

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.07.004

· 基础研究 ·

lncRNA SUMO1P3 诱导肝癌 HepG2 细胞对索拉菲尼耐药的分子机制

张生^a, 熊万成^b, 苗志钊^a, 周兵^a (新乡医学院 第一附属医院 a. 肝胆胰脾外科; b. 普外科, 河南 卫辉 453100)

[摘要] **目的:** 探讨长链非编码 RNA 小泛素样修饰蛋白 1 假基因 3 (lncRNA SUMO1P3) 促进肝细胞癌 (HCC) HepG2 细胞对索拉菲尼 (SR) 耐药的分子机制。 **方法:** 体外培养 HCC 细胞 HepG2, 采用持续接触浓度递增诱导法建立 SR 耐药细胞 HepG2/SR, 以 HepG2 细胞作为对照, qPCR 法检测 HepG2/SR 细胞中 SUMO1P3 的表达。利用脂质体转染技术, 在 HepG2/SR 细胞中分别转染 si-SUMO1P3 和 si-NC; 在 HepG2 细胞中分别转染 pc-SUMO1P3 和 pc-DNA, 后经 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 SR 处理 24 h, qPCR 法检测转染细胞中 SUMO1P3 表达水平, CCK-8 法、Transwell 实验和 FCM 分别检测转染细胞的增殖、迁移和侵袭能力和凋亡水平, WB 法检测细胞中 cyclin D1、Bcl2、BAX、MMP-2 和 MMP-9 的表达。 **结果:** 成功构建 SR 耐药细胞 HepG2/SR, HepG2/SR 细胞中 SUMO1P3 表达水平显著高于 HepG2 细胞 ($P < 0.01$)。在 HepG2/SR 细胞敲减 SUMO1P3 后, 与 si-NC 组比较, si-SUMO1P3 组细胞中 SUMO1P3 的表达与细胞增殖、迁移、侵袭能力及 cyclin D1、Bcl2、MMP-2 和 MMP-9 表达均显著降低, 细胞凋亡率和 BAX 的表达均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。HepG2 细胞过表达 SUMO1P3 后, 与 pc-DNA 组比较, pc-SUMO1P3 组细胞的增殖、迁移、侵袭能力及 cyclin D1、Bcl2、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达均显著升高, 细胞凋亡率和 BAX 的表达均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 pc-DNA+SR 组比较, pc-SUMO1P3+SR 组 HepG2 细胞的增殖、迁移、侵袭能力及 cyclin D1、Bcl2、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达均显著升高, 细胞凋亡率和 BAX 的表达均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。 **结论:** lncRNA SUMO1P3 可通过调控 HCC 细胞的周期、凋亡等多种信号通路分子诱导细胞对 SR 的耐药, 从而影响 HepG2 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并抑制细胞凋亡与诱导细胞对 SR 的耐药。

[关键词] 长链非编码 RNA 小泛素样修饰蛋白 1 假基因 3; 肝细胞癌; 索拉菲尼耐药; HepG2 细胞; HepG2/SR 细胞; 增殖; 凋亡; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R735.7; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)07-0631-08

Molecular mechanisms of sorafenib resistance induced by lncRNA SUMO1P3 in hepatocellular carcinoma HepG2 cells

ZHANG Sheng^a, XIONG Wancheng^b, MIAO Zhizhao^a, ZHOU Bing^a (a. Department of Hepatobiliary-Pancreatic and Spleen Surgery; b. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the molecular mechanisms of sorafenib (SR) resistance induced by long non-coding RNA small ubiquitin-like modifier 1 pseudogene 3 (lncRNA SUMO1P3) in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** HCC cells HepG2 were cultured *in vitro* and acted as the control group. The expression of SUMO1P3 was detected by qPCR in HepG2/SR cells, which was induced by continuously increasing the contact concentration. si-SUMO1P3 and si-NC were transfected into HepG2/SR cells by Lipofectamine. pc-SUMO1P3 and pc-DNA were transfected into HepG2 cells respectively, and then treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ SR for 24 hours. qPCR was used to detect the expression levels of SUMO1P3 in the transfected cells. The proliferation, migration, invasion and apoptosis of transfected cells were detected by CCK-8, Transwell assay, and FCM, respectively. Western blotting assay was conducted to detect the expression of cyclin D1, Bcl2, BAX, MMP-2, and MMP-9 in the different cell groups. **Results:** Sorafenib-resistant HepG2/SR cells were successfully constructed. The expression level of SUMO1P3 in the HepG2/SR cells was significantly higher than that in the HepG2 cells ($P < 0.01$). After SUMO1P3 was knocked out in the HepG2/SR cells, compared with in the si-NC group, in the si-SUMO1P3 group the expression of SUMO1P3, the proliferation, migration and invasion of cells and the protein levels of cyclin D1, Bcl2, MMP-2 and MMP-9 were all significantly lower while the percentage of apoptotic cells and the expression of BAX were significantly higher ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After SUMO1P3 was over-expressed in the HepG2 cells, compared with in the pc-DNA group, the proliferation, migration and invasion of cells in the pc-SUMO1P3 group and the protein levels of cyclin D1, Bcl2, MMP-2 and MMP-9 were all significantly higher while the percentage of apoptotic cells and the expression of BAX were significantly lower ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Similarly, compared with in the pc-DNA+SR group, the proliferation, migration and invasion of

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (No.LHGJ20210529)

[作者简介] 张生 (1988—), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事肝胆胰脾肿瘤的基础与临床治疗研究, E-mail: shengzhang202201@163.com

[通信作者] 周兵, E-mail: zhoubing2022_01@163.com

HepG2 cells in the pc-SUMO1P3+SR group and the protein levels of cyclin D1, Bcl2, MMP-2 and MMP-9 were all significantly higher while the percentage of apoptotic cells and the expression of BAX were significantly lower ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** lncRNA SUMO1P3 can induce the resistance of HepG2 cells to sorafenib by promoting the proliferation, migration and invasion and inhibiting the apoptosis of HepG2 cells.

