



慢病毒介导稳定敲低 Smurf1 细胞株的构建及对细胞迁移的影响

韦荣飞, 郭 静, 李梦媛, 朱瑞敏, 杨星九, 高 苒

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 构建慢病毒介导稳定敲低 Smurf1 的 HeLa 和 A549 细胞株并检测敲低 Smurf1 细胞迁移的影响。方法 将包装好的 Smurf1 敲低慢病毒感染 HeLa 和 A549 细胞, 7 d 后进行嘌呤霉素抗性筛选阳性细胞, Western blot 和 qPCR 检测敲低效果, 并进行 Transwell 检测 Smurf1 敲低对细胞迁移的影响。结果 利用干扰慢病毒系统成功构建稳定敲低 Smurf1 的 HeLa 和 A549 细胞株, 稳定敲低 Smurf1 抑制细胞的迁移速率。结论 敲低 Smurf1 抑制细胞迁移。

【关键词】 Smurf1; 慢病毒; RNA 干扰; 细胞迁移

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 04-0046-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.04.008

Establishment of two human tumor cell lines with lentivirus-mediated stably Smurf1 silencing and their effect on cell migration

WEI Rong-fei, GUO Jing, LI Meng-yuan, ZHU Rui-min, YANG Xing-jiu, GAO Ran

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish lentiviral expression vectors for Smurf1 silencing and assess the effects of Smurf1 silencing on cell migration. **Methods** HeLa and A549 cells were infected with lentiviral expression vectors for Smurf1 silencing respectively. After 7 days, the stable cell lines with Smurf1 silencing were obtained after puromycin-resistance screening, enrichment and expansion. The intracellular gene and protein levels of Smurf1 were detected by qPCR and western blot. Transwell assay was used to assess the effect of Smurf1 silencing on cell migration. **Results** The stable cell lines with Smurf1 silencing are constructed successfully. Silencing of Smurf1 down-regulated cell migration rate detected by Transwell assay. **Conclusion** Smurf1 promotes cell migration.

【Key words】 Smurf1; lentivirus; RNA interference; Cell migration

泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 是真核细胞内蛋白质降解的主要途径, 其参与众多的生物学过程, 在器官的代谢平衡调控过程中发挥重要的作用。泛素-蛋白酶体途径是泛

素在泛素激活酶 (ubiquitin-activating enzyme, E1)^[1]、泛素结合酶 (ubiquitin-conjugating enzyme, E2)^[2] 和泛素连接酶 (ubiquitin ligase, E3)^[3] 的酶促级联反应中对蛋白质进行标记并使其被蛋白酶体所识别、最

【基金项目】 协和青年基金资助, 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (3332016077), 中国医学科学院医学实验动物研究所基本科研业务费专项资助 (2016ZX310033)。

【作者简介】 韦荣飞 (1990 -), 女, 助理研究员, 研究方向: 免疫与肿瘤。E-mail: weirongfei2010@163.com。

【通讯作者】 高苒 (1980 -), 女, 副研究员, 研究方向: 肿瘤学、免疫学。E-mail: gaoran26@Hotmail.com。

终完成降解的过程。泛素-蛋白酶体途径的异常与多种疾病密切相关,包括恶性肿瘤、神经退行性疾病及自身免疫性疾病等^[4,5]。目前已有超过 600 个 E3 被发现,这些 E3 主要分为 RING (really interesting new gene) 锌指结构域类和 HECT (homologous to E6AP C-terminus) 结构域类^[3,6,7]。Smurf1 (SMAD ubiquitylation regulatory factor-1) 是 HECT 类泛素连接酶 Nedd4 家族的重要成员^[8,9]。Smurf1 在 TGF- β 信号通路的调控中至关重要,其主要通过靶向泛素化降解 TGF- β 信号通路中的多个蛋白来发挥其生物学功能,包括 Smad1、Smad2、Smad3、Smad5 等^[10-12]。前期研究报道揭示,Smurf1 在众多生物学过程中发挥重要的功能,包括调控骨稳态^[13,14]、肺动脉高压^[15,16]、ENREF-5、神经元轴突生长^[17,18]、细胞极性^[19,20]及肿瘤的发展^[21]等。近期,Xiaoning Li 等揭示 Smurf1 通过靶向降解 DAB2IP 蛋白调控细胞的迁移,DU145 和 MCF7 细胞中敲低 Smurf1 后,细胞迁移明显受到抑制^[22]。为了深入研究 Smurf1 在细胞迁移及小鼠肿瘤转移模型中的重要功能,本研究制备干扰慢病毒介导的 Smurf1 稳定敲低的 HeLa 和 A549 细胞株,为进一步研究 Smurf1 在肿瘤转移调控中的功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 干扰慢病毒和细胞系:Smurf1 干扰慢病毒为本实验室设计的 siRNA 序列(表 1)提供给上海吉凯基因公司合成包装;HeLa 和 A549 细胞系为本实验室所冻存。

