

· 论 著 ·

# SUMO-1 基因沉默对肝癌细胞株 SMMC-7721 bcl-2 及 c-myc 基因表达的影响

袁丽华<sup>1</sup>, 郭武华<sup>2</sup>, 肖志华<sup>1</sup>, 张吉翔<sup>1△</sup>

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

**摘要:**目的 探讨 SUMO-1 基因沉默后对肝癌细胞株 SMMC-7721 bcl-2 及 c-myc 表达的影响。方法 将人工合成的针对人 SUMO-1 基因的 siRNA 片段转染入肝癌细胞株 SMMC-7721, 采用 RT-PCR、Western blot 方法检测 siRNA 沉默 SUMO-1 基因的效果及 SUMO-1 基因沉默后对 bcl-2 及 c-myc 基因表达的影响。结果 人工合成的针对 SUMO-1 基因的 siRNA 片段能显著地抑制 SMMC-7721 SUMO-1 基因的表达, 24、48、72 h 沉默率分别为 9.80%、73.43%、46.56%。SUMO-1 基因表达下调后 SMMC-7721 细胞内 bcl-2 及 c-myc 基因表达也明显下调, 差异有统计学意义。结论 siRNA 是一种理想的沉默 SMMC-7721 SUMO-1 基因表达的方法, SUMO-1 基因沉默后 SMMC-7721 细胞内的 bcl-2 及 c-myc 基因表达均明显下调, 说明 SUMO-1 基因控制癌基因 bcl-2 及 c-myc 的表达。

**关键词:** SUMO-1; siRNA; 肝癌; bcl-2; c-myc

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.19.013

中图分类号: R735.7; R730.54

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)19-2578-03

## SUMO-1 controls the expression of bcl-2 and c-myc in HCC cell line SMMC-7721

YUAN Li-hua<sup>1</sup>, GUO Wu-hua<sup>2</sup>, XIAO Zhi-hua<sup>1</sup>, et al.

(1. Department of Gastroenterology; 2. Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University/Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**Abstract:** **Objective** To study the efficiency of silencing SUMO-1 induced by siRNA in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 and to explore the inhibition of bcl-2 and c-myc expression after being silenced SUMO-1 gene in vitro. **Methods** The SUMO-1 siRNA was transfected into SMMC-7721 by means of Lipofectamine™ 2000. The silencing efficiency of SUMO-1 was examined by RT-PCR and Western blot. The expressions of bcl-2 and c-myc were examined by RT-PCR and Western blot. **Results** The siRNA could significantly silence the expression of SUMO-1 in SMMC-7721. The silencing rate was 9.80%, 73.43% and 46.56% at 24, 48 and 72 hours respectively. After being transfected SUMO-1 siRNA, the expressions of bcl-2 and c-myc were down-regulated significantly. **Conclusion** SiRNA is a good manner to silence the expression of SUMO-1 in SMMC-7721 in vitro. Owing to the inhibition of bcl-2 and c-myc expression induced by SUMO-1 siRNA, SUMO-1 controls the expression of bcl-2 and c-myc in HCC cell line SMMC-7721.

**Key words:** SUMO-1; siRNA; Hepatocellular Carcinoma; bcl-2; c-myc

小泛素相关修饰物-1 (small ubiquitin-like modifier-1, SUMO-1) 是泛素样分子 SUMO 基因家族中的一员, 参与蛋白翻译后修饰, 但不介导靶蛋白的蛋白酶降解, 而是可逆性修饰靶蛋白, 调节细胞中蛋白质与蛋白质的相互作用与转录活性, 增强被修饰底物的稳定性。SUMO-1 基因调节许多与癌症发生、发展有关的蛋白的功能, 与癌症的发生、发展关系密切。研究发现, 在肝癌细胞株 SMMC-7721 及临床肝癌标本中 SUMO-1 基因明显高表达<sup>[1]</sup>, 进一步提示 SUMO-1 基因和肝癌的发生相关。本实验主要观察 siRNA 沉默 SUMO-1 基因后对肝癌细胞株 SMMC-7721 内 bcl-2 和 c-myc 基因表达的影响。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

**1.1.1 细胞株来源及细胞培养** 人肝癌细胞株 SMMC-7721 购自中国典型培养物保藏中心 (china center for type culture

collection, CCTCC)。SMMC-7721 细胞在含 10% 胎牛血清 (PAA)、100 u/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI-1640 (Invitrogen) 培养液中生长, 并于 37 °C、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

**1.1.2 主要试剂** RNA 提取试剂: Trizol (Invitrogen); RT-PCR 试剂: Oligo(dT) (Promega), dNTP (Generay Biotech), M-MLV RT 5 × buffer (Promega), M-MLV 逆转录酶 (Promega), Rnase 抑制剂 (Promega), Master Mix (2 × Taq PCR Tiangen), DNA ladder (Tiangen); Western blot 试剂: 总蛋白提取试剂 (applygen), β-actin 一抗 (兔多克隆抗体, SANTA CRUZ), SUMO-1 一抗 (兔多克隆抗体, ABZOOM), bcl-2 一抗 (兔多克隆抗体, SANTA CRUZ), c-myc 一抗 (兔多克隆抗体, SANTA CRUZ), 二抗 (羊抗兔, ZSGB-B10); Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen)。

△ 通讯作者, E-mail: jixiangz@tom.com.