[Key words] long non-coding RNA small ubiquitin-like modifier 1 pseudogene 3 (lncRNA SUMO1P3); hepatocellular carcinoma (HCC); sorafenib resistance; HepG2 cell; HepG2/SR cell; proliferation; apoptosis; migration and invasion

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(7): 631-638. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.07.004]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤之一,具有极高的复发率和病死率^[1]。据统计,2020年全球新增HCC患者约907万,新增死亡人数约830万,其病死率目前仅次于肺癌和结直肠癌,位居全球第三位^[2];中国HCC的病死率仅次于肺癌,其发病率位居第五位,HCC发病率与病死率均远超世界平均水平,全球新发病例和死亡病例有一半在中国^[3]。尽管手术治疗、肝移植和药物治疗改善了HCC的临床疗效,但由于其高复发率和耐药性,无法阻止疾病进展^[4]。索拉非尼(sorafenib, SR)是首个获批的全身用药,可使部分晚期HCC患者显著获益,然而,大多数患者会产生耐药,导致预后不良。因此,迫切需要阐明HCC对SR耐药的机制并寻找新的分子靶点。非编码RNA是一类无蛋白质编码功能的核酸序列^[5]。研究结果^[6]表明,长链非编码RNA(lncRNA)在多种肿瘤中异常表达,发挥癌基因或抑癌基因功能参与肿瘤的发生与发展。一些miRNA和lncRNA的失调与HCC耐药发生有着密切的联系^[7-9]。研究^[10-26]发现,lncRNA小泛素样修饰蛋白1假基因3(small ubiquitin-like modifier 1 pseudogene 3, SUMO1P3)在多种肿瘤组织和细胞中高表达并发挥致癌作用,但是其在HCC的SR耐药中的作用机制尚不明确。本研究通过观察SUMO1P3对HCC细胞HepG2及其SR耐药细胞HepG2/SR增殖、凋亡、迁移与侵袭的影响,探讨其发挥作用的分子机制,为抵抗HCC的SR耐药提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

肝癌细胞HepG2购自上海中乔新舟生物科技有限公司。WB配胶试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒、总RNA提取试剂盒、CCK-8试剂盒、BeyoFast™ SYBR Green One-Step qPCR试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司,SR购自SIGMA公司,qPCR试剂盒-SYBR Green I染料购自生工生物工程(上海)股份有限公司,细胞凋亡检测试剂盒购自美国BD公司,cyclin D1、Bcl2、BAX、MMP-2、MMP-9和GAPDH一抗以及HRP标记的山羊抗鼠和山羊抗兔的二抗均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 SR耐药细胞HepG2/SR的构建

HepG2细胞在含10% FBS的DMEM培养基中培养。在HepG2细胞培养液中持续加入SR,其起始浓度为0.01 μmol/L,传3代后将SR浓度由低至高逐渐提高至5 μmol/L,最终使培养细胞在含SR浓度为5 μmol/L的培养液中稳定传代生长,即构建成功人HCC耐药细胞HepG2/SR。

1.3 CCK-8法检测HepG2和HepG2/SR细胞的耐药性

将HepG2和HepG2/SR细胞经胰酶消化、计数后,接种于96孔板[(2×10⁴个细胞/孔)中,待细胞贴壁后,加入不同浓度的SR进行培养(第1孔浓度为51.2 μmol/L,倍比稀释至第9孔,第10孔(空白对照细胞)只加入0.25% DMSO),每组设3个复孔。培养箱培养48 h后弃去96孔板的培养基,每孔加入90 μL DMEM培养基和10 μL CCK-8试剂,于细胞培养箱中处理1 h后,用酶标仪检测450 nm波长处各孔的光密度(D)值,计算细胞的存活率[细胞存活率=(加药细胞D/空白对照细胞D)×100%]。

1.4 细胞培养、转染与SR处理

将HepG2和HepG2/SR细胞分别接种在6孔板(2×10⁵个/孔)中,在含10%FBS的DMEM培养基中培养。待每孔的细胞汇合度达50%左右时,按照Lipofectamine 2000的使用说明,在HepG2/SR细胞中转染si-SUMO1P3或si-NC,72 h后收集细胞进行后续试验;在HepG2细胞中转染SUMO1P3过表达载体(pc-SUMO1P3)或空载体(pc-DNA),待细胞的汇合度达70%~80%时,加入5 μmol/L SR继续培养,24 h后收集细胞,进行后续试验。

1.5 qPCR法检测HepG2和HepG2/SR细胞中SUMO1P3的表达水平

收集转染或处理后的各组细胞,用TRIzol提取细胞中总RNA,利用BeyoFast™ SYBR Green One-Step qPCR试剂盒进行后续实验。依照逆转录试剂盒说明书配置好反应体系后,按照设置反应温度为50℃,逆转录30 min,获取cDNA作为反应模板,随后进行qPCR反应。引物序列:SUMO1P3上游为5'-ACTGGG AATGGAGGAAGA-3',下游为5'-TGAGAAAGGATT GAGGGAAAAG-3';GAPDH上游为5'-GTCAGCCGC ATCTTCTTTTG-3',下游为5'-GCGCCCAATACG

ACCAAATC-3'。反应条件:95 °C预变性 2 min;95 °C变性 15 s,60 °C退火/延伸 30 s,共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 SUMO1P3 的相对表达量。

1.6 CCK-8 法检测 HepG2 和 HepG2/SR 细胞的增殖能力

将转染或处理后的各组细胞接种在 96 孔板中(5×10^3 个细胞/孔)上,分别在培养 0、24、48 和 72 h 时,在每孔中加入 10 μ L CCK-8 溶液,继续培养 2 h 后,使用酶标仪检测 450 nm 波长处各孔的 *D* 值,根据 *D* 值绘制细胞的增殖曲线。

