应用价值。方法 采用 RT-PCR 检测外科切除的肝癌、癌旁肝组织、肝血管瘤及肝局灶性结节性增生标本中 SUMO-1 mRNA 表达水平,并比较肝癌与癌旁肝组织,甲胎蛋白(AFP)阴性与阳性的肝细胞性肝癌,肝良、恶性肿瘤之间 SUMO-1 mRNA 表达水平的差异。结果 SUMO-1 mRNA 在肝癌及癌旁肝组织中均有表达,但在肝癌中的表达水平明显高于癌旁肝组织;在不同 AFP 水平的肝细胞性肝癌中 SUMO-1 mRNA 均高表达,差异无统计学意义;在肝血管瘤及肝局灶性结节性增生中 SUMO-1 mRNA 也有表达,但表达水平明显低于肝癌。结论 在不同 AFP 水平的肝细胞性肝癌中 SUMO-1 mRNA 均高表达,而在癌旁肝组织及肝良性肿瘤中表达较低,SUMO-1 mRNA 可作为诊断肝癌的一个重要标志物。

关键词:SUMO-1;基因;mRNA;肝肿瘤;诊断

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.16.004

中图分类号:R735.7;R730.45

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)16-2098-02

The role of SUMO-1 mRNA in diagnosis of primary carcinoma of liver*

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

(1. Department of Oncology; 2. Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University / Jiangxi Provincial key laboratory of molecular medicine, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objectives To investigate the expression levels of SUMO-1 mRNA and study the role in diagnosing primary carcinoma of liver. **Methods** The SUMO-1 mRNA were examined by means of RT-PCR in primary carcinomas of liver, liver tissues surrounding liver cancers, hemangiomas of liver and focal nodular hyperplasia of liver. The differences of expression level of SUMO-1 mRNA were compared between primary carcinomas of liver and liver tissues surrounding liver cancers, positive serum AFP and negative serum AFP hepatocellular carcinomas, primary carcinomas of liver and benign tumors of liver. **Results** SUMO-1 mRNA all expressed in clinical primary carcinomas of liver, liver tissues surrounding liver cancers, hemangiomas of liver and focal nodular hyperplasia of liver. There were significant differences between primary carcinomas of liver and liver tissues surrounding liver cancers, primary carcinomas of liver and benign tumors of liver. In different serum AFP patients of hepatocellular carcinoma, SUMO-1 mRNA all had over expression levels. **Conclusion** Owing to the overexpression of SUMO-1, SUMO-1 mRNA may be a good marker in diagnosing primary carcinoma of liver.

Key words: SUMO-1; Gene; mRNA; primary carcinomas of liver; diagnosis

SUMO-1 基因是 SUMO (small ubiquitin-like modifier) 基因家族中的一员,主要参与蛋白质翻译后功能的修饰,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作用^[1-2]。现已发现,SUMO-1 的修饰调节了许多与癌症发生、发展及转移有关的蛋白的功能,如 p53、增殖细胞核抗原、雌激素受体、端粒酶等^[3-7],提示 SUMO-1 基因与癌症发生、发展密切相关。作者前期研究发现,SUMO-1 基因在肝癌细胞株 SMMC-7721、HepG2、Hep3B 以及临床肝癌标本中均明显高表达,而癌旁肝组织中 SUMO-1 基因表达较低^[8]。本实验通过检测临床肝癌、肝血管瘤及肝局灶性结节性增生标本中 SUMO-1 mRNA 表达水平,以进一步评价 SUMO-1 基因诊断肝癌的应用价值。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 肝癌、癌旁肝组织、肝血管瘤及肝局灶性结节性增生标本均来自本院外科 2007 年 11 月至 2008 年 12 月行肝切除患者,均经术后病理检查确诊。共检测 20 例,其中男 16 例,女 4 例。肝细胞性肝癌术前甲胎蛋白(AFP) < 8.0

ng/mL (本院正常值上限) 4 例,肝细胞性肝癌术前 AFP > 400 ng/mL 4 例;肝内胆管细胞癌 4 例,肝血管瘤 7 例,肝局灶性结节性增生 1 例。

1.2 仪器设备 PCR 热循环仪 (GeneAmp[®] PCR System 9600) 及 Gene Genius Match (syngene) 全自动凝胶成像分析系统。

1.3 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) 等。

1.4 PCR 引物 从 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 的 GenBank 中获得人 SUMO-1、β-actin 基因序列,应用 Primer Primer5.0 软件设计引物,由 Generay Biotech 公司合成 (表 1)。