**1.1.3 SUMO-1 siRNA 设计** 3 对针对 SUMO-1 mRNA 序列的 siRNA,靶序列编码分别为 001:5'-CAA GAA ACT CAA AGA ATC A-3', 002:5'-GGA AGA AGA TGT GAT TGA A-3', 003:5'-CAA TGA ATT CAC TCA GGT T-3',由广州锐博生物公司合成。荧光标记的 siRNA(FAM-siRNA)及阴性对照 siRNA(NControl)购自广州锐博生物公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 人肝癌细胞株 SMMC-7721 siRNA 转染效率检测

实验分 4 组,分别是 FAM-siRNA 3 个终浓度,30、50、100 nM 和空白对照组。按转染试剂 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 的操作说明书,用不含血清的 RPMI-1640 稀释适量的 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 和 FAM-siRNA,混合后形成 FAM-siRNA 转染试剂混合液,加入肝癌细胞株 SMMC-7721,密度为 30%~40%(处于对数生长期)的 12 孔板中,轻轻摇晃混合。在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 6~8 h 后,在荧光显微镜下观察转染效率。经过重复实验确定终浓度为 100 nM 时荧光强度最强,几乎所有细胞都有荧光。

**1.2.2 有效 SUMO-1 基因 siRNA 片段筛查试验** 实验分 6 组,分别为待筛查的 3 对 siRNA 组和阴性对照组(NC 组)、Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 组(Lipo 组)及空白对照组(Blan 组)。转染终浓度为 100 nM,按转染试剂 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 的操作说明书进行转染,在转染后 24、48、72 h 分别提取 RNA 及总蛋白,采用 RT-PCR 及 Western blot 检测 SUMO-1 基因的表达。应用 Primer 5.0 软件设计引物,由 Generay Biotech 公司合成,SUMO-1:sense:5'-AGG AGG CAA AAC CTT CAA CT-3',antisense:5'-TTC TTC CTC CAT TCC CAGTT-3',扩增 DNA 片段大小为 245 bp。

### 1.2.3 SUMO-1 基因沉默后 bcl-2 及 c-myc 基因的表达检测

实验分 4 组,siRNA 组:有效的 SUMO-1 基因 siRNA 组;NC 组:阴性对照组;Lipo 组:Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 组;Blan 组:空白对照组。

**1.2.3.1 RT-PCR 检测** 用 Trizol 裂解提取各组细胞总 RNA,按操作说明书逆转录合成 cDNA。PCR 扩增每组 bcl-2 及 c-myc 基因,以  $\beta$ -actin 作为内参照。bcl-2 PCR 扩增条件为 94℃ 预变性 5 min,随后 94℃、35 s→52℃、35 s→72℃、35 s→30 个循环,72℃ 延迟延伸 7 min。c-myc PCR 扩增的条件为 94℃ 预变性 5 min,94℃、35 s→52℃、35 s→72℃、35 s→30 个循环,72℃ 延迟延伸 7 min。应用 Primer 5.0 软件设计引物,由 Generay Biotech 公司合成,以  $\beta$ -actin 为内参照。bcl-2:sense:5'-GGT GAA CTG GGG GAG GAT TG-3',antisense:5'-ACT TGT GGC TCA GAT AGG CA-3',扩增 DNA 片段大小为 296 bp;c-myc:sense:5'-ACA GCG TCT GCT CCA CCT -3',antisense:5'-CCT CAT CTT CTT GTT CCT CCT -3',扩增 DNA 片段大小为 276 bp; $\beta$ -actin:sense:5'-ACA CTG TGC CCA TCT ACG AGG -3',antisense:5'-AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT-3',扩增 DNA 片段大小为 621 bp。

**1.2.3.2 Western blot 检测基因** 提取各组 SMMC-7721 总蛋白。同等量蛋白通过 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转移至硝酸纤维素膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭后,先后用 bcl-2 及 c-myc 的一抗、二抗孵育,电化学发光试剂显色,经曝