1.7 Transwell 实验检测 HepG2 和 HepG2/SR 细胞的迁移和侵袭能力

用 Transwell 小室法进行细胞迁移和侵袭实验。细胞迁移实验:收集转染或处理后的各组细胞,用无血清培养基制备密度为 1×10^5 个/mL 的单细胞悬液,向 Transwell 小室上室中加入 100 μ L 悬液,下室中加入 600 μ L 含 10%FBS 的培养基作为诱导剂,培养 24 h 后,取出上室,用 4% 甲醛溶液固定 10 min,随后用 0.1% 结晶紫染色 5 min,PBS 清洗后,用棉签轻轻擦除上室内壁的细胞,置于显微镜下观察并拍照,随机选取 5 个视野,计算穿膜细胞数。细胞侵袭实验:需预先在 Transwell 小室上膜预铺人工基质胶,其他步骤同细胞迁移实验。

1.8 FCM 检测 HepG2 和 HepG2/SR 细胞的凋亡水平

收集转染或处理后的各组细胞,分别用 PI 单染色法和 Annexin V-FITC/PI 双染法进行凋亡检测。PI 单染色法:根据试剂盒说明书方法,将收集的细胞重悬于 100 μ L 结合缓冲液中,分别加入 5 μ L PI 染色液,室温下避光处理 15 min 后,加入 0.9 mL 结合缓冲液,迅速上流式细胞仪进行检测,并用 CellQuest 软件采集、分析各组凋亡细胞的比例。Annexin V-FITC/PI 双染法:将收集的细胞重悬于 100 μ L 结合缓冲液中,分别加入 5 μ L Annexin V-FITC 染色液和 5 μ L PI 染色液,室温下避光处理 15 min 后,加入 0.9 mL 结合缓冲液,迅速上机检测,并用 CellQuest 软件采集、分析各组凋亡细胞的比例。

1.9 WB 法检测 HepG2 和 HepG2/SR 细胞中相关蛋白的表达

各组细胞经转染或处理后,在培养板各孔中加入适量 RIPA 中性裂解液,置于冰上裂解 3 min 后收集细胞,经低温超声和离心后,取上清液进行蛋白定量。蛋白样品经 BCA 法检测浓度后,加入 SDS 上样缓冲液煮沸,使蛋白变性。取 20 μ g 蛋白样品,进行 10% SDS-PAGE,用湿转法将蛋白质转移到 NC 膜上,在 5% TBST 脱脂奶粉溶液中封闭 1 h,PBS 洗膜 3 次(5 min/次)。加入均以 1:1 000 稀释的 cyclin D1、Bcl2、BAX、MMP-2 和 MMP-9 一抗,4 °C 过夜。PBS 洗膜 3 次后,加入 HRP 标

记的二抗(1:2 000),37 °C 下处理 1 h。PBS 洗膜后,采用化学发光法显影。以 GAPDH 为内参照,用 ImageJ 软件分析蛋白条带的灰度值。

1.10 统计学处理

qPCR 法、CCK-8 法、Transwell 实验、FCM 和 WB 法等实验均重复 3 次。采用 GraphPad 8.0 软件进行数据分析和绘图,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 构建的 HepG2/SR 细胞高表达 SUMO1P3

通过逐渐提高培养基中 SR 浓度的方法成功构建 SR 耐药细胞 HepG2/SR。CCK-8 法检测结果(图 1A)显示,经不同浓度的 SR 处理后,HepG2/SR 细胞对 SR 的耐受性显著高于 HepG2 细胞($t=5.612、16.630、9.432、48.500、31.770、13.410、10.460、13.220、16.200$,均 $P < 0.01$)。SR 对 HepG2 细胞的半抑制浓度(IC_{50})为 4.40 μ mol/L,显著低于 SR 对 HepG2/SR 细胞的 IC_{50} (57.73 μ mol/L),表明 SR 耐药细胞 HepG2/SR 构建成功。qPCR 法检测结果(图 1B)显示,HepG2/SR 细胞中 SUMO1P3 的表达水平显著高于 HepG2 细胞($t=36.370, P < 0.01$)。结果表明,HepG2 细胞获得耐药性后,SUMO1P3 的表达水平也随之升高。

2.2 转染 si-SUMO1P3 显著抑制 HepG2/SR 细胞的增殖能力并诱导细胞凋亡

转染 si-SUMO1P3 后,与 si-NC 组比较:(1) si-SUMO1P3 组 HepG2/SR 细胞中 SUMO1P3 的表达水平显著下降($t=36.370, P < 0.01$;图 2A);(2) si-SUMO1P3 组 HepG2/SR 细胞在 1~4 d 的增殖能力均显著下降($t=7.057、5.241、4.683、5.757$,均 $P < 0.01$;图 2B);(3) si-SUMO1P3 组 HepG2/SR 细胞中 PI 阳性细胞比例显著上升($t=10.200, P < 0.01$;图 2C,D);(4) si-SUMO1P3 组 HepG2/SR 细胞凋亡率显著升高($t=22.89, P < 0.01$;图 2E、F)。结果表明,敲减 SUMO1P3 可显著降低 HepG2/SR 细胞的增殖能力,并诱导细胞凋亡和坏死。

2.3 敲减 SUMO1P3 可显著抑制 HepG2/SR 细胞的迁移和侵袭能力

Transwell 实验结果(图 3)显示,与 si-NC 组相比, si-SUMO1P3 组 HepG2/SR 细胞的迁移和侵袭能力均明显降低($t=5.135、7.220$,均 $P < 0.01$)。结果表明,敲减 SUMO1P3 可显著降低 HepG2/SR 细胞的迁移和侵袭能力。

