

# 抑制素在人肝癌细胞SMMC-7721和Huh-7中的表达及其编码序列扩增

党双锁<sup>1</sup>, 孙明珠<sup>1</sup>, 寻萌<sup>2</sup>, 杨娥<sup>2</sup>, 李亚萍<sup>1</sup>, 王秀芳<sup>1</sup>, 王文俊<sup>1</sup>, 李梅<sup>1</sup> (1. 西安交通大学医学院第二附属医院 感染科, 西安 710004; 2. 西安交通大学医学院免疫与病原生物学系, 西安 710061)

**摘要:** 目的 检测抑制素在人肝癌细胞SMMC-7721及Huh-7中的基因表达, 扩增抑制素全长编码序列。方法 分别提取肝癌细胞SMMC-7721及Huh-7细胞总RNA, 逆转录合成cDNA。使用Real time PCR, 以GAPDH为内参检测抑制素的mRNA表达情况。采用RT-PCR方法扩增抑制素全长编码序列。结果 Real time PCR结果显示, SMMC-7721和Huh-7肝癌细胞株中均有抑制素的表达, 且SMMC-7721细胞中抑制素表达量是Huh-7细胞中的6.652倍。RT-PCR方法扩增得到约835 bp的抑制素全长编码序列, 条带特异, 无非特异性扩增。结论 人肝癌细胞株SMMC-7721中抑制素的表达量较高。

**关键词:** 抑制素; 人肝癌细胞SMMC-7721; Huh-7; 基因表达; 全长编码序列

## Expression of prohibitin in human liver cancer cells SMMC-7721 and Huh-7 and amplification of prohibitin coding sequence

DANG Shuang-suo<sup>1</sup>, SUN Ming-zhu<sup>1</sup>, XUN Meng<sup>2</sup>, YANG E<sup>2</sup>, LI Ya-ping<sup>1</sup>, WANG Xiu-fang<sup>1</sup>, WANG Wen-jun<sup>1</sup>, LI Mei<sup>1</sup> (1. Department of infectious diseases, the second affiliated hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; 2. Department of Immunology and Pathogen Biology, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710031, China)

**Abstract: Objective** To detect gene expression of prohibitin in human liver cancer cells SMMC-7721 and Huh-7, and amplify the full coding sequence of prohibitin. **Methods** The total cellular RNA of SMMC-7721 and Huh-7 were extracted, then the first strand cDNA was synthesized by reverse transcription. The expression of prohibitin mRNA was verified by Real time PCR, with GAPDH as an internal validation. RT-PCR was used to amplify the full coding sequence of prohibitin. **Results** Real time PCR results showed prohibitin was expressed in both SMMC-7721 and Huh-7 cells. And the expression level of prohibitin in SMMC-7721 cells was 6.652 times higher than that in Huh-7 cells. About 835 bp of prohibitin full coding sequence was successfully amplified by RT-PCR, without unspecific amplification. **Conclusions** The expression level of prohibitin in human liver cancer cells SMMC-7721 was relatively high.

**Key words:** Prohibitin; Human liver cancer cells SMMC-7721; Huh-7; Gene expression; Coding sequence

抑制素是一种高度保守的蛋白质, 广泛分布于细菌、植物、酵母、原虫和哺乳动物等生物细胞中, 具有高度同源性<sup>[1]</sup>。抑制素作为重要的细胞膜蛋白超家族成员之一, 主要存在于线粒体内膜上, 发挥着分子伴侣的作用, 参与稳定细胞线粒体蛋白。同时, 还存在于细胞核内, 起到调控转录的作用<sup>[2]</sup>。此外, 质膜<sup>[3]</sup>、细胞浆<sup>[4]</sup>也有少量表达。近年

来, 越来越多的研究发现抑制素在一些肿瘤细胞中表达增强, 如肺癌、前列腺癌<sup>[5]</sup>、子宫颈癌<sup>[6]</sup>、膀胱癌、胃癌、乳腺癌<sup>[7]</sup>等, 因此推测, 抑制素可能和肿瘤的发生发展有着密切的关系<sup>[8]</sup>。但是, 到目前为止, 抑制素在肝癌细胞株中的表达情况尚不是很清楚, 其与肝癌的关系更少有研究涉及。因此, 为填补这一领域的空白, 本研究通过Real time PCR方法对肝癌细胞SMMC-7721和Huh-7中抑制素的mRNA表达水平进行分析, 揭示肝癌细胞中抑