光、显影、定影后通过 Gene Genius Match 全自动凝胶成像分析系统测条带的灰度值。以  $\beta$ -actin 值为参照,计算 bcl-2 及 c-myc 蛋白的表达量。

**1.3 统计学方法** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析,对差异有统计学意义的再用 LSD 法行两两比较的 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。应用 SPSS 12.0 统计软件进行数据处理。

## 2 结果

**2.1 SUMO-1 基因 siRNA 的筛查结果** 实验显示靶序列编码为 001 的 siRNA:5'-CAA GAA ACT CAA AGA ATC A-3' 的沉默效果最好,24 h RT-PCR 测得沉默效果为 9.80%,48 h 沉默效果为 73.43%,72 h 沉默效果为 46.56%,其中 48 h 沉默效果达到实验要求。Western blot 检测 SUMO-1 蛋白的表达变化和 RT-PCR 的变化规律一致。

**2.2 SUMO-1 基因沉默后 bcl-2 及 c-myc 基因在 SMMC-7721 中的表达** 在 siRNA 致 SUMO-1 基因沉默后,基因的表达也明显下调,而且变化规律与 SUMO-1 表达水平一致,差异有统计意义( $P < 0.001$ )。

## 3 讨论

SUMO-1 基因是 SUMO 基因家族中的一员,一般位于核孔复合体和细胞核内,在许多组织和细胞中均有表达<sup>[2]</sup>。现已发现,SUMO-1 基因修饰(SUMOylation)调节了许多和癌症发生、发展及转移的蛋白的功能,如 p53、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)、雄激素受体等,提示 SUMO-1 基因和癌症的发生、发展密切相关。SUMO-1 基因可直接调节多种转录因子的转录活性,也可通过调节转录因子与 DNA 的相互作用或转录因子的代谢间接调节其转录活性<sup>[3-4]</sup>。SUMO-1 基因与靶蛋白共价连接,并参与蛋白质之间的相互作用,其主要机制是通过共价结合到靶蛋白的赖氨酸残基的  $\epsilon$ -氨基上引起类泛素化修饰,阻碍泛素对靶蛋白的共价修饰,提高靶蛋白的稳定性。本实验结果显示,SUMO-1 基因在肝癌细胞中高表达,用脂质体转入 siRNA 后可以沉默 SUMO-1 基因,以 48 h 的效果最明显。

bcl-2 基因最初在非霍奇金滤泡状 B 细胞淋巴瘤中分离出来,是最重要的抑制细胞凋亡基因之一,其功能是通过阻断程序性死亡或凋亡过程促进细胞生长。bcl-2 基因过表达不但抑制细胞凋亡,而且会使具有遗传改变又得不到修复的细胞免于死亡而进入细胞循环,多种遗传成分的改变容易导致肿瘤的发生<sup>[5]</sup>。bcl-2 基因促进细胞由 G<sub>1</sub> 期向 S 期转化并修复染色体损伤,或在细胞分化早期通过对抗前凋零分子 bax 而延长细胞的生存期,使细胞永生<sup>[6]</sup>。研究表明,多种肿瘤组织中发现 bcl-2 基因的表达异常增多<sup>[7]</sup>。bcl-2 基因的异常增多,使得细胞数目增加,未成熟细胞和老化细胞亦增多,细胞受到致癌因素攻击而变性的可能性提高,易于导致肿瘤产生<sup>[8]</sup>。本实验结果显示,人肝癌细胞中的 bcl-2 基因过表达,但 siRNA 沉默 SUMO-1 后,bcl-2 基因表达下降。

c-myc 基因是 myc 基因家族的重要成员之一,既是可易位基因,又是多种物质调节的可调节基因,也可使细胞无限增殖,获永生功能,促进细胞分裂的基因,因此,c-myc 基因与多种肿瘤发生、发展有关。目前认为 c-myc 基因是重要的细胞调控

基因,其表达产物是细胞增殖信号转导的必需因子,也是 G<sub>1</sub> 期到 S 期的启动子<sup>[9]</sup>。c-myc 基因在肝癌细胞中常过表达,本实验发现,siRNA 沉默 SUMO-1 后,c-myc 基因表达下降。有研究显示,抑制恶性肿瘤细胞如骨肉瘤、消化道肿瘤和肝细胞肝癌等 c-myc 基因的表达可以引起肿瘤细胞的老化,c-myc 基因的失活可以作为肿瘤细胞凋亡的标志<sup>[10]</sup>。

