

JQ1 下调 SKP2 和上调 p27 诱导 HeLa 细胞凋亡的研究

王丽君,肖仲清,姚 亮,朱其舟,赵 菲,李隆玉

(江西省妇幼保健院,江西 南昌 330006)

摘 要: [目的] 观察 JQ1 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响及可能的作用机制。[方法] 采用 CCK-8 比色法检测 JQ1 对 HeLa 细胞增殖的影响,分为二甲亚砜(DMSO)对照组和 JQ1 处理组(终浓度分别为 0.01、0.1、1 和 10 $\mu\text{mol/L}$),分别处理 24、48、72 和 120h。将细胞分为 DMSO 对照组和 10 $\mu\text{mol/L}$ JQ1 处理组进行后续实验,细胞培养 12d 后计算细胞克隆形成数量;细胞培养 72h 后采用流式细胞仪检测细胞凋亡的变化,采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)和蛋白印迹法检测 S 期激酶相关蛋白 2(SK2)和 p27 的表达变化。[结果] JQ1 抑制 HeLa 细胞增殖,且作用呈剂量与时间依赖性,10 $\mu\text{mol/L}$ JQ1 处理细胞 72h 后细胞存活数量减半;与 DMSO 对照组相比,10 $\mu\text{mol/L}$ JQ1 显著抑制 HeLa 细胞克隆形成(细胞克隆形成数量: 3 ± 2 vs 240 ± 10 , $P < 0.001$);且能诱导 HeLa 细胞凋亡(细胞凋亡百分比: 12.80 ± 0.88 vs 2.90 ± 0.27 , $P < 0.01$);与 DMSO 对照组相比,JQ1 能抑制细胞 SKP2 mRNA 和蛋白表达(其中 SKP2 mRNA 表达倍数: 0.43 ± 0.02 vs 1.00 ± 0.03 , $P < 0.01$),并上调 p27 mRNA 和蛋白表达(p27 mRNA 表达倍数: 2.60 ± 0.13 vs 1.00 ± 0.11 , $P < 0.01$)。[结论] JQ1 通过诱导细胞凋亡来抑制 HeLa 细胞的增殖,其可能的机制是抑制 SKP2 表达和上调 p27 表达。

主题词: JQ1; HeLa 细胞; 细胞凋亡; S 期激酶相关蛋白 2; p27

中图分类号: R73-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)07-0533-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.07.B002

Study on JQ1 Inducing Apoptosis by Down-regulation of SKP2 and Up-regulation of p27 in HeLa Cells

WANG Li-jun, XIAO Zhong-qing, YAO Liang, et al.

(Maternal and Child Health Hospital of Jiangxi Province, Nanchang 330006, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of JQ1 on proliferation of HeLa cells and its potential mechanism. [Methods] HeLa cells were exposed to dimethyl sulfoxide (DMSO, control group) or different concentrations of JQ1 (0.01, 0.1, 1 and 10 $\mu\text{mol/L}$, JQ1 group) in the culture medium for 24, 48, 72 and 120h respectively, and cell proliferation analysis was performed using CCK-8 method. HeLa cells were exposed to DMSO or 10 $\mu\text{mol/L}$ JQ1 in the culture medium for 12d, and the number of colony formation was assayed by counting. HeLa cells were exposed to DMSO or 10 $\mu\text{mol/L}$ JQ1 in the culture medium for 72h, and the apoptosis was assayed by flow cytometry, and the expression of S-phase kinase-associated protein 2(SK2) and p27 were detected by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot methods. [Results] The proliferation of HeLa cells was inhibited by JQ1 in a time- and dose-dependent manner, a fifty percent inhibition of growth was seen after treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ concentration of JQ1 for 72h. Compared with DMSO control group, the colony formation was inhibited significantly in 10 $\mu\text{mol/L}$ JQ1-treated group (the number of colony formation: 3 ± 2 vs 240 ± 10 , $P < 0.001$); and cell apoptosis was induced significantly by 10 $\mu\text{mol/L}$ JQ1 (the percentage of apoptosis: 12.80 ± 0.88 vs 2.90 ± 0.27 , $P < 0.01$). Compared with DMSO control group, the expression of SKP2 was significantly decreased and the expression of p27 was significantly increased in JQ1-treated group (among them SKP2 mRNA expression folds: 0.43 ± 0.02 vs 1.00 ± 0.03 ; p27 mRNA expression folds: 2.60 ± 0.13 vs 1.00 ± 0.11 , both with $P < 0.01$). [Conclusion] JQ1 inhibits cell proliferation of HeLa cells via inducing apoptosis, which might depend on down-regulation of SKP2 and up-regulation of p27.

