

网络出版时间:2021/12/22 16:46 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20211221.1000.014.html

QCR2 调控 p53 泛素化对 SiHa 细胞株的周期阻滞作用

程海玲,王 宁,曹芹雪,霍会蚕,王 琛

摘要 目的 研究泛醇-细胞色素 C 还原酶亚基 2 (QCR2) 对宫颈癌 SiHa 细胞株周期阻滞的影响,并探讨相关机制。**方法** 取对数期 SiHa 细胞,脂质体转染法将 QCR2 siRNA、control siRNA 转染至 SiHa 细胞,设为 QCR2 siRNA 组、control siRNA 组,未经处理细胞设空白组。采用 qRT-PCR、Western blot 检测 QCR2、p53 mRNA 与蛋白相对表达量;碘化丙啶 (PI) 染色检测细胞周期。取 QCR2 siRNA 组细胞,以终浓度 50 nmol/L 泛素-蛋白酶体抑制剂 PS341 干预,设为 QCR2 siRNA + PS341 组,另取 QCR2 siRNA 组细胞以等量生理盐水 (NS) 干预,设为 QCR2 siRNA + NS 组。Western blot 检测 p53 蛋白相对表达量;免疫共沉淀实验检测 p53 泛素化水平。**结果** 荧光显微镜下观察,QCR2 siRNA 组、control siRNA 组转染效率均大于 80%;与空白组、control siRNA 组比较,QCR2 siRNA 组 QCR2 mRNA 与蛋白相对表达量均降低 ($P < 0.05$), G_0/G_1 占比升高 ($P < 0.05$), $S/G_2/M$ 占比降低 ($P < 0.05$);p53 mRNA 相对表达量组间比较,差异无统计学意义;与空白组、control siRNA 组比较,QCR2 siRNA 组 p53 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$);与空白组、QCR2 siRNA + PS341 组比较,QCR2 siRNA 组、QCR2 siRNA + NS 组 p53 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$);与空白组、control siRNA 组比较,QCR2 siRNA 组 p53 泛素化程度降低 ($P < 0.05$)。**结论** 沉默 QCR2 可将 SiHa 细胞阻滞在 G_0/G_1 期,其机制可能与抑制 p53 泛素化,提高其蛋白表达有关。

关键词 宫颈癌;泛醇-细胞色素 C 还原酶亚基 2;p53;泛素化;细胞周期阻滞

中图分类号 R 737.33

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)01-0065-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.013

宫颈癌是妇科恶性肿瘤致死的重要原因。每年约 1/3 的新发病例发生在我国,且发病率逐年升高^[1]。既往研究^[2-3]显示,肿瘤细胞中线粒体数量多于正常细胞,且线粒体复合物一、三抑制剂可抑制肿瘤生长,推测肿瘤细胞中线粒体功能活跃。该课

题组根据组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (trichostatin a, TSA) 对肿瘤细胞凋亡具有特异性诱导作用的原理,筛选出凋亡相关基因泛醇-细胞色素 C 还原酶亚基 2 (ubiquinol-cytochrome C reductase subunit 2, QCR2),且发现其异常高表达于宫颈癌组织,推测 QCR2 作为致癌基因参与宫颈癌发生、发展。该研究通过构建沉默 QCR2 的宫颈癌 SiHa 细胞株,研究其对该细胞的周期阻滞作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 细胞 宫颈癌 SiHa 细胞株购于上海江林生物科技有限公司。培养条件:含 10% 胎牛血清、1% 双抗 (青霉素、链霉素) 的 DMEM 培养基,标准条件 (37 °C, 5% CO₂) 培养箱。

1.2 药物、主要试剂和仪器 携带绿色荧光蛋白的 QCR2 siRNA (上游:5'-AUGACUGCCGCAUGUUACG CACAC-3', 下游:5'-UGCACAGCUGUGCAGCGUAC GUGC-3')、QCR2 siRNA2 (上游:5'-UGCAGCGUG CGUGCAGCGUGACG-3', 下游:5'-UGCACGUGCA CUAGUGGCGUGAC-3')、control siRNA 质粒 (深圳默赛尔生物医学科技发展有限公司);Lipofectamine™ 3000 脂质体法转染试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司);TRIzol 试剂盒、逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 检测试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Sigma 公司);QCR2、p53 一抗 (美国 Santa Cruz 公司);碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 染液 (北京中杉金桥生物技术有限公司);泛素-蛋白酶体抑制剂 PS341 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Pierce Crosslink IP kit 试剂盒 (上海北诺生物科技有限公司);DMI4000B 型荧光显微镜 (德国徕卡微系统有限公司);FACSCanto II 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与转染 收集对数期 SiHa 细胞,胰蛋白酶消化,接种于 24 孔板,细胞融合度达 75% 时,更换成双抗完全培养基。严格按照 Lipofectamine™ 3000 脂质体法转染说明书操作, Lipofectamine™ 3000 转染试剂 5 μl 加至 Opti-MEM 无血清培