表 1 Smurf1 siRNA 干扰序列

Tab. 1 Sequences of siRNA targeted Smurf1 gene

序列编号	siRNA 序列
Smurf1-1#	5'-GCAUCGAAGUGUCCAGAGAAG-3'
Smurf1-2#	5'-GGGCUCUCCAGUAUUCUATT-3'

1.1.2 主要试剂:胎牛血清、DMEM、胰酶购自美国 Gibco 公司;puromycin、结晶紫、RIPA 裂解液购自美国 Sigma 公司;Trizol 试剂、反转录试剂盒、蛋白 marker 及发光底物购自 Thermo 公司;Transwell 实验相关试剂购自 BD 公司;Polybrene 购自美国 Santa Cruz 公司;Smurf1 抗体购自 Abcam 公司;GAPDH 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.3 qPCR 所用引物序列:qPCR 所使用的引物见表 2。

表 2 qPCR 所用引物序列

Tab. 2 Oligonucleotide primers used in the qPCR assay

基因	引物序列
Smurf1	F: 5'-CTACCAGCGTTTGGATCTAT-3'
	R: 5'-TGTCTCGGCTCTGTAAGT-3'
Gapdh	F: 5'-AGGTCCGCTGTAACCGATTG-3'
	R: 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'

1.2 方法

1.2.1 慢病毒感染 HeLa 和 A549 细胞系:HeLa 和 A549 细胞以每孔 8×10^4 的细胞量接种于 6 孔板中,18 h 后,每孔加入 6×10^5 的病毒量,且每孔添加终浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Polybrene,8 h 后更换新鲜 DMEM (10% FBS,1% 双抗)培养基。感染 3~6 d 后观察绿色荧光强度,并添加嘌呤霉素进行阳性细胞筛选 2~3 d,随后富集阳性细胞并扩大培养,通过 qPCR 和 Western blot 检测 Smurf1 的 mRNA 和蛋白水平,确定 Smurf1 干扰慢病毒的敲低效率,得到 Smurf1 稳定敲低细胞株。

1.2.2 qPCR 检测:收集 Smurf1 稳定敲低的 HeLa 和 A549 细胞株,利用 Trizol 法提取 RNA,根据 Thermo 公司反转录试剂盒合成 cDNA,qPCR 检测 Smurf1 的 mRNA 水平,反应条件如下:95 $^{\circ}\text{C}$,1 min;95 $^{\circ}\text{C}$,15 s,60 $^{\circ}\text{C}$,30 s,40 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$,15 s,60 $^{\circ}\text{C}$,1 min,95 $^{\circ}\text{C}$,15 s。

1.2.3 Western blot 检测:收获稳定细胞株,RIPA 细胞裂解液冰上裂解 10 min,加入等体积的 $2 \times$ loading buffer,沸水煮 15 min,得到蛋白样品。将制备好的蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳;100 mA 恒流,3 h,将蛋白从凝胶中转移至 PVDF 膜上;TBST 溶液配制的 5% 脱脂奶粉室温封闭 45 min;Smurf1 抗体(1:1000 稀释)和 GAPDH 抗体(1:5000 稀释)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST 溶液洗 3 次,每次 10 min;二抗室温孵育 1 h;TBST 溶液洗 3 次,每次 10 min;ECL 显色系统显影检测目的蛋白。