通讯作者: 党双锁 Email: dang212@126.com

制素的表达情况,为阐明抑制素在肝癌细胞中的功能及其作用机制提供基础依据。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 人肝癌细胞SMMC-7721和Huh-7由西安交通大学医学院病理学实验室传代培养;RPMI1640培养液、胎牛血清、小牛血清购于美国Gibco公司;Trizol总RNA抽提试剂盒、第一链cDNA合成试剂盒、氯仿(分析纯)购于上海生工生物工程技术有限公司;20 cm<sup>2</sup>细胞培养瓶、一次性移液管、胰酶消化液、2 × Taq PCR Master Mix、DNA Marker II购于北京天根生化科技有限公司;DEPC购于西安润德生物技术有限公司;电泳用琼脂糖、10 × loading buffer购于日本TaKaRa公司。细胞培养箱为美国HERA公司产品;倒置显微镜为OLYMPUS公司产品;超净工作台为珠海再鑫仪器有限公司产品;Real time PCR仪为美国Bio-Rad产品;DYY-8C型稳压稳流电泳仪为北京六一仪器厂产品;SX-300凝胶图像分析系统为上海小源科技有限公司产品。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞SMMC-7721使用含10%小牛血清的RPMI1640培养液培养,Huh-7细胞使用含10%胎牛血清的RPMI1640培养液培养,均置于37℃,5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中。

1.2.2 细胞总RNA提取 按照Trizol总RNA抽提试剂盒(UNIQ-10柱式)说明书提取细胞总RNA。每5 × 10<sup>6</sup>个细胞中加入1 ml Trizol细胞裂解液,吹打细胞充分溶解。加入0.2 ml氯仿,混匀,4℃ 12 000 r/min,离心15分钟,溶液分3层。吸取上清置于新EP管中,加入等体积异丙醇,混匀,4℃ 12 000 r/min离心15分钟。可见RNA白色沉淀,弃液,加入500 μl无水乙醇,清洗RNA,12 000 r/min离心5分钟,弃液,超净台通风干燥10分钟。加10 μl DEPC水溶解RNA。取5 μl RNA溶液在5 V/cm电压下进行0.8%非变性琼脂糖凝胶电泳。紫外透射光下观察并拍照。剩余的总RNA进行第一链cDNA逆转录反应。

1.2.3 第一链cDNA逆转录反应 按照第一链cDNA逆转录试剂盒说明书进行。冰上配制如下混合

物:总RNA 5 μl, Oligo (dT) 18 Primer (0.5 μg/μl) 1 μl, RNase-free ddH<sub>2</sub>O 5 μl, 混匀,离心5秒。70℃水浴5分钟,冰浴30秒,离心5秒,依次加入下列试剂:5 × reaction buffer 4 μl, RNase inhibitor (20 U/μl) 1 μl, 10 mmol/L dNTP Mix 2 μl, 混匀,离心5秒。37℃水浴5分钟。加入2 μl AMV Reverse Transcriptase (10 U/μl), 终体积20 μl。轻轻混匀,37℃温育60分钟,70℃ 10分钟,终止反应。取5 μl反应终溶液在5 V/cm电压下进行1%琼脂糖凝胶电泳。紫外透射光下观察并拍照。

1.2.4 Real time PCR检测抑制素的mRNA转录水平 根据GenBank中抑制素的mRNA序列NM\_002634设计引物, Forward: 5' - AAACAGGTGGCTCAGCAGGAA-3'; Reverse: 5' -CAGTGAGTTGGCAATCAGCTCAG-3', 产物长度129 bp。设GAPDH为内参,以GenBank中GAPDH的mRNA序列NM\_002046为模板设计, Forward: 5' - GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'; Reverse: 5' -TGGTGAAGACGCCAGTGGGA-3', 产物长度138 bp。以上引物由日本TaKaRa公司设计并合成,质量为PAGE级。在冰上依次加入下列试剂:SYBR Premix Ex Taq™ II 12.5 μl, Forward Primer (10 μM) 1 μl, Reverse Primer (10 μmol/L) 1 μl, cDNA 0.5 μl, ddH<sub>2</sub>O 10 μl, 终体积25 μl。反应在Bio-Rad iQ5 Real time PCR仪上进行,反应条件:95℃预变性1分钟;95℃变性10秒,57℃退火30秒,72℃延伸30秒,40个循环。反应结束后确认扩增曲线和融解曲线,制作定量标准曲线,并取反应产物5 μl进行1%琼脂糖凝胶电泳。