Subject words: JQ1; HeLa cells; cell apoptosis; S-phase kinase-associated protein 2(SK2); p27

含溴结构区和外端结构区蛋白家族 (the bro-

通讯作者: 李隆玉, 副院长, 主任医师, 硕士生导师; 江西省妇幼保健院 肿瘤科, 江西省南昌市八一大道 318 号 (330006); E-mail: lilongyu1103@sina.com

收稿日期: 2015-09-19; **修回日期:** 2015-11-28

modomain and extra-terminal domain, BET)是与乙酰化位点直接结合的蛋白结构域,参与染色质组蛋白的乙酰化,对基因的表达有着重要的调控作用,是治疗肿瘤的有效靶点^[1-4]。S 期激酶相关蛋白 2

(SKP2)是调控肿瘤细胞增殖的重要蛋白,在肿瘤细胞中往往高表达,它通过抑制 p21 和 p27 等抑癌蛋白促进肿瘤细胞的生长^[5-7]。研究发现在宫颈癌中往往伴随着 SKP2 的高表达和 p27 的低表达,并且 SKP2 受 BET 蛋白的转录调控^[8,9]。JQ1 是新合成的 BET 蛋白抑制剂,能够特异性抑制 BET 蛋白家族中 bromodomain containing 4(BRD4)。大量体内外研究表明 JQ1 通过诱导肿瘤细胞周期停止和细胞凋亡,明显抑制了肿瘤细胞生长^[2,10,11]。因此本研究应用 BET 蛋白抑制剂 JQ1 作用于宫颈癌 HeLa 细胞,探讨 JQ1 对 HeLa 细胞的作用及其机制,为临床治疗宫颈癌提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

宫颈鳞癌细胞系 HeLa(中国典型培养物保藏中心);RPMI-1640 培养基、胎牛血清和磷酸盐缓冲液(PBS)(美国 Gibco);JQ1(美国 Selleck Chemicals);CCK-8 试剂盒、结晶紫和 DMSO(美国 Sigma-Aldrich);Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒(美国 BD Pharmingen™);SKP2 鼠抗人单克隆抗体(美国 Invitrogen);Cleaved Caspase-3 兔抗人单克隆抗体、Cleaved Caspase-7 兔抗人多克隆抗体和 Cleaved PARP 兔抗人单克隆抗体(美国 Cell Signal);p27 兔抗人多克隆抗体和 β -actin 鼠抗人单克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology);高效 RIPA 组织/细胞裂解液(北京索来宝);羊抗小鼠 IgG/HRP 和羊抗兔 IgG/HRP(北京中杉金桥);SuperSignal West Pico 化学发光底物(美国 Thermo);RNeasy mini kit(美国 Qiagen);High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit、TaqMan® Gene Expression Master Mix、引物 GAPDH、SKP2 和 p27(美国 Invitrogen)。

1.2 细胞培养

HeLa 细胞培养于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,置于 37℃、5%浓度 CO₂ 的温湿培养箱中培养,2~3d 更换培养液,3~4d 传代。

1.3 CCK-8 比色法检测 HeLa 细胞活性

取指数生长期 HeLa 细胞,按每孔细胞 0.5×10^4 个接种至 96 孔板,细胞贴壁 2h 后,分别加入 10 μ l 等浓度 DMSO 溶解液或 10 μ l JQ1 溶液(终浓度分别

为 0.01、0.1、1 和 10 μ mol/L),加药处理后细胞再分别培养 24、48、72 和 120h,于各时间点每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,培养箱内继续孵育 1h 后,用酶标仪(波长 450nm)测定各孔的吸光度(OD₄₅₀)值。

1.4 HeLa 细胞克隆形成实验

取指数生长期 HeLa 细胞,按每孔细胞 500 个接种至 6 孔板,细胞贴壁 2h 后,分别加入终浓度为 10 μ mol/L 的 JQ1 溶液或等体积的 DMSO 溶解液,于培养箱内孵育 12d,用 PBS 洗 2 遍后,加入 10% 福尔马林固定细胞 5 min,再加入 0.05%结晶紫染色 30 min,洗涤晾干后拍照计数。