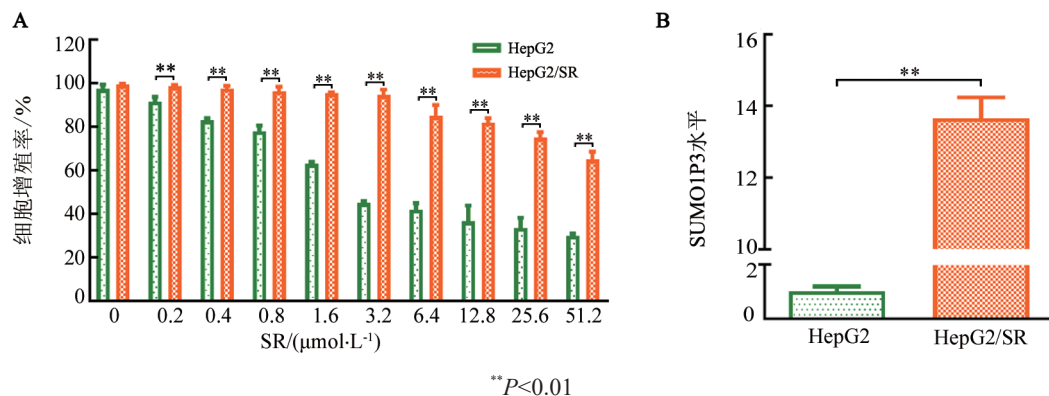


图1 HepG2/SR细胞构建(A)及其SUMO1P3的表达(B)

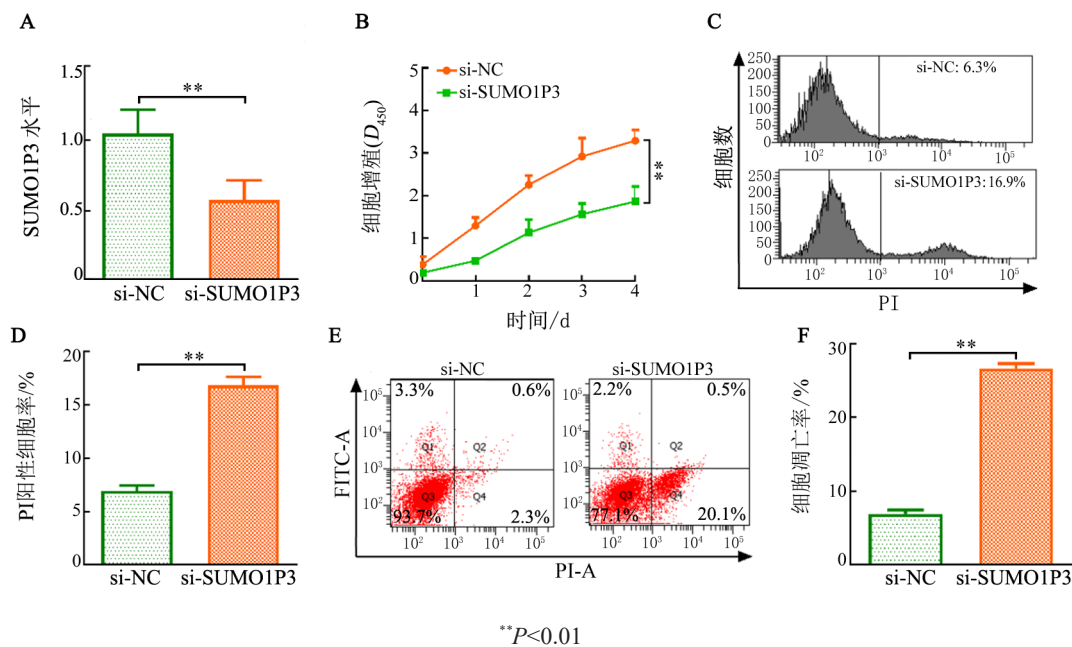
A: qPCR 法检测细胞中SUMO1P3 的表达; B: 用 CCK-8 法检测细胞的增殖能力;
C~F: FCM 检测 PI 阳性细胞的比例和细胞凋亡率

图2 敲减SUMO1P3 对HepG2/SR细胞SUMO1P3表达及细胞增殖和凋亡的影响

2.4 转染 pc-SUMO1P3 通过促进细胞增殖并抑制凋亡诱导 HepG2 细胞 SR 耐药

qPCR 实验结果(图 4A)显示,与 pc-DNA 组相比,pc-SUMO1P3 组 HepG2 细胞中 SUMO1P3 表达显著升高($t=5.990, P<0.01$);经 5 μmol/L SR 处理后,与 pc-DNA+SR 组相比,pc-SUMO1P3+SR 组 HepG2 细胞中 SUMO1P3 的表达仍显著升高($t=14.410, P<0.01$)。

CCK-8 法检测结果(图 4B)表明,与 pc-DNA 组相比,pc-SUMO1P3 组 HepG2 细胞在转染后第 2~4 天的增殖能力均显著增强($t=3.259、4.131、4.155, P<0.05$ 或 $P<0.01$);经 5 μmol/L SR 处理后,与 pc-DNA+SR 组相比,pc-SUMO1P3+SR 组 HepG2 细胞增殖能力在第 1~4 天均显著升高($t=6.587、3.100、5.295、4.330, P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

FCM 检测结果(图 4C、D)显示,与 pc-DNA 组相比,pc-SUMO1P3 组 PI 阳性的 HepG2 细胞比例显著下降($t=6.124, P<0.01$);经 5 μmol/L SR 处理后,与 pc-DNA+SR 组相比,pc-SUMO1P3+SR 组 PI 阳性细胞比例仍显著降低($t=6.124, P<0.01$)。Annexin V-FITC/PI 双染 FCM 检测结果(图 4E、F)显示,与 pc-DNA 组相比,pc-SUMO1P3 组 HepG2 细胞凋亡率显著降低($t=8.911, P<0.01$)。经 5 μmol/L SR 处理后,与 pc-DNA+SR 组相比,pc-SUMO1P3+SR 组 HepG2 细胞凋亡率仍显著降低($t=3.576, P<0.01$)。