1.2.5 抑制素全长CDS扩增 根据抑制素的mRNA序列NM\_002634设计引物, probF: 5' - GAAGATCTATGGCTGCCAAAGTGTTTGAG-3', 从ATG起始密码子开始(以粗体显示),引入Bgl II酶切位点(以下划线显示); probR: 5' - CGGGATCCTCACTGGGGCAGCTGGA-3', 引入BamH I酶切位点(以下划线显示),产物长度835 bp。引物由陕西先锋生物科技有限公司设

计合成。反应体系如下: ddH<sub>2</sub>O 8.5 μl, 2 × Taq PCR Master Mix 12.5 μl, 引物(10μM)各1.5 μl, cDNA模板1 μl, 终体积25 μl。反应条件: 95℃ 预变性3分钟; 95℃ 变性30秒, 60℃退火 30秒, 72℃延伸1分钟, 共40个循环; 72℃ 5分钟。反应结束后进行1%琼脂糖凝胶电泳。

## 2 结果

### 2.1 细胞总RNA的提取

将提取的细胞总RNA进行0.8%非变性琼脂糖凝胶电泳, 见图1, 可清晰看到28S RNA、18S RNA、5S RNA 3条带, 且28S RNA的亮度为18S RNA的2倍, 无杂带, 说明获得的RNA产物纯度较高。

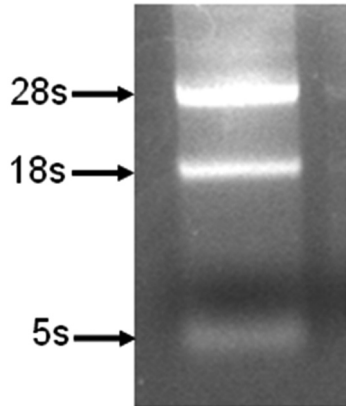


图 1 细胞总RNA电泳图

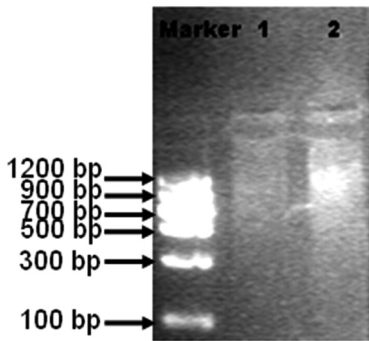


图 2 第1链cDNA电泳图

注: Marker: DNA Marker II; 1: SMMC-7721细胞第1链cDNA; 2: Huh-7细胞第1链cDNA

2.2 第1链cDNA逆转录反应 第1链cDNA产物进行1%琼脂糖凝胶电泳, 见图2, 可见条带大小约100 bp~2 kb, 片段集中在300 bp~2 kb, 为连续拖影, 无特异带型。说明第1链cDNA逆转录产物成功, 可用于后续实验。

2.3 Real time PCR检测抑制素的mRNA转录水平 Real time PCR采用SYBR Green染料法进行, 经融解曲线检测抑制素和内参GAPDH的扩增产物均为单一熔点峰值曲线, 见图3, 方进行mRNA相对表

达量的计算及比较。

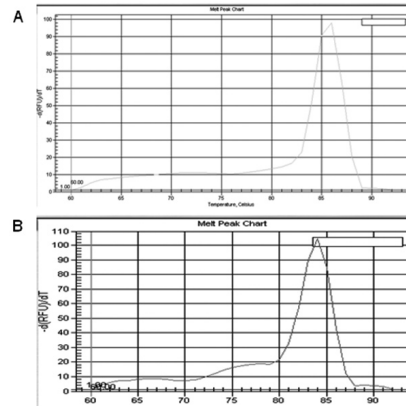


图 3 Real time PCR扩增抑制素和内参GAPDH mRNA的融解峰值曲线

注: 融解峰值曲线熔点峰单一, 无非特异熔点峰, 说明引物设计合成及cDNA扩增质量较好, 无非特异产物扩增

图4A为Real time PCR检测SMMC-7721和HuH-7细胞抑制素mRNA的扩增曲线图。抑制素mRNA的相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值表示。SMMC-7721和HuH-7细胞抑制素mRNA表达的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值如图4B所示, SMMC-7721和HuH-7细胞中均有抑制素的表达, 且SMMC-7721细胞抑制素表达量是HuH-7细胞的6.652倍。

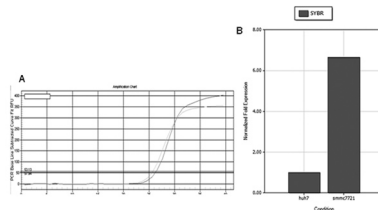


图 4 Real time PCR扩增抑制素 mRNA的扩增曲线(A) 及相对表达量比较(B)