1.2.4 Transwell 检测细胞转移:在 Transwell 专用 24 孔板里(下室)加入 500 μL 含 10% 血清的完全培养基(下层培养液);细胞计数后,将一定量的细胞用 200 μL 的无血清培养基(上层培养液)重悬,加入 Transwell 小室(上室)中;24 h 后,吸弃上层培养基,并用棉签轻轻擦拭除去上层细胞,剪下小室底膜置于载玻片上(底面朝上放置),PBS 洗 1 次,甲醇固定,0.1% 的结晶紫染色,观察,拍照。

2 结果

2.1 稳定干扰细胞株的建立

将携带 Smurf1 特异性干扰序列的慢病毒颗粒和对照病毒颗粒感染 HeLa 和 A549 细胞,感染 6 天后,镜下观察几乎 80% 的细胞可见绿色荧光,说明慢病毒颗粒已成功感染细胞(图 1)。随后,利用嘌呤霉素筛选阳性细胞,富集细胞继续培养,得到稳定干扰细胞株。

2.2 qPCR 鉴定干扰效果

将上述 6 种感染病毒颗粒的细胞分别提取总 RNA 后,qPCR 检测 Smurf1 的 mRNA 水平。结果如

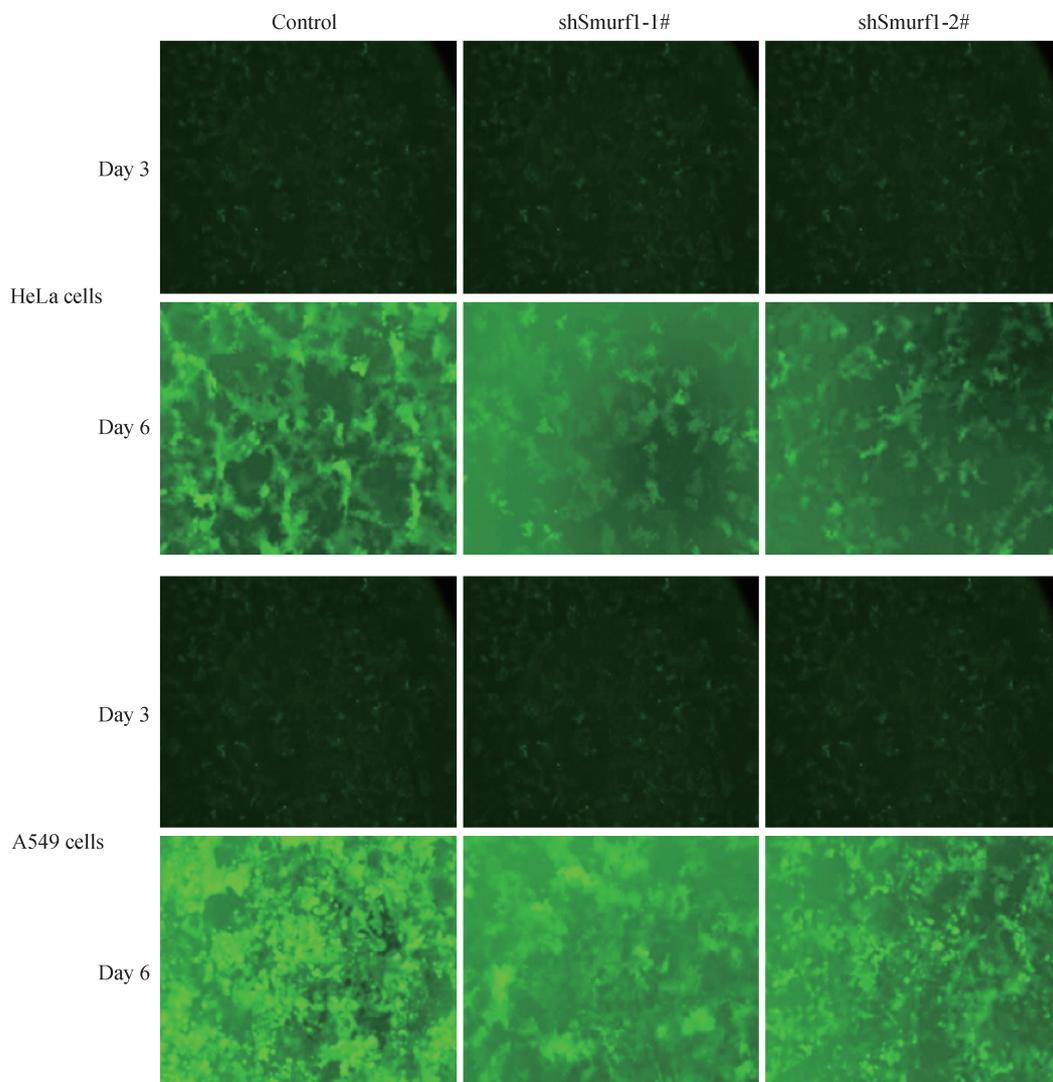
图 2 所示,Smurf1 的两条特异性干扰序列均能有效下调 Smurf1 的 mRNA 水平,约下调 90%。