上述实验结果表明,过表达 SUMO1P3 可使 HepG2 细胞的增殖能力和抗凋亡能力显著增强,同时也增强了 HepG2 细胞对 SR 的耐受性。SUMO1P3 通过增强 HepG2 细胞对 SR 的耐受性促进细胞增殖和抑制凋亡。

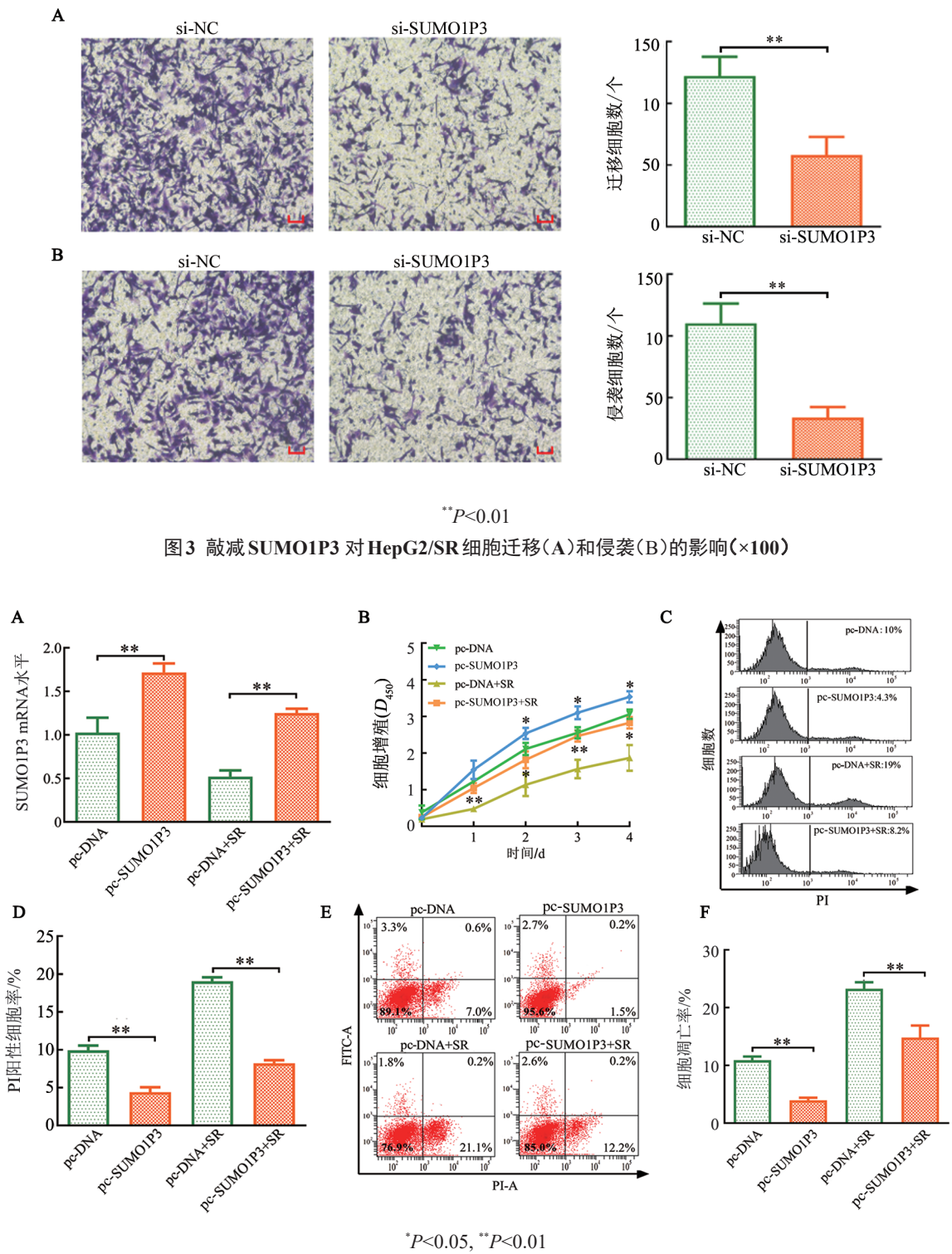


图4 上调SUMO1P3对不同处理的HepG2细胞中SUMO1P3表达、细胞增殖与凋亡的影响

2.5 上调SUMO1P3可通过促进细胞迁移和侵袭并诱导HepG2细胞SR耐药

Transwell实验结果(图5)显示,与pc-DNA组相比,pc-SUMO1P3组HepG2细胞的迁移和侵袭能力均显著升高($t=7.462、10.73$,均 $P<0.01$);经5 $\mu\text{mol/L}$ SR处理后,与pc-DNA+SR组相比,pc-SUMO1P3+SR组

HepG2细胞的迁移和侵袭细胞数仍显著升高($t=9.052、7.112$,均 $P<0.01$)。结果表明,上调SUMO1P3可显著增强HepG2细胞的迁移和侵袭能力,同时也增强了HepG2细胞对SR的耐受性。SUMO1P3通过增强HepG2细胞对SR的耐受性来促进细胞的迁移和侵袭。