1.5 RT-PCR 检测 SUMO-1 mRNA 表达 采用 Trizol 提取肝癌及癌旁肝组织总 RNA,合成 cDNA。用 PCR 扩增每个标本中 SUMO-1 基因的表达,以 β-actin 作为内参照。SUMO-1

* 基金项目:江西省教育厅基金资助项目(GJJ09107)。△ 通讯作者,E-mail: jixiangz@tom.com。

PCR 通过 94 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C、35 s, 51 °C、35 s, 72 °C、35 s 30 个循环, 72 °C 延迟延伸 7 min。β-actin PCR 通过 94 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C、35 s, 54 °C、35 s, 72 °C、35 s 30 个循环, 72 °C 延迟延伸 7 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳(含 0.5 μg/mL 溴化乙锭), 在紫外线灯下观察结果, 通过 Gene Genius Match 全自动凝胶成像分析系统测条带灰度值。各标本 SUMO-1 mRNA 表达量为 SUMO-1 密度值与各自 β-actin 灰度值的比值。

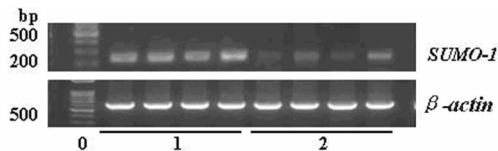
1.6 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS12.0 统计软件进行数据处理, 两样本比较采用 *t* 检验进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 PCR 反应引物

基因	引物序列	产物长度 (bp)
SUMO-1		
正义引物	5'-AGGAGGCAAAACCTTCAACT-3'	245
反应引物	5'-TTCTTCTCCATTCACAGTT-3'	
β-actin		
正义引物	5'-ACACTGTGCCATCTACGAGG-3'	621
反应引物	5'-AGGGGCCGACTCGTCATACT-3'	

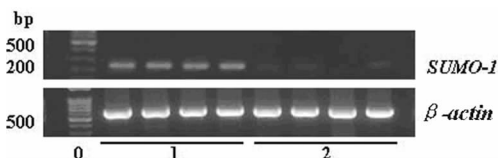
2 结 果

2.1 SUMO-1 mRNA 在肝癌中明显高表达, 而在癌旁肝组织中表达较低(图 1~3)。12 例肝癌标本中 SUMO-1 表达量为 0.513 ± 0.065, 而癌旁肝组织中 SUMO-1 表达量为 0.05 ± 0.03, 两组 SUMO-1 mRNA 表达水平差异有统计学意义($P = 0.009$)。



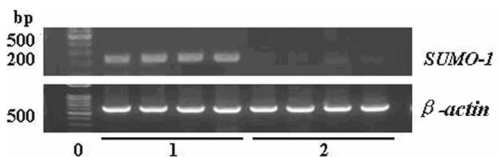
0: DNA 标记; 1: 肝细胞性肝癌; 2: 癌旁肝组织。

图 1 AFP > 400 ng/mL 肝细胞性肝癌及癌旁肝组织中 SUMO-1 mRNA 表达水平



0: DNA 标记; 1: 肝细胞性肝癌; 2: 相应的癌旁肝组织。

图 2 AFP < 8 ng/mL 肝细胞性肝癌及癌旁肝组织中 SUMO-1 mRNA 表达水平



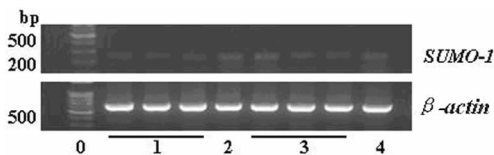
0: DNA 标记; 1: 胆管细胞性肝癌; 2: 癌旁肝组织。

图 3 肝胆管细胞性肝癌及癌旁肝组织中 SUMO-1 mRNA 表达水平

2.2 AFP > 400 ng/mL 肝细胞性肝癌标本中 SUMO-1 mRNA

表达水平与 AFP < 8.0 ng/mL 肝细胞性肝癌标本中 SUMO-1 mRNA 表达水平相近(图 1、2), SUMO-1 表达量分别为 0.51 ± 0.08、0.45 ± 0.05, 差异无统计学意义($P = 0.426$)。

2.3 在肝血管瘤及肝局灶性结节性增生标本中 SUMO-1 mRNA 表达水平很低(图 4), SUMO-1 表达量为 0.079 ± 0.031, 与肝癌标本比较, 差异有统计学意义($P = 0.046$)。