2021-11-14 接收

基金项目:河南省 2018 年科技发展计划 (编号:182102311175)

作者单位:河南大学淮河医院妇产科,开封 475000

作者简介:程海玲,女,副主任医师,硕士;

王 宁,女,主治医师,责任作者, E-mail:jiayou_aiv@tom.com

培养基 100 μl 中(A液),待转质粒(QCR2 siRNA1、QCR2 siRNA2、control siRNA)各 5 μl 加至 Opti-MEM 无血清培养基 100 μl 中(B液),A液与B液混合,室温孵育 5 min。孵育期间,每个孔板更换为新鲜培养基 1.8 ml,孵育完成后每孔加入混合液,继续培养 48 h。显微镜下观察转染效率,筛选有效 siRNA。将转染有效 siRNA、control siRNA 质粒的细胞分别设为 QCR2 siRNA 组、control siRNA 组,未经处理的 SiHa 细胞设为空白组,每组设置 5 个复孔。荧光显微镜下观察,发出明亮的绿色荧光者为阳性细胞,转染效率(%) = 阳性细胞数/总细胞数 $\times$ 100%。

1.3.2 qRT-PCR、Western blot 检测 QCR2 mRNA 与蛋白相对表达量 取空白组、control siRNA 组、QCR2 siRNA 组细胞,加入 TRIzol 1 ml,经浓度、纯度检测后逆转录获取 cDNA,鉴定后对反应体系及反应条件进行设置,重复 40 次,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。以 GAPDH 为内参基因, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 mRNA 相对表达量。QCR2 上游引物序列:5'-TGCACGCATAGCAGGCACGTGCAC-3',下游引物序列:5'-GTACGTGTGACAGTCGTACAACGC-3';GAPDH 上游引物序列:5'-GTGACCGTGAATTCACCGCACGCT-3',下游引物序列:5'-TGACACGACGTGCACACAGTCGTG-3'。所有实验重复 3 次,取平均值。

取空白组、control siRNA 组、QCR2 siRNA 组细胞,PBS 洗涤,RIPA 细胞裂解液裂解,离心收集沉淀,BCA 试剂盒定量。取 40 μg 样品混合上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min,10 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,恒压下分离,湿法转膜,5% 脱脂奶粉常温封闭 2 h,加入 QCR2 一抗(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBTS 漂洗,加入山羊抗兔 IgG 二抗(1:8 000)常温孵育 2 h,TBTS 漂洗。暗室显影,Fluor Chem FC2 成像系统扫描、分析,以 QCR2/GAPDH 灰度值表示蛋白相对表达量。

1.3.3 PI 染色检测细胞周期 取空白组、control siRNA 组、QCR2 siRNA 组细胞,至融合度 80% 左右时胰蛋白酶消化,培养基终止消化,轻吹细胞,移至 15 ml 离心管,4 $^{\circ}\text{C}$,2 500 r/min 离心 5 min;预冷 PBS 冲洗,同条件离心 5 min;100 μl PBS 重悬,加入 1 ml 70% 预冷乙醇,混合均匀;4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 12 h,2 500 r/min,半径 12 cm 离心 5 min,预冷 PBS 冲洗细胞;加入 PI 染液(RNaseA 10 μl ,染色缓冲液 0.5 ml,PI 染液 25 μl),遮光冰浴 30 min;300 细胞滤网过滤,经流式细胞仪检测。