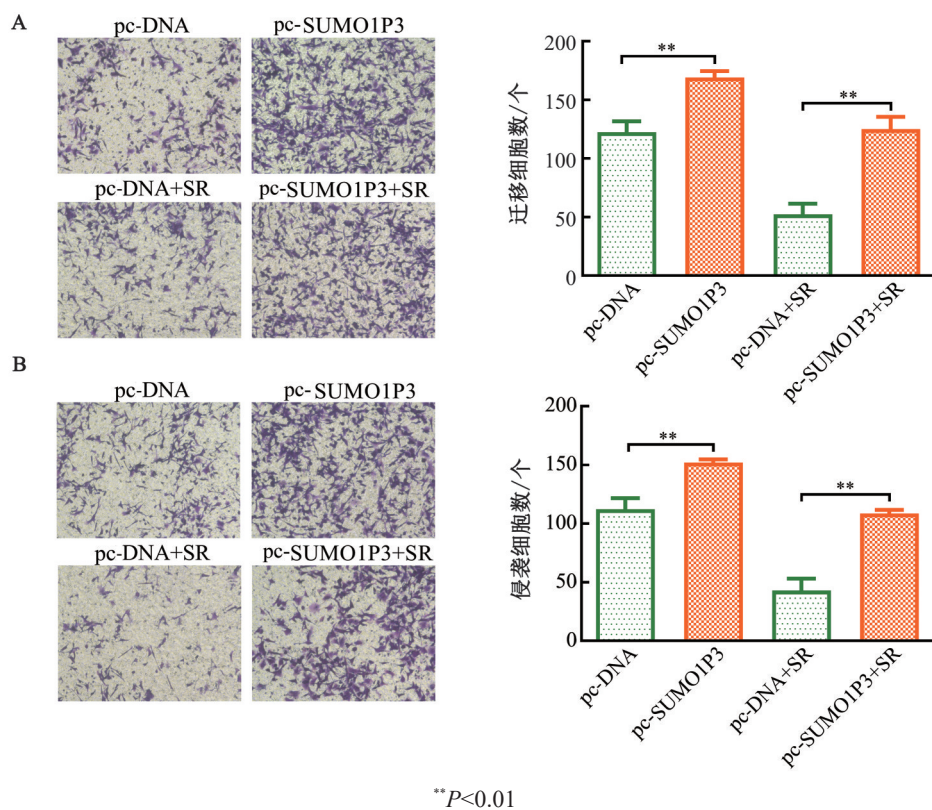


图5 上调SUMO1P3对不同处理的HepG2细胞迁移(A)和侵袭(B)的影响($\times 100$)

2.6 SUMO1P3通过调节细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭相关信号通路诱导HepG2细胞对SR的耐药

WB法检测结果(图6)显示,敲减SUMO1P3后,与si-NC组相比,si-SUMO1P3组HepG2/SR细胞中cyclin D1、Bcl2、MMP-2和MMP-9的表达水平均显著降低($t=7.976$ 、 6.989 、 4.960 、 3.580 , $P<0.05$ 或 $P<0.01$),而BAX的表达水平显著升高($t=3.830$, $P<0.05$)。过表达SUMO1P3后,与pc-DNA组相比,pc-SUMO1P3组HepG2细胞中cyclin D1、Bcl2、MMP-2和MMP-9的表达水平均显著升高($t=4.416$ 、

7.513 、 7.342 、 9.546 , $P<0.05$ 或 $P<0.01$),而BAX的表达水平显著降低($t=9.143$, $P<0.01$)。经 $5\text{ }\mu\text{mol/L}$ SR处理后,与pc-RNA+SR组相比,pc-SUMO1P3+SR组HepG2细胞中cyclin D1、Bcl2、MMP-2和MMP-9蛋白的表达水平显著升高($t=4.750$ 、 3.720 、 14.710 、 6.178 , $P<0.05$ 或 $P<0.01$),而BAX的表达水平显著降低($t=9.323$, $P<0.01$)。结果表明,SUMO1P3通过调控细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭相关信号通路来诱导HepG2细胞对SR的耐药。

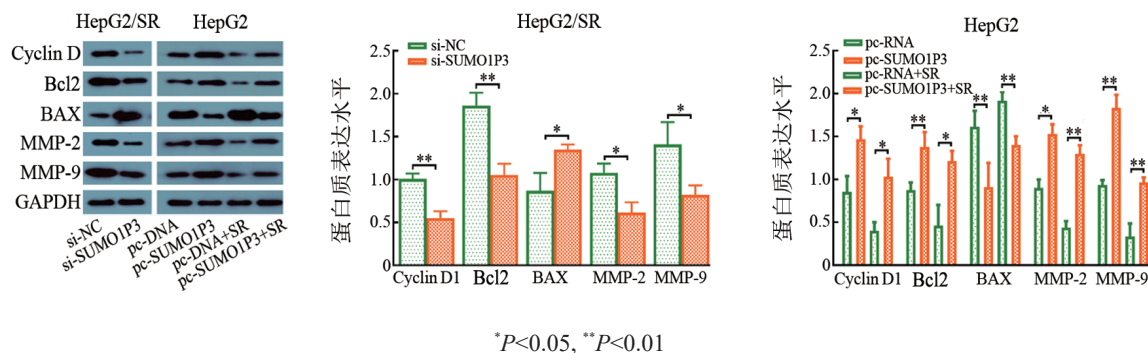


图6 SUMO1P3诱导HCC细胞SR耐药相关信号通路分子的表达

3 讨论

SUMO1P3是SUMO1假基因家族中的一种

lncRNA,已被证实参与多种肿瘤发生的病理过程。SUMO1P3最初在胃癌中发现表达上调^[13],后续研究结果证实,SUMO1P3在非小细胞肺癌^[25]、膀胱癌^[23]、