0: DNA 标记; 1: 肝血管瘤; 2: 肝局灶性结节性增生; 3: 血管瘤旁肝组织; 4: 局灶性结节性增生旁肝组织。

图 4 肝血管瘤、肝局灶性结节性增生及病灶旁肝组织中 SUMO-1 mRNA 表达水平

3 讨 论

SUMO 是泛素样蛋白家族中的一员, 与泛素不同, SUMO 与底物蛋白结合后不引起蛋白降解, 而是调节蛋白功能^[9]。越来越多的蛋白被发现存在 SUMO 的修饰, 这些蛋白的功能离不开 SUMO 的调节作用。SUMO 家族蛋白在进化中高度保守, 在脊椎动物中 SUMO 家族蛋白包括 SUMO-1~4, SUMO-1 广泛参与人类癌症相关蛋白功能的调节, 促进癌症的发生、发展^[3-7]。因此 SUMO-1 与癌症发生、发展关系密切, 是癌症发生、发展的一个重要的调节因子。

肝癌是常见恶性肿瘤之一, 由于起病隐匿、进展迅速, 治疗效果较差。现今诊断肝癌的手段除临床表现及体征外, 影像学技术特别是 CT、MRI 的进步在肝癌诊断中发挥不可或缺的重要作用。AFP 是部分肝细胞性肝癌分泌的蛋白质, 是诊断肝细胞性肝癌的一个重要的参考指标。我国颁布的肝细胞性肝癌的临床诊断标准中, AFP 具有重要的确诊价值。AFP > 400 ng/mL 加上有肝癌特征的影像学检查, 即可确诊为肝癌。AFP 是我国诊断肝癌的重要参考指标, 但不同的肝癌患者其血清 AFP 水平明显不同, 有些肝细胞性肝癌患者外周血 AFP 在正常值范围, 因此寻找一种广泛存在于肝癌中能够协助诊断肝癌的标志物具有重要意义。

有研究发现, 在 mRNA 及蛋白水平 SUMO-1 基因在肝癌标本中均明显高表达, 而癌旁肝组织中 SUMO-1 基因表达较低^[8]。通过 RNAi 方法, 抑制肝癌细胞株 SMMC-7721 中 SUMO-1 的表达, 可明显抑制 SMMC-7721 的生长^[10], 提示 SUMO-1 与肝癌发展关系密切。本研究采用 RT-PCR 方法, 检测肝癌、癌旁肝组织及肝良性肿瘤中 SUMO-1 mRNA 表达水平, 并与临床常用的肝细胞性肝癌标志物 AFP 对比研究 SUMO-1 mRNA 诊断肝癌的应用价值。结果显示, 在肝癌标本中 SUMO-1 mRNA 表达水平明显高于癌旁肝组织, 也明显高于肝血管瘤及肝局灶性结节性增生标本。尽管在不同肝细胞性肝癌患者血清中存在 AFP 量的差异, 但在不同肝细胞性肝癌标本中 SUMO-1 mRNA 均明显高表达, 不同 AFP 水平患者肝细胞性肝癌标本中 SUMO-1 mRNA 表达水平无明显差异, 因此鉴于在所有肝癌标本中均有 SUMO-1 mRNA 高表达, SUMO-1 mRNA 可成为诊断肝癌的一个有价值的指标。

参考文献:

[1] Di Bacco A, Ouyang J, Lee HY, et al. The SUMO-specific protease SENP5 is required for cell di- (下转第 2102 页)

130×10³ 的条带(NS),与 GFP-β-连环蛋白相对分子质量极为接近。而在未做免疫沉淀的全细胞裂解液(Input)中,β-连环蛋白抗体同样检测到了此条带,提示该条带很可能代表一种可与 PKD3 及 β-连环蛋白免疫复合物结合的非特异蛋白(图 3)。

3 讨论

作者前期研究证实,PKD3 不仅调控前列腺癌细胞的增殖和存活^[4],还促进非小细胞癌 A549 的迁移和侵袭(尚未发表)。uPAR 与 uPA 前体结合后可激活 uPA 的活性,激活纤维蛋白酶,降解细胞外基质,激活一系列基质金属蛋白酶,从而促进包括前列腺癌在内的多种肿瘤的迁移和侵袭^[5-6]。本研究表明,单纯过表达 PKD3 即可上调 HEK293 中 uPAR 的转录水平,而以 PMA 激活 PKD3 活性后 uPAR 的转录水平更是明显上调,提示 PKD3 很可能通过上调 uPAR 的表达介导细胞的迁移和侵袭。

PKD3 通过什么途径上调 uPAR 的表达呢? 前期有研究提示,β-连环蛋白-TCF4 信号通路可通过 AP1 间接上调结肠癌细胞和组织中 uPAR 的表达^[7],而近期有文献报道,PKD1 可磷酸化 β-连环蛋白并使之从细胞核转位到细胞膜并与 E-Cadherin 结合,从而促进肿瘤细胞的黏附,抑制其侵袭^[10-11]。鉴于 PKD1 与 PKD3 的同源性和可能存在的功能拮抗,本研究假设 PKD3 可磷酸化 β-连环蛋白并使之转位到细胞核,从而间接激活 uPAR 的转录。与之相符,PMA 刺激 HEK293 细胞可诱导 PKD3 与 β-连环蛋白直接结合,为进一步验证上述假设提供了有效证据。