2.3 Western blot 鉴定干扰效果

同样,收集上述 6 种感染病毒颗粒的细胞,提取细胞总蛋白,Western blot 检测 Smurf1 的蛋白水平。结果如图 3 所示,Smurf1 的两条特异性干扰序列均能有效下调 Smurf1 的蛋白水平。

2.4 干扰慢病毒稳定敲低 Smurf1 抑制细胞的迁移

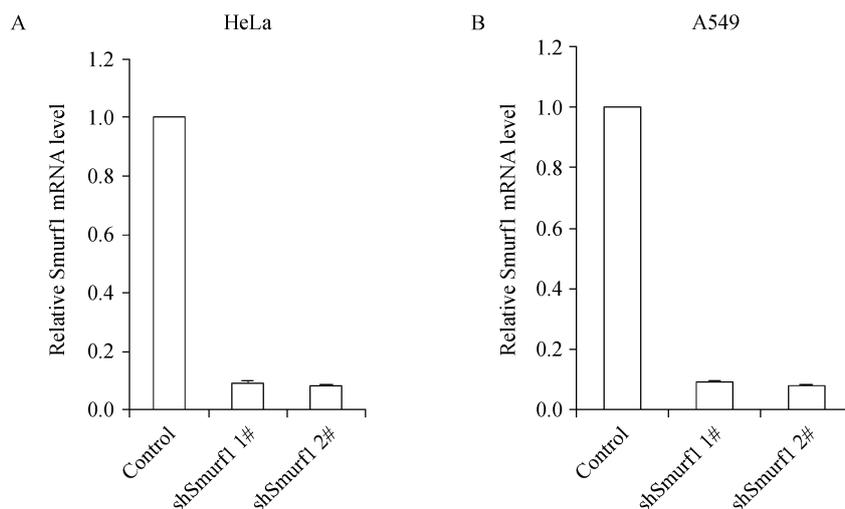
通过 Transwell 检测 Smurf1 敲低后对细胞迁移的影响。结果如图 4 所示,与对照组相比,干扰慢病毒稳定敲低 HeLa 细胞中的 Smurf1 后,穿过基底膜



注:上图(上部分)为对照、shSmurf1 1#和 2#慢病毒颗粒感染 HeLa 细胞 3 天和 6 天后细胞的绿色荧光强度观察结果;下图(下部分)为对照、shSmurf1 1#和 2#慢病毒颗粒感染 A549 细胞 3 天和 6 天后细胞的绿色荧光强度观察结果。

图 1 干扰慢病毒颗粒感染 HeLa 和 A549 细胞

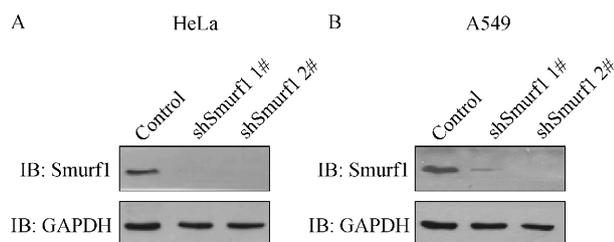
Fig. 1 Green fluorescence micrographs of HeLa (A) and A549 cells (B) at 3 and 6 days after lentivirus infection for Smurf1 silencing.