胶质瘤^[10,16]、胰腺癌^[19]、结直肠癌^[24]以及 HCC^[12,20,22,26]中均表达上调。SUMO1P3 在胃癌组织中高表达,可能是一种潜在的预后因素和胃癌的治疗靶点^[21]。敲减 SUMO1P3 后,膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力均受到抑制,凋亡细胞率升高^[23]。ZHOU 等^[26]的研究结果表明,敲减 SUMO1P3 可增强 HCC 的放疗敏感性;HU 等^[12]通过细胞实验和小鼠荷瘤试验证实, SUMO1P3 促进 HCC 的发生与发展;其他研究^[20,22]同样证实, SUMO1P3 可作为 HCC 的生物标志物。本研究聚焦 SUMO1P3 在 HCC 对 SR 耐药中的作用,探讨 HCC 细胞 SR 耐药的分子机制。

本研究首先成功构建了 HCC 的 SR 耐药细胞 HepG2/SR,发现 HepG2/SR 细胞中 SUMO1P3 表达水平显著高于 HepG2 细胞。据此推测, SUMO1P3 的表达与 HCC 细胞的耐药性密切相关。肿瘤耐药发生的一个重要原因是肿瘤细胞增殖信号的过度活化。通过转染 si-SUMO1P3 敲减 SUMO1P3 的表达,评价 SUMO1P3 表达对 HCC 的 SR 耐药细胞 HepG2/SR 的影响,与在其他肿瘤研究^[23-24,26]中的结果一致,本研究中敲减 SUMO1P3 显著抑制了 HepG2/SR 细胞的增殖能力,并促进其凋亡,表明 SUMO1P3 同样影响 HepG2/SR 细胞的增殖和凋亡,并通过干预其增殖和凋亡相关进程影响细胞对 SR 的耐药。此外,本研究通过转染 pc-SUMO1P3 上调 HepG2 细胞中 SUMO1P3 的表达,利用 SR 进行干预,反向评价其对该细胞 SR 的耐受性。结果显示, SUMO1P3 表达上调后, SR 对其增殖的抑制和凋亡的促进作用均减弱,表明 SUMO1P3 能够降低细胞对 SR 的敏感性。

肿瘤转移是导致其化疗抵抗发生的另一个主要原因^[27-29]。本研究结果显示,敲减 SUMO1P3 后, HepG2/SR 细胞的迁移与侵袭能力均显著降低;过表达 SUMO1P3 后, HepG2 细胞的迁移和侵袭能力显著增强;同时在 SR 的作用下,转染 pc-SUMO1P3 的 HepG2 细胞的迁移与侵袭能力显著高于对照组的 HepG2 细胞。实验结果表明, SUMO1P3 通过增强 HCC 细胞 SR 耐药来增强细胞的迁移和侵袭能力。

此外, SUMO1P3 在乳腺癌^[15]、HCC^[20]、非小细胞肺癌^[25]中都通过竞争性结合不同类型的 miRNA 发挥致癌作用。如 LIU 等^[15]的研究结果表明, SUMO1P3 能够通过负向调节 miR-320 促进乳腺癌的发生; WU 等^[20]的研究结果表明, SUMO1P3 能够通过靶向结合 miR-320a 而活化 Wnt/ β -catenin 信号通路,进而促进 HCC 细胞增殖与侵袭; ZHANG 等^[25]研究表明, SUMO1P3 能够竞争性吸附 miR-136 进而调节非小细胞肺癌的迁移与侵袭。在本研究初步探讨了 SUMO1P3 影响 HCC 细胞 SR 耐药的分子机制,结果

发现,敲减 SUMO1P3 的 HepG2/SR 细胞中细胞周期相关蛋白 cyclin D1、凋亡抑制分子 Bcl2、迁移与侵袭相关分子 MMP-2 和 MMP-9 表达均显著降低,而促凋亡分子 BAX 的表达显著升高,这与 HU 等^[12]的 SUMO1P3 在 MHCC97H 和 HepG2 细胞中的分子机制类似。与之相反,在 SR 的作用下,与对照组相比,上调 SUMO1P3 的 HepG2 细胞中 cyclin D1、Bcl2、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达显著升高, BAX 表达显著降低。实验表明, SUMO1P3 通过影响 HCC 细胞的周期、凋亡、迁移与侵袭相关的分子表达诱导细胞的 SR 耐药。

综上所述, SUMO1P3 能够促进 HCC 细胞增殖、迁移与侵袭,抑制细胞凋亡,并通过调控细胞周期、凋亡、迁移与侵袭相关的分子表达诱导细胞的 SR 耐药的发生,为阐明 HCC 细胞 SR 耐药发生的分子机制提供了新的思路,同时为治疗晚期 HCC 患者 SR 耐药提供了新的靶点。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI:10.3322/caac.21660.
- [2] 曹毛毛, 陈万青. GLOBOCAN 2020 全球癌症统计数据解读[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2021, 13(3): 63-69. DOI:10.12037/YXQY.2021.03-10.
- [3] 刘宗超, 李哲轩, 张阳, 等. 2020 全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-13. DOI:10.12151/JMCM.2021.02-01.
- [4] COURI T, PILLAI A. Goals and targets for personalized therapy for HCC[J]. Hepatol Int, 2019, 13(2): 125-137. DOI: 10.1007/s12072-018-9919-1.
- [5] ESTELLER M. Non-coding RNAs in human disease[J]. Nat Rev Genet, 2011, 12(12): 861-874. DOI:10.1038/nrg3074.
- [6] MERCER T R, DINGER M E, MATTICK J S. Long non-coding RNAs: insights into functions[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(3): 155-159. DOI:10.1038/nrg2521.
- [7] DING B S, LOU W Y, XU L, *et al.* Non-coding RNA in drug resistance of hepatocellular carcinoma[J]. Biosci Rep, 2018, 38(5): BSR20180915. DOI:10.1042/BSR20180915.
- [8] WEI L, WANG X W, LV L Y, *et al.* The emerging role of microRNAs and long noncoding RNAs in drug resistance of hepatocellular carcinoma[J/OL]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 147[2022-02-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6814027/>. DOI: 10.1186/s12943-019-1086-z.
- [9] 陈少坚, 林拥华, 吴友谊, 等. Lin28 对肝癌 HepG2 细胞 5-Fu 敏感性的影响及其分子机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020, 27(3): 261-266. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.03.008
- [10] DENG D N, MO Y, XUE L, *et al.* Long non-coding RNA SUMO1P3 promotes tumour progression by regulating cell proliferation and invasion in glioma[J/OL]. Exp Ther Med, 2021, 21(5): 491[2022-02-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>