1.5 HeLa 细胞分组及处理

将 HeLa 细胞分成 DMSO 对照组和 JQ1 处理组。取指数生长期 HeLa 细胞,按每孔细胞 1×10^6 个接种至 6 孔板,细胞贴壁 2h 后,分别加入终浓度为 10 μ mol/L 的 JQ1 溶液或等体积的 DMSO 溶解液,于培养箱内孵育 72h,收集细胞后用于流式细胞仪检测、提取细胞总 RNA 或提取细胞总蛋白。

1.6 HeLa 细胞凋亡的检测

按 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明配置缓冲液。收集各组细胞后用冷 PBS 洗 1 遍,用缓冲液重悬细胞,调整细胞浓度至 1×10^6 个/ml,转移 100 μ l 细胞悬液至流式管内,分别加入 5 μ l PI 溶液和 7 μ l Annexin V-FITC 溶液,室温避光孵育 20min,再加入 400 μ l 缓冲液后上流式细胞仪检测。

1.7 Western blot 检测

JQ1 处理细胞 72h 后,用冷 PBS 洗 2 遍,加入高效 RIPA 组织/细胞裂解液收集裂解细胞,放置冰上裂解 30min,14 000g、4℃离心 15min,收集上清液即为总蛋白液,蛋白定量后常规电泳及转膜,用 5%脱脂牛奶室温孵育 1h 后,分别加入 SKP2 鼠抗人单克隆抗体(1:500)、p27 兔抗人多克隆抗体(1:200)、Cleaved Caspase-3 兔抗人单克隆抗体(1:1000)、Cleaved Caspase-7 兔抗人多克隆抗体(1:1000)、Cleaved PARP 兔抗人单克隆抗体(1:1000)或 β -actin 鼠抗人单克隆抗体(1:3000)4℃过夜,洗涤后加入羊抗小鼠 IgG/HRP 或羊抗兔 IgG/HRP(1:3000)室温孵育 1h,再于暗室中加入 Super Signal West Pico 化学发光底物孵育,置 X 光片夹中曝光。选取 β -actin 作为内参。

1.8 基因表达测定

按 RNeasy mini kit 试剂盒说明提取细胞总

RNA, 所得总 RNA 用紫外分光光度计测定总 RNA 的浓度及纯度。按说明采用 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit 进行反转录;采用 TaqMan® Gene Expression Master Mix 和相应引物进行 PCR 扩增,于 StepOne-Plus real-time PCR system 测定。反应条件:95℃10 min,40 个扩增循环 (95℃15s,60℃1min)。选取 GAPDH 作为内参,mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算^[12]。

1.9 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件,实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两样本比较采用 *t* 检验,方差不齐时采用近似 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 JQ1 对 HeLa 细胞增殖的抑制作用

通过 CCK-8 比色法检测发现,JQ1 对 HeLa 细胞增殖具有抑制作用,且作用呈剂量与时间依赖性(Table 1)。随着 JQ1 作用浓度及时间的增加,HeLa 细胞的存活率明显降低,当 10μmol/L 浓度 JQ1 处理 72h 后,HeLa 细胞存活数量减少一半,即半数抑制浓度(IC₅₀)为 10μmol/L。通过 HeLa 细胞克隆形成实验进一步证实 JQ1 能抑制 HeLa 细胞增殖(Figure 1)。10μmol/L JQ1 处理细胞 12d 后,与 DMSO 对照组相比,JQ1 显著抑制 HeLa 细胞克隆形成:细胞克隆形成数量为 3±2 vs 240±10,*P*=0.0006。因此选择 10μmol/L JQ1 进行后续实验,分析 JQ1 抑制 HeLa 细胞增殖的作用机制。