将Real time PCR扩增产物进行1%琼脂糖凝胶电泳, 见图5。可见与预期大小一致的特异性抑制素、GAPDH扩增产物, 产物长度分别为129 bp和138 bp, 无非特异产物, 说明两组细胞的RNA均成功逆转录为cDNA, 设计的引物具有高度特异性, Real time PCR扩增产物特异, 无非特异扩增。

2.4 抑制素全长CDS的扩增 扩增产物电泳如图6, 可见与预期大小835 bp一致的特异性扩增产物, 无非特异产物。

## 3 讨论

1989年, McClung等首先克隆出哺乳动物的抑

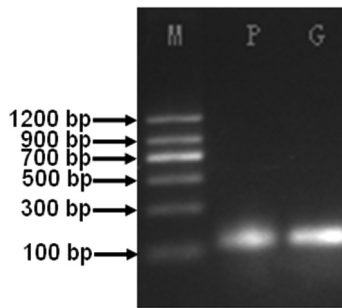


图 5 Real time PCR扩增产物电泳图

注: M: DNA Marker II; P: 抑制素 Real time PCR扩增产物; G: GAPDH Real time PCR扩增产物

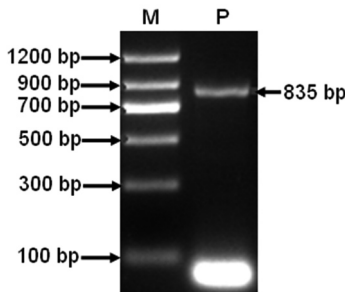


图 6 RT-PCR扩增抑制素全长CDS电泳结果

注: M: DNA Marker II; P: 抑制素全长CDS RT-PCR扩增产物

抑制素基因, 该基因位于染色体17q21<sup>[9]</sup>, 编码分子量为32 kD的抑制素蛋白。目前, 抑制素蛋白最为确定的功能是作为分子伴侣参与稳定细胞线粒体蛋白, 另外, 还可能参与调控细胞周期<sup>[10]</sup>、调节细胞信号转导、抑制细胞增殖<sup>[11]</sup>、诱导细胞凋亡<sup>[12,13]</sup>、抗衰老、维持细胞内稳态等诸多细胞生命活动, 但其功能还存在许多争议之处, 其具体作用机制也不是非常清楚。

先前有关抑制素与肿瘤关系的报道, 结果也不一致。Jang等<sup>[14]</sup>发现胃癌组织中抑制素表达下调。Gamble等<sup>[15]</sup>发现雄激素介导的前列腺癌组织中抑制素表达下调超过50%。然而, 近些年来, 由于实验技术的发展, 越来越多的研究发现在肿瘤组织和细胞中, 抑制素表达升高。例如, Seow等<sup>[16]</sup>使用双向电泳检测人肝癌细胞系HCC-M的差异表达蛋白时, 就发现抑制素表达发生了上调。

为进一步研究抑制素在肝癌细胞中的表达情况及与肝癌发生发展的关系, 本研究通过提取肝癌细胞SMMC-7721和Huh-7总RNA, 逆转录获得cDNA, 使用Real time PCR检测其中抑制素的mRNA表达水平。结果发现SMMC-7721和Huh-7

肝癌细胞株中均有抑制素的表达, 且SMMC-7721细胞的抑制素表达量是Huh-7细胞的6.652倍, SMMC-7721中抑制素的表达量较高。随后, 又以抑制素高表达的细胞株SMMC-7721的cDNA为模板扩增得到抑制素的全长编码序列, 为今后进行序列分析、构建原核表达载体、制备单克隆抗体、构建真核表达载体、研究抑制素表达上调的生物学功能及其与肿瘤的关系、对肿瘤细胞增殖和迁移能力的影响提供实验准备。