- PMC8005699/. DOI:10.3892/etm.2021.9922.
- [11] HE J, LIU K, HOU X H, *et al.* Identification and validation of key non-coding RNAs and mRNAs using co-expression network analysis in pre-eclampsia[J/OL]. *Medicine*, 2021, 100(14): e25294 [2022-02-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33832098/>. DOI: 10.1097/MD.00000000000025294.
- [12] HU S, LIU J C, FENG S Y, *et al.* LncRNA SUMO1P3 acts as a prognostic biomarker and promotes hepatocellular carcinoma growth and metastasis[J/OL]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(9): 12479-12492 [2022-02-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8148505/>. DOI:10.18632/aging.202921.
- [13] LI P F. Non-coding RNAs and gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(18): 5411. DOI:10.3748/wjg.v20.i18.5411.
- [14] LIN H, GUO Q Q, LU S Y, *et al.* LncRNA SUMO1P3 promotes proliferation and inhibits apoptosis in colorectal cancer by epigenetically silencing CPEB3[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 511(2): 239-245. DOI:10.1016/j.bbrc.2019.02.006.
- [15] LIU J, SONG Z W, FENG C, *et al.* The long non-coding RNA SUMO1P3 facilitates breast cancer progression by negatively regulating miR-320a[J/OL]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(12): 5594-5602 [2022-02-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29312511/>.
- [16] LOU J Y, LUO J, YANG S C, *et al.* Long non-coding RNA SUMO1P3 promotes glioma progression via the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(18): 9571-9580. DOI:10.26355/eurrev_202009_23044.
- [17] MEI D Y, SONG H J, WANG K, *et al.* Up-regulation of SUMO1 pseudogene 3 (SUMO1P3) in gastric cancer and its clinical association[J/OL]. *Med Oncol*, 2013, 30(4): 709 [2022-02-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23996296/>. DOI: 10.1007/s12032-013-0709-2.
- [18] NA-ER A, XU Y Y, LIU Y H, *et al.* Upregulation of serum exosomal SUMO1P3 predicts unfavorable prognosis in triple negative breast cancer[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(1): 154-160. DOI:10.26355/eurrev_202101_24379.
- [19] TIAN C, JIN Y, SHI S S. Long non-coding RNA SUMO1P3 may promote cell proliferation, migration, and invasion of pancreatic cancer via EMT signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 6109-6115. DOI:10.3892/ol.2018.9378.
- [20] WU S S, CHEN S, LIN N, *et al.* Long non-coding RNA SUMO1P3 promotes hepatocellular carcinoma progression through activating Wnt/ β -catenin signalling pathway by targeting miR-320a[J/OL]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(5): 3108-3116 [2022-02-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7077605/>. DOI:10.1111/jcmm.14977.
- [21] XU Z, RAN J, GONG K, *et al.* LncRNA SUMO1P3 regulates the invasion, migration and cell cycle of gastric cancer cells through Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41(6): 574-581. DOI:10.1080/10799893.2020.1836494.
- [22] YU H H, BAI Y T, XU C, *et al.* The tissue expression levels of SUMO1P3 may be a reliable prognostic biomarker to predict the clinical outcomes in patients with HCC[J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(46): e21291 [2022-02-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7668506/>. DOI:10.1097/MD.00000000000021291.
- [23] ZHAN Y H, LIU Y C, WANG C L, *et al.* Increased expression of SUMO1P3 predicts poor prognosis and promotes tumor growth and metastasis in bladder cancer[J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 16038-16048 [2022-02-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4941296/>. DOI:10.18632/oncotarget.6946.
- [24] ZHANG L M, WANG P, LIU X M, *et al.* LncRNA SUMO1P3 drives colon cancer growth, metastasis and angiogenesis[J/OL]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(12): 5461-5472 [2022-02-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5752896/>.
- [25] ZHANG Y, LI Y, HAN L, *et al.* SUMO1P3 is associated clinical progression and facilitates cell migration and invasion through regulating miR-136 in non-small cell lung cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 113: 108686 [2022-01-17]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30851548/>. DOI:10.1016/j.biopha.2019.108686.
- [26] ZHOU Y, HE P, XIE X H, *et al.* Knockdown of SUMO1P3 represses tumor growth and invasion and enhances radiosensitivity in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 450(1/2): 125-134. DOI:10.1007/s11010-018-3379-8.
- [27] DE LAS RIVAS J, BROZOVIC A, IZRAELY S, *et al.* Cancer drug resistance induced by EMT: novel therapeutic strategies[J/OL]. *Arch Toxicol*, 2021, 95(7): 2279-2297 [2022-02-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8241801/>. DOI:10.1007/s00204-021-03063-7.
- [28] 王一同, 卢鸿健, 孔艺璇, 等. CAAP1 抑制肝癌 HepG2 细胞凋亡而促进其增殖、迁移和侵袭[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(3): 254-260. DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2021.03.006.
- [29] GUPTA P B, PASTUSHENKO I, SKIBINSKI A, *et al.* Phenotypic plasticity: driver of cancer initiation, progression, and therapy resistance[J/OL]. *Cell Stem Cell*, 2019, 24(1): 65-78 [2022-02-16]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7297507/>. DOI: 10.1016/j.stem.2018.11.011

[收稿日期] 2022-02-17

[修回日期] 2022-05-18

[本文编辑] 党瑞山