2.2 JQ1 诱导 HeLa 细胞凋亡研究

通过细胞流式仪检测 HeLa 细胞凋亡发现,JQ1 能明显诱导 HeLa 细胞凋亡(Figure 2)。与 DMSO 对照组相比,JQ1 处理后明显增加 HeLa 细胞的凋亡百分比:12.80±0.88 vs 2.90±0.27,*P*=0.0016。通过 Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3、Caspase-7 和 PARP 活化水平。发现与 DMSO 对照组相比,JQ1 能明显增加 HeLa 细胞 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-7 和 Cleaved PARP 蛋白水平,表明 JQ1 激活了 HeLa 细胞凋亡,细胞凋亡水平增加(Figure 3)。

2.3 JQ1 抑制 SKP2 表达和上调 p27 表达

通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测发现,JQ1

抑制了 SKP2 蛋白表达并上调了 p27 蛋白表达。与 DMSO 对照组相比,JQ1 能明显抑制 HeLa 细胞 SKP2 的表达:SKP2 mRNA 表达倍数,0.43±0.02 vs 1.00±0.03,*P*=0.0003;并上调 p27 的表达,p27 mRNA 表达倍数:2.60±0.13 vs 1.00±0.11,*P*=0.004。表明 JQ1 可能通过抑制 SKP2 表达和上调 p27 表达抑制 HeLa 细胞生长(Table 2,Figure 3)。

Table 1 The inhibition effect of JQ1 on proliferation of HeLa cells(%)

Concentrations (μmol/L)	24h	48h	72h	120h
0.01	100.10±1.79	99.50±3.99	98.40±5.50	94.90±5.66
0.1	98.20±2.44	97.90±2.31	96.90±3.16	91.70±5.09
1.0	93.90±3.67	89.90±3.89	82.70±3.78	75.40±4.60
10	81.50±3.27	71.50±5.37	49.10±3.59	43.40±2.32

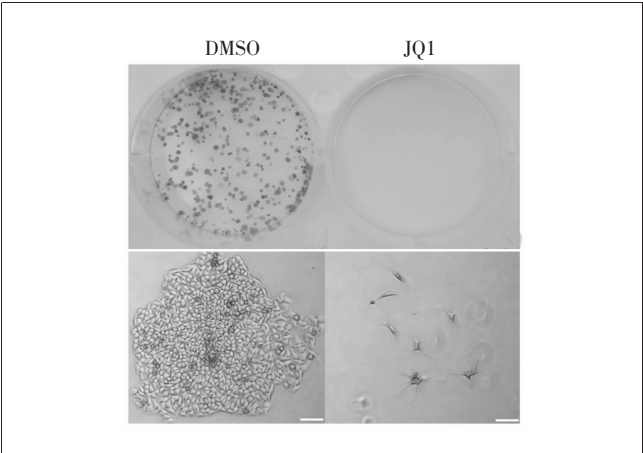


Figure 1 Colony formation of HeLa cells

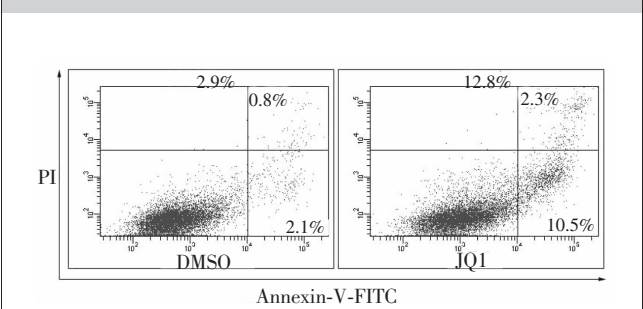
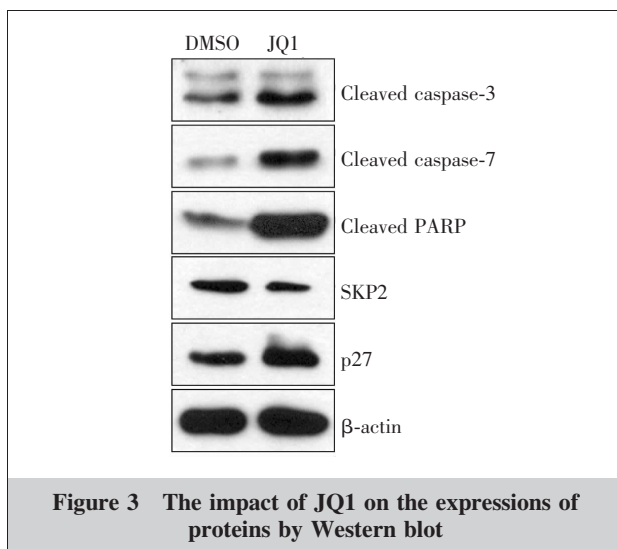


Figure 2 The impact of JQ1 on HeLa cells' apoptosis

Table 2 The impact of JQ1 on the expression of SKP2 mRNA and p27 mRNA ($\bar{x}\pm s$,n=3)

Groups	SKP2 mRNA	p27 mRNA
DMSO	1.00±0.03	1.00±0.10
JQ1	0.43±0.02*	2.60±0.13*

Note:*.Compared with DMSO group,*P*<0.01.