注:上图分别为对照、shSmurf1 1#和2#稳定干扰 HeLa (A)和 A549 (B)细胞株中,Smurf1 mRNA 水平的 qPCR 检测结果。

图 2 qPCR 检测细胞株中 Smurf1 的 mRNA 水平

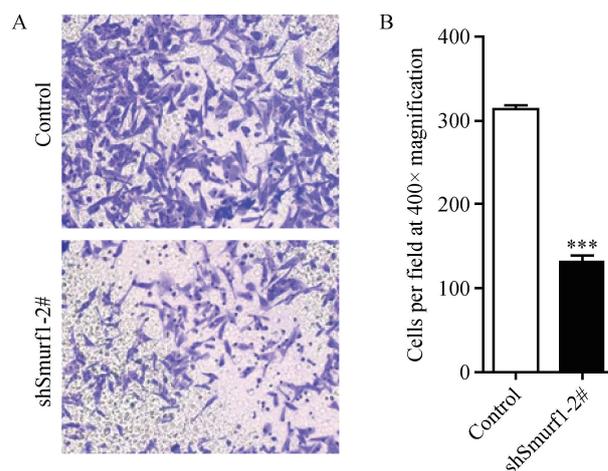
Fig. 2 The mRNA level in the HeLa (A) and A549 cells (B) of control and with stably shSmurf1 1# and 2# silencing by lentivirus infection, detected by qPCR.



注:上图分别为对照、shSmurf1 1#和2#稳定干扰 HeLa (A)和 A549 (B)细胞株中,Smurf1 蛋白水平的 Western blot 检测。

图 3 Western blot 检测细胞株中 Smurf1 的 mRNA 水平

Fig. 3 The mRNA level of Smurf1 in the HeLa (A) and A549 cells (B) stably lentivirus-infected for Smurf1 silencing, detected by Western blot.



注:上图为 Transwell 检测对照,shSmurf1 2#稳定干扰 HeLa 细胞迁移,400 × 显微镜拍照 (A)和统计学分析结果 (B)。

图 4 Transwell 检测敲低 Smurf1 对细胞迁移的影响

Fig. 4 Knockdown of Smurf1 leads to defective migration, detected by Transwell assay. A. Pictures were taken from a representative field, 400 × ; B. Cell number counted from five random fields.

的细胞明显减少 (图 4A), 统计结果显示, 敲低 Smurf1 明显降低细胞的迁移速率 (图 4B)。

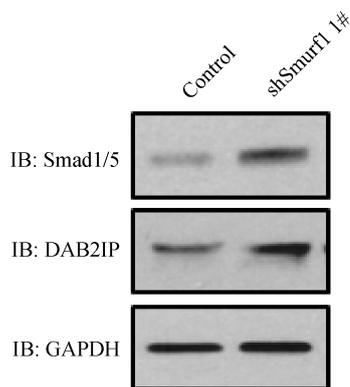
2.5 Smurf1 已知底物蛋白水平的验证

通过 Western blot, 检测干扰慢病毒稳定敲低 HeLa 细胞中 Smurf1 已知底物 Smad1、Smad5 和细胞迁移相关蛋白 DAB2IP 的蛋白水平。结果如图 5 所示, Smurf1 敲低后, Smad1/5 和 DAB2IP 的蛋白水平均明显上调, 该结果与前期相关报道一致, 说明通过干扰慢病毒已有效敲低 HeLa 细胞中的 Smurf1。

3 讨论

泛素-蛋白酶体途径参与众多的生物学过程, 其异常导致多种疾病的发生, 包括神经退行性疾病、恶性肿瘤及骨质疏松等。在泛素-蛋白酶体系统中

最重要的酶为泛素连接酶, 它决定底物的特异性, 也是蛋白质降解研究领域的热点。目前, 关于泛素连接酶 E3 与肿瘤的关系, 已有较多研究发现很多 RING 类 E3 为肿瘤抑制因子或致癌因子。Nedd4 家族与肿瘤的关联研究, 相关报道较少, 已知报道揭示了该家族中与 Smurf1 同源性高达 80% 的成员 Smurf2, 与肿瘤发生发展关系密切, 证明了 Smurf2 是一个肿瘤抑制因子, 并阐释具体作用机制^[23]。关