在随后的研究中,作者拟采用激光共聚焦显微镜探求在不同细胞系(HEK293 及前列腺癌细胞系)中及不同条件下 PKD3 与 β-连环蛋白之间可能存在的共定位关系,并以亚细胞组分分离(subcellular fractionation)研究 PKD3 及 β-连环蛋白应对各种刺激时在细胞质、细胞膜和细胞核之间的穿梭情况,以进一步证实 PKD3 与 β-连环蛋白之间的相互作用,并定位其相互作用的区域。同时作者还将在不同的前列腺癌细胞系中以报告基因 Topflash 验证 PKD3 的表达和活性是否调控 TCF4 的转录活性。

参考文献:

[1] Wang QJ. PKD at the crossroads of DAG and PKC signa-

(上接第 2099 页)

- vision[J]. *Mol Cell Biol*,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] Pfander B, Moldovan GL, Sacher M, et al. SUMO-modified PCNA recruits Srs2 to prevent recombination during S phase [J]. *Nature*,2005,436(7049):428.
- [6] Karamouzis MV, Konstantinopoulos PA, Badra FA, et al.

ling [J]. *Trends Pharmacol Sci*,2006,27(6):317.

- [2] Rozengurt E, Rey O, Waldron RT. Protein kinase D signaling [J]. *J Biol Chem*,2005,280(14):13205.
- [3] Jaggi M, Rao PS, Smith DJ, et al. E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C_μ is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer [J]. *Cancer Res*,2005,65(2):483.
- [4] Chen J, Deng F, Singh SV, et al. Protein kinase D3 (PKD3) contributes to prostate cancer cell growth and survival through a PKCε/β/β1/β2/β3/β4/β5/β6/β7/β8/β9/β10/β11/β12/β13/β14/β15/β16/β17/β18/β19/β20/β21/β22/β23/β24/β25/β26/β27/β28/β29/β30/β31/β32/β33/β34/β35/β36/β37/β38/β39/β40/β41/β42/β43/β44/β45/β46/β47/β48/β49/β50/β51/β52/β53/β54/β55/β56/β57/β58/β59/β60/β61/β62/β63/β64/β65/β66/β67/β68/β69/β70/β71/β72/β73/β74/β75/β76/β77/β78/β79/β80/β81/β82/β83/β84/β85/β86/β87/β88/β89/β90/β91/β92/β93/β94/β95/β96/β97/β98/β99/β100 pathway downstream of Akt and ERK 1/2 [J]. *Cancer Res*,2008,68(10):3844.
- [5] Li Y, Cozzi PJ. Targeting uPA/uPAR in prostate cancer [J]. *Cancer Treat Rev*,2007,33(6):521.
- [6] Smith HW, Marshall CJ. Regulation of cell signalling by uPAR [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2010,11(1):23.
- [7] Mann B, Gelos M, Siedow A, et al. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1999,96(4):1603.
- [8] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} method [J]. *Methods*,2001,25(4):402.
- [9] Lu G, Chen J, Espinoza LA, et al. Protein kinase D 3 is localized in vesicular structures and interacts with vesicle-associated membrane protein 2 [J]. *Cell Signal*,2007,19(4):867.
- [10] Du C, Jaggi M, Zhang C, et al. Protein kinase D1-mediated phosphorylation and subcellular localization of beta-catenin [J]. *Cancer Res*,2009,69(3):1117.
- [11] Jaggi M, Rao PS, Smith DJ, et al. E-cadherin phosphorylation by protein kinase D1/protein kinase C_μ is associated with altered cellular aggregation and motility in prostate cancer [J]. *Cancer Res*,2005,65:483.

(收稿日期:2010-06-29)

SUMO and estrogen receptors in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*,2008,107(2):195.

- [7] 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.
- [8] 郭武华,袁丽华,肖志华,等. SUMO-1 基因在肝癌中的表达及意义 [J]. *重庆医学*,2009,38(24):2308.
- [9] Ulrich HD. Mutual interactions between the SUMO and ubiquitin systems; a plea of no contest [J]. *Trends Cell Biol*,2005,15(10):525.
- [10] 郭武华,袁丽华,肖志华,等. SUMO-1 基因 siRNA 抑制肝癌细胞 SMMC-7721 生长的研究 [J]. *天津医药*,2010,38(1):4.

(收稿日期:2009-10-25 修回日期:2010-01-12)