3 讨论

促癌基因的激活或抑癌基因的失活常导致肿瘤的形成,而这些基因的异常表达通常与转录因子或转录调控子的紊乱相关。BET 蛋白家族能够识别并结合组蛋白上乙酰化的赖氨酸残基,通过有效募集转录激活子来调控染色质的乙酰化,促进转录激活,因此抑制 BET 蛋白家族是目前治疗肿瘤的新药物靶点^[1,3,13]。BET 蛋白家族通常由 4 个蛋白组成,包括 BRD2、BRD3、BRD4 和 bromodomain testis-specific (BRDT),其中 BRD4 主要参与调控细胞有丝分裂期基因转录的开始,影响细胞生长及生存相关基因的转录,包括 SKP2、c-Myc 和 IL7R 等^[14,15]。JQ1 是一个化学合成物,能够特异性地与 BRD4 相竞争,从而将 BRD4 从染色质中释放出来,抑制 BRD4 的转录调控作用。抗肿瘤药物主要通过诱导肿瘤细胞凋亡、细胞毒性作用、抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移等机制来抑制肿瘤生长,JQ1 主要是通过诱导肿瘤细胞凋亡来抑制肿瘤细胞的增殖。大量体内外研究表明,JQ1 通过诱导肿瘤细胞生长周期停止和诱导肿瘤细胞凋亡,明显抑制肿瘤生长,尤其是造血来源肿瘤细胞,然而部分实体组织来源肿瘤细胞对其却不敏感,比如肺癌和乳腺癌等^[2,14,16]。然而 JQ1 对宫颈癌细胞的作用尚未见系统报道。本研究发现 JQ1 对宫颈癌 HeLa 细胞具有细胞毒性作用,且毒性作用呈时间与剂量依赖性。通过流式细胞仪检测发现,JQ1 主要通过诱导肿瘤细胞凋亡来抑制 HeLa 细胞

的增殖。

SKP2 属于 F-box 蛋白家族,通过泛素蛋白酶降解途径降解泛素化的蛋白质,参与细胞生长、凋亡及癌变相关基因的调控,在肿瘤的发生发展中发挥着重要作用,通常与肿瘤的预后成负相关^[5]。P27 是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子中的重要成员,可抑制多种 cyclin-cdk 复合物的活性,对细胞周期进行负调控,抑制细胞分裂和增殖;此外,p27 参与细胞凋亡的调控。有研究表明 p27 过度表达可诱导细胞凋亡,凋亡细胞量比对照组增加 7 倍,该研究认为 p27 促进凋亡的作用可能与其导致的 PARP (多聚核酶) 的裂解和 cyclinB1 的降解有关^[17]。研究发现在宫颈癌组织中往往存在 SKP2 的高表达与 p27 的低表达,并有研究表明 SKP2 通过泛素蛋白酶体途径降解磷酸化的 p27,是宫颈癌发生发展的重要原因^[6-8,18,19]。许多研究认为,JQ1 主要通过下调促癌基因 c-Myc 蛋白表达来抑制肿瘤的生长,然而 SKP2 同样受 BRD4 的转录调控,SKP2 在 JQ1 介导的肿瘤抑制中的作用尚不清楚^[2]。本研究发现,10 μmol/L 的 JQ1 作用于 HeLa 细胞 72h 后,能明显抑制 SKP2 蛋白的表达,并上调 p27 蛋白的表达,表明 JQ1 对宫颈癌 HeLa 细胞的抑制作用可能是通过下调 SKP2 和上调 p27 蛋白的表达而实现。

参考文献:

- [1] Da Costa D, Agathangelou A, Perry T, et al. BET inhibition as a single or combined therapeutic approach in primary paediatric B-precursor acute lymphoblastic leukaemia[J]. *Blood Cancer J*, 2013, 3: e126.
- [2] Delmore JE, Issa GC, Lemieux ME, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc [J]. *Cell*, 2011, 146(6): 904-917.
- [3] Muller S, Filippakopoulos P, Knapp S. Bromodomains as therapeutic targets[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2011, 13: e29.
- [4] Zuber J, Shi J, Wang E, et al. RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia[J]. *Nature*, 2011, 478(7370): 524-528.
- [5] Kitagawa K, Kotake Y, Kitagawa M. Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(8): 1374-1381.
- [6] Xu SY, Wang F, Wei G, et al. S-phase kinase-associated protein 2 knockdown blocks colorectal cancer growth via regulation of both p27 and p16 expression [J]. *Cancer*

- Gene Ther, 2013, 20(12):690-694.
- [7] Lin H, Lin X. The effect of Skp2 gene silencing on expression of p27 and proliferation of endometrial carcinoma cell line HEC-1A [J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2009, 45(4):310-312. [林颢, 林秀. Skp2 基因沉默对子宫内膜癌 HEC-1A 细胞 p27 蛋白表达及细胞增殖的影响 [J]. 中华妇产科杂志, 2009, 45 (4):310-312.]
- [8] Xue X, Gong PJ, Fan YX. Expressions of Skp2, p27 and C-myc in HeLa and SiHa cells[J]. Journal of Practical Obstetrics and Gynecology, 2012, 28(8):647-650. [薛翔, 公丕军, 范引侠. HeLa 和 SiHa 细胞中 Skp2, p27 和 C-myc 的表达[J]. 实用妇产科杂志, 2012, 28(8):647-650.]
- [9] Segura MF, Fontanals-Cirera B, Gaziol-Sovran A, et al. BRD4 sustains melanoma proliferation and represents a new target for epigenetic therapy[J]. Cancer Res, 2013, 73(20):6264-6276.
- [10] Dawson MA, Prinjha RK, Dittmann A, et al. Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia[J]. Nature, 2011, 478(7370):529-533.
- [11] Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, et al. Selective inhibition of BET bromodomains [J]. Nature, 2010, 468(7327):1067-1073.
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [13] Wu SY, Chiang CM. The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation[J]. J Biol Chem, 2007, 282(18):13141-13145.
- [14] Mertz JA, Conery AR, Bryant BM, et al. Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(40):16669-16674.
- [15] Ott CJ, Kopp N, Bird L, et al. BET bromodomain inhibition targets both c-Myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia[J]. Blood, 2012, 120(14):2843-2852.
- [16] Lockwood WW, Zejnullahu K, Bradner JE, et al. Sensitivity of human lung adenocarcinoma cell lines to targeted inhibition of BET epigenetic signaling proteins [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(47):19408-19413.
- [17] Katayose Y, Mim K, Amol NS, et al. Promoting apoptosis, a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor P27[J]. Cancer Res, 1997, 57(24):5441-5445.
- [18] Zhao D, Gaixia Z, Dongmei Y, et al. Molecular mechanism of Skp2 in promoting cervical cancer HeLa cell proliferation[J]. J Med Coll PLA, 2008, 23:199-208.
- [19] Meng S, Lu XY. Induction of apoptosis by tanshinone II A in heLa cells [J]. Journal of Qiqihar University of Medicine, 2011, 32(2):709-712. [孟爽, 陆晓媛. 丹参酮 II A 对 HeLa 宫颈癌细胞凋亡的影响[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2011, 32(2):709-712.]

郑重申明

本刊作者谨防商务网站虚假征稿

《肿瘤学杂志》官网网址为: <http://www.chinaoncology.cn> 请作者直接点击进入网页, 注册并登录采编系统进行投稿。如有疑问请致电 0571-88122280, 88122282, 13758247950, 13757142507 查询。本刊邮箱为 zlxzz04@126.com 不再接受邮件投稿, 所有稿件均通过采编系统管理, 作者可通过采编系统查阅稿件审理进展。通过百度、谷歌等搜索后出现的注有《肿瘤学杂志》字样的代理征稿等相关信息, 本刊均未同其签订过委托、授权或合作协议, 敬请作者谨防上当!