本实验初步探讨了在人肝癌细胞中,用脂质体转入 siRNA 沉默 SUMO-1 基因后,对细胞内 bcl-2 及 c-myc 基因表达的影响。bcl-2 及 c-myc 基因均可促进细胞生长,使细胞无限增殖,而使得细胞永生,与肿瘤发生、发展密切相关。siRNA 沉默 SUMO-1 基因后,bcl-2 及 c-myc 基因的表达受到抑制,可以使癌细胞增殖受到抑制,增加细胞凋亡。这为肝癌的基因治疗提供了一个新的方向。有关 SUMO-1 基因调控 bcl-2 及 c-myc 基因的机制及其途径有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] Melchior F. SUMO -nonclassial ubiquitin[J]. Annu Rev Cell Dev Biol,2000,16:591.
- [3] Johnson ES. Protein modification by SUMO[J]. Anna Rev Biochem,2004,73:355.
- [4] Pascual G,Fong AL,Ogawa S,et al. A SUMOylation-de-

pendent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma[J]. Nature,2005,437(7059):759.

- [5] 张玉诺,周琦,刘方欣,等. 靶向 bcl-2 基因转录 siRNA 重组质粒的构建和序列分析[J]. 重庆医学,2009,38(4):434.
- [6] Chiu CT,Yeh TS,Hsu JC,et al. Expression of bcl-2 family modulated thought p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma[J]. Dig Dis Sci,2003,48(6):670.
- [7] Duarte RL,Paschoal ME. Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking[J]. J Bras Pneumol,2006,32(1):56.
- [8] Burlac A. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins[J]. Cell Mol Med,2003,7(3):249.
- [9] Wang H,Mannava S,Grachtchouk V,et al. c-myc depletion inhibits proliferation of human tumor cells at various stages of cell cycle[J]. Oncogene,2008,27(13):1905.
- [10] WU CH,Riggelen J,Yetil A,et al. Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-myc inactivation[J]. PNAS,2007,104(32):13028.

(收稿日期:2010-02-22 修回日期:2010-04-04)

(上接第 2577 页)

因此,经过几周的随访即可作出鉴别诊断。

综上所述,PAP 的高误诊率的主要原因是医生不熟悉本病及本病临床表现的多样性。PAP 的临床特点是:(1)隐袭起病,常常无临床症状或咳嗽、咯少量白痰,多于感冒或体检摄 X 线胸片时发现本病,两肺片状阴影,呈地图样、碎石路样、肺水肿样、实变样及间质纤维化样等表现。以平片检查的肺水肿样表现和 CT 检查碎石路样表现最具特征性;(2)肺部阴影相对稳定,不会发生显著变化;(3)胸部影像学检查与临床症状不平衡,短期内如无感染,肺部的影像学表现严重,而临床上缺乏相应的症状。当临床上遇到长期不消散的肺部阴影时,或当肺炎经治疗临床症状缓解后,肺部阴影仍不消散时,应该考虑排除本病的诊断。目前,全肺灌洗术应用于 PAP 患者疗效确切<sup>[9-10]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Lee KN,Levin DL,Webb WR. Pulmonary alveolar proteinosis:high-resolution CT,chest radiographic,and functional correlations[J]. Chest,1997,11(7):989.
- [2] 李映,王亚玲. 间质性肺炎的 HRCT 诊断与胸片对照[J]. 重庆医学,2002,31(5):418.
- [3] Honda Y,Kuroki Y,Matsuea E,et al. Pulmonary surfac-

tant protein D in sera and bronchoalveolar lavage fluids[J]. Am J Respir Crit Care Med,1995,152(11):1860.

- [4] Gumper BC,Nowaeki MR,Amundson DE. Pulmonary alveolar proteinosis:Remission after antibiotic treatment[J]. West J Med,1981,161(1):66.
- [5] Kitamura T,Uchida K,Tanaka N. Serological diagnosis of idiopathic pullmonary alveolar proteinosis[J]. Am J ResPir Crit Care Med,2000,162(8):658.
- [6] Dubois RM,McAllister WA,Branthwaite MA. Alveolar proteinosis;diagnosis and treatment over a ten-year period[J]. Thorax,1983,38(5):360.
- [7] Goldstein LS,Kavuru MS,Cuns-mccarthy P,et al. Pulmonary alveolar proteinosis:Clinical features and outeomes[J]. Chest,1998,114(5):1357.
- [8] 张飞峰,时国朝. 肺泡蛋白沉积症 9 例诊断分析[J]. 实用医学杂志,1999,15(5):19.
- [9] 王喜军,林成新. 大容量全肺灌洗术治疗肺泡蛋白沉积症的麻醉管理[J]. 广西医学,2008,30(3):362.
- [10] 陈小波,李时悦. 全肺灌洗术治疗肺泡蛋白沉积症 24 例[J]. 广东医学,2009,30(8):1105.

(收稿日期:2010-02-28 修回日期:2010-03-05)