注:上图为 Western blot 检测对照、shSmurf1 1#稳定干扰 HeLa 细胞中 Smurf1 已知底物的蛋白水平。

图 5 Smurf1 已知底物 Smad1、Smad5 和 DAB2IP 的蛋白水平检测

Fig. 5 Western blot detection of protein levels of the known substrates of Smurf1 in HeLa cells stably transfected with virus for Smurf1 silencing. The protein levels of Smad1, Smad5 and DAB2IP are up-regulated in the HeLa cells transfected with shSmurf1 1# lentivirus.

于 Nedd4 家族成员与肿瘤的关系,研究揭示,40% 的前列腺癌和乳腺癌中均能检测到 WWP1 mRNA 和蛋白水平的上调^[24,25];Nedd4 在前列腺癌和膀胱癌中高表达;Smurf2 在食管癌中高表达,Smurf1 在胰腺癌中有 mRNA 水平的扩增^[26]。前期部分研究提示 Smurf1 能够促进肿瘤的发生发展,然而,其具体的作用机制尚不明确。关于 Smurf1 在调控肿瘤细胞迁移过程的生物学功能有待深入研究。

在研究肿瘤的发生发展及肿瘤细胞迁移的过程中,基因沉默是常规的研究手段。目前,关于基因沉默的方法有多种,包括传统意义上的 RNA 干扰、带有短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 的质粒或病毒载体介导的 RNA 干扰等方法。慢病毒载体感染能够同时感染分裂期和非分裂期的细胞,能够长期表达外源基因,稳定性好,且较安全^[27]。本研究针对人源 Smurf1 设计了 2 条干扰序列,采用的慢病毒载体可以同时表达 GFP 和 Puro 抗性,病毒感染 HeLa 和 A549 细胞,经荧光显微镜观察可见 GFP 表达,且经嘌呤霉素筛选得到阳性细胞,qPCR 和 Western blot 检测揭示 Smurf1 mRNA 和蛋白水平的明显下调,说明我们已经成功构建干扰慢病毒介导的 Smurf1 稳定敲低的 HeLa 和 A549 细胞株。同时,我们揭示了 Smurf1 的敲低明显抑制细胞迁移的速率,提示 Smurf1 在肿瘤细胞迁移过程中的重要功能。通过检测 Smurf1 已知底物 Smad1/5

和细胞迁移相关蛋白 DAB2IP 的蛋白水平,发现 shSmurf1 1#稳定干扰的 HeLa 细胞中,Smad1/5 和 DAB2IP 的蛋白水平均明显上调,进一步证实我们已成功构建干扰慢病毒介导的 Smurf1 稳定敲低的 HeLa 细胞株。

目前,关于 Smurf1 调控细胞迁移的作用机制有待进一步深入研究,或者其降解底物有待进一步挖掘,建立干扰慢病毒介导的 Smurf1 稳定敲低的 HeLa 和 A549 细胞株,能够为进一步的基础研究和临床应用奠定基础。

参考文献:

- [1] Schulman BA, Harper JW. Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways [J]. Nature Rev Mol cell Biol, 2009, 10(5): 319-331.
- [2] Ye Y, Rape M. Building ubiquitin chains; E2 enzymes at work [J]. Nature Rev Mol cell Biol, 2009, 10(11): 755-764.
- [3] Deshaies RJ, Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases [J]. Annu Rev Biochem, 2009, 78: 399-434.
- [4] Reinstein E, Ciechanover A. Narrative review: protein degradation and human diseases: the ubiquitin connection [J]. Ann Intern Med, 2006, 145(9): 676-684.
- [5] Dahlmann B. Role of proteasomes in disease [J]. BMC Biochem, 2007, 8(Suppl 1): S3.
- [6] Hatakeyama S, Nakayama KI. U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 302(4): 635-645.
- [7] Rotin D, Kumar S. Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases [J]. Nature Rev. Mol Cell Biol, 2009, 10(6): 398-409.
- [8] Cao Y, Zhang L. A Smurf1 tale: function and regulation of an ubiquitin ligase in multiple cellular networks [J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(13): 2305-2317.
- [9] Cao Y, Zhang L. Pharmaceutical perspectives of HECT-type ubiquitin ligase Smurf1 [J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(18): 3226-3233.
- [10] Cao Y, Wang C, Zhang X, et al. Selective small molecule compounds increase BMP-2 responsiveness by inhibiting Smurf1-mediated Smad1/5 degradation [J]. Sci Rep, 2014, 4: 4965.
- [11] Sangadala S, Metpally RP, Reddy BV. Molecular interaction between Smurf1 WW2 domain and PPXY motifs of Smad1, Smad5, and Smad6—modeling and analysis [J]. J Biomol Struct Dyn, 2007, 25(1): 11-23.
- [12] Alexandrova EM, Thomsen GH. Smurf1 regulates neural patterning and folding in Xenopus embryos by antagonizing the BMP/Smad1 pathway [J]. Dev Biol, 2006, 299(2): 398-410.
- [13] Yamashita M, Ying SX, Zhang GM, et al. Ubiquitin ligase Smurf1 controls osteoblast activity and bone homeostasis by

- targeting MEKK2 for degradation [J]. *Cell*, 2005, 121(1): 101–113.
- [14] Zhang Y, Wang C, Cao Y, et al. Selective compounds enhance osteoblastic activity by targeting HECT domain of ubiquitin ligase Smurf1 [J]. *Oncotarget*, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.10648. [Epub ahead of print]
- [15] Murakami K, Mathew R, Huang J, et al. Smurf1 ubiquitin ligase causes downregulation of BMP receptors and is induced in monocrotaline and hypoxia models of pulmonary arterial hypertension [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2010, 235(7): 805–813.
- [16] Rothman AM, Arnold ND, Pickworth JA, et al. MicroRNA-140-5p and SMURF1 regulate pulmonary arterial hypertension [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(7): 2495–2508.
- [17] Kannan M, Lee SJ, Schwedhelm-Domeyer N, et al. The E3 ligase Cdh1-anaphase promoting complex operates upstream of the E3 ligase Smurf1 in the control of axon growth [J]. *Development*, 2012, 139(19): 3600–3612.
- [18] Cheng PL, Lu H, Shelly M, et al. Phosphorylation of E3 ligase Smurf1 switches its substrate preference in support of axon development [J]. *Neuron*, 2011, 69(2): 231–243.
- [19] Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, et al. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity [J]. *Science*, 2005, 307(5715): 1603–1609.
- [20] Lee MG, Jeong SI, Ko KP, et al. RASSF1A directly antagonizes RhoA activity through the assembly of a Smurf1-mediated destruction complex to suppress tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(7): 1847–1859.
- [21] Xie P, Zhang M, He S, et al. The covalent modifier Nedd8 is critical for the activation of Smurf1 ubiquitin ligase in tumorigenesis [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3733.
- [22] Li X, Dai X, Wan L, et al. Smurf1 regulation of DAB2IP controls cell proliferation and migration [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(18):26057–26069
- [23] Blank M, Tang Y, Yamashita M, et al. A tumor suppressor function of Smurf2 associated with controlling chromatin landscape and genome stability through RNF20 [J]. *Nature Med*, 2012, 18(2): 227–234.
- [24] Chen C, Sun X, Guo P, et al. Ubiquitin E3 ligase WWP1 as an oncogenic factor in human prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2007, 26(16): 2386–2394.
- [25] Chen C, Zhou Z, Ross JS, et al. The amplified WWP1 gene is a potential molecular target in breast cancer [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(1): 80–87.
- [26] Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, et al. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation [J]. *Nature*, 1999, 400(6745): 687–693.
- [27] Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(2): 129–138.

[修回日期]2016–11–26