#### 参考文献

- [1] Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, et al. Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperon, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein[J]. *Hepatology*,2009,50:378-386.
- [2] Rizwani W, Alexandrow M, Chellappan S. Prohibitin physically interacts with MCM proteins and inhibits mammalian DNA replication[J]. *Cell Cycle*,2009,8:1621-1629.
- [3] 郭东升, 钱令嘉, 袁聚祥. Prohibitin——肿瘤与代谢性疾病治疗的新靶标[J]. *国际病理科学与临床杂志*,2007,27:401-405.
- [4] Woodlock TJ, Bethlendy G, Segel GB. Prohibitin expression is increased in phorbol ester-treated chronic leukemic B-lymphocytes[J]. *Blood Cells Mol Dis*,2001,27:27-34.
- [5] Mengwasser J, Piau A, Schlag P, et al. Differential immunization identifies PHB1/PHB2 as blood-borne tumor antigens[J]. *Oncogene*,2004,23:7430-7435.
- [6] Tsai HW, Chow NH, Lin CP, et al. The significance of prohibitin and c-Met/hepatocyte growth factor receptor in the progression of cervical adenocarcinoma[J]. *Hum Pathol*,2006,37:198-204.
- [7] Kang X, Zhang L, Sun J, et al. Prohibitin: a potential biomarker for tissue-based detection of gastric cancer[J]. *J Gastroenterol*,2008,43:618-625.
- [8] Nan Y, Yang S, Tian Y, et al. Analysis of the expression protein profiles of lung squamous carcinoma cell using shot-gun proteomics strategy[J]. *Med Oncol*,2009,26:215-221.
- [9] Sato T, Saito H, Swensen J, et al. The human prohibitin gene located on chromosome 17q21 is mutated in sporadic breast cancer[J]. *Cancer Res*,1992,52:1643-1646.
- [10] Mishra S, Murphy LC, Murphy LJ. The Prohibitins: emerging roles in diverse functions[J]. *J Cell Mol Med*,2006,10:353-363.
- [11] Rastogi S, Joshi B, Dasgupta P, et al. Prohibitin facilitates cellular senescence by recruiting specific corepressors to inhibit E2F target genes[J]. *Mol Cell Biol*,2006,26:4161-4171.
- [12] Fusaro G, Dasgupta P, Rastogi S, et al. Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling[J]. *J Biol Chem*,2003,278:47853-47861.
- [13] Joshi B, Ko D, Ordonez-Ercan D, et al. A putative coiled-coil domain of prohibitin is sufficient to repress E2F1-mediated

- transcription and induce apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun,2003,312:459-466.
- [14] Jupe ER, Liu XT, Kiehlbauch JL, et al. The 3' untranslated region of prohibitin and cellular immortalization[J]. Exp Cell Res,1996,224:128-135.
- [15] Gamble SC, Odontiadis M, Waxman J. Androgens target prohibitin to regulate proliferation of prostate cancer cells[J]. Oncogene,2004,23:2996-3004.
- [16] Seow TK, Ong SE, Liang RC, et al. Two-dimensional electrophoresis map of the human hepatocellular carcinoma cell line, HCC-M, and identification of the separated proteins by mass spectrometry[J]. Electrophoresis,2000,21:1787-1813.

收稿日期: 2010-02-20

• 消息 •

### 《中华实验和临床感染病杂志(电子版)》征稿启事

《中华实验和临床感染病杂志(电子版)》为中华医学会主办的感染病学专业学术电子期刊,是一本在载体形式上与纸媒体相互补充的多媒体光盘期刊(CD-ROM)。本刊以电子期刊特有的表现形式,运用影视语言和多媒体技术登载有关感染病的专业论著、专家讲坛、临床病理讨论及学术会议等,图文声像并茂,是广大感染病工作者了解当前学科前沿、掌握最新技术的有效工具。本刊内容主要包括各种感染病的病原学、流行病学、免疫学、临床诊断及预防的实践经验和研究成果,以及本领域新技术、新方法的重要进展。本刊常设的主要栏目有述评、专家讲座、基础研究、临床研究、继续教育园地、经验交流、病例报告、疑难病例分析、综述、临床病例荟萃、设备技术介绍、国内外学术动态等。

#### 本刊特色栏目:

- (1) 继续教育园地(视频);
- (2) 临床病例荟萃(病例分析、典型图像分析、专家点评)。

#### 本刊的办刊宗旨是:

贯彻党和国家的卫生工作方针政策,贯彻理论与实践、普及与提高相结合的办刊方针,反映我国感染病临床和科研工作的重大进展,促进国内外感染病学学术交流。

目前,杂志的网络版已经开通,网址为<http://www.j-ditan.org.cn/>,欢迎您点击。您只需简单登陆,即可免费下载期刊的PDF版文章和视频讲座。

本杂志为季刊,16开,64页,逢季中月15日出版。每期定价28元,全年定价112元。编辑部常年办理邮购,邮发代号:80-729,欢迎订阅。

通讯地址:北京市朝阳区京顺东街8号《中华实验和临床感染病杂志(电子版)》编辑部

邮编:100015

电话:010-84322058

传真:010-84322059

Email: editor.ditan@gmail.com