1.3.4 qRT-PCR、Western blot 检测 p53 mRNA 与蛋白

相对表达量 取 QCR2 siRNA 组细胞,用生理盐水(normal saline,NS)溶液溶解泛素-蛋白酶体抑制剂 PS341,以终浓度 50 nmol/L 干预 QCR2 siRNA 组细胞 4 h,设为 QCR2 siRNA + PS341 组,另取 QCR2 siRNA 组细胞以等量 NS 干预 4 h,设为 QCR2 siRNA + NS 组。

qRT-PCR 分别检测空白组、control siRNA 组、QCR2 siRNA 组 p53 mRNA 相对表达量。操作同 1.3.2, p53 上游引物序列:5'-TGCGCGCAACTGCACGCGTGCACGC-3',下游引物序列:5'-CGTACGCTGCACGCTAGCTGCACGC-3';GAPDH 上游引物序列:5'-GTCGAAAACCACACTGCACCGCGTC-3',下游引物序列:5'-GTCAACGGGTTTGCACGCTGCAACT-3'。所有实验重复 3 次,取平均值。

Western blot 检测空白组、control siRNA 组、QCR2 siRNA 组,空白组、QCR2 siRNA 组、QCR2 siRNA + NS 组、QCR2 siRNA + PS341 组 p53 蛋白相对表达量。操作同 1.3.2,封闭液封闭后加入 p53 一抗(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBTS 漂洗,加入山羊抗兔 IgG 二抗(1:8 000)常温孵育 2 h,TBTS 漂洗。暗室显影,Fluor Chem FC2 成像系统扫描、分析,以 p53 灰度值/内参 GAPDH 灰度值表示其蛋白相对表达量。

1.3.5 免疫共沉淀实验检测 p53 泛素化水平 取空白组、control siRNA 组、QCR2 siRNA 组细胞,按照 Pierce Crosslink IP kit 试剂盒说明书要求操作。于 NP-40 裂解缓冲液中裂解,10 000 r/min 离心 15 min 转移上清液至新离心管。Protein A/G 琼脂糖珠经 PBS 洗涤 2 次后制成 50% Protein A/G 琼脂糖珠工作液。振荡器 4 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 10 min 以避免非特异性结合蛋白对实验结果的影响。10 000 r/min 离心 15 min 转移上清液至新离心管,弃去 Protein A/G 琼脂糖珠,加入 QCR2、p53 一抗至总体积 500 μl 。振荡器 4 $^{\circ}\text{C}$ 缓慢振荡过夜,离心收集免疫沉淀产物,PBS 洗涤。加入上样缓冲液 15 μl ,沸水浴 5 min 行 Western blot 检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示计量资料,以单因素方差分析行多样本资料比较,当 Levene 检验方差齐时,以单因素方差分析比较均值,再以 LSD- t 行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效率观察 转染 48 h,荧光显微镜下观

察,QCR2 siRNA1 的转染效率大于 QCR2 siRNA2, 将其作为有效 siRNA 进行后续实验。见图 1。

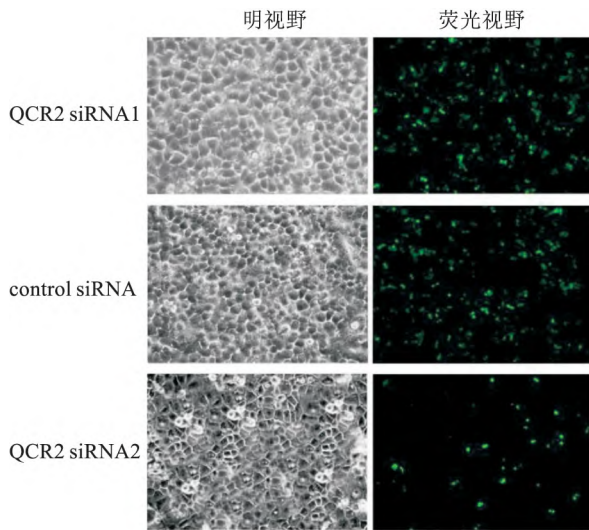


图1 荧光显微镜下观察转染效率 ×200

2.2 QCR2 mRNA 与蛋白相对表达量比较 与空白组、control siRNA 组比较,QCR2 siRNA 组 mRNA 与蛋白相对表达量均降低($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 各组细胞周期分布对比 与空白组、control siRNA 组比较,QCR2 siRNA 组 G_0/G_1 占比升高($P < 0.01$), $S/G_2/M$ 占比降低($P < 0.01$)。见图 3。

2.4 各组 p53 mRNA 与蛋白相对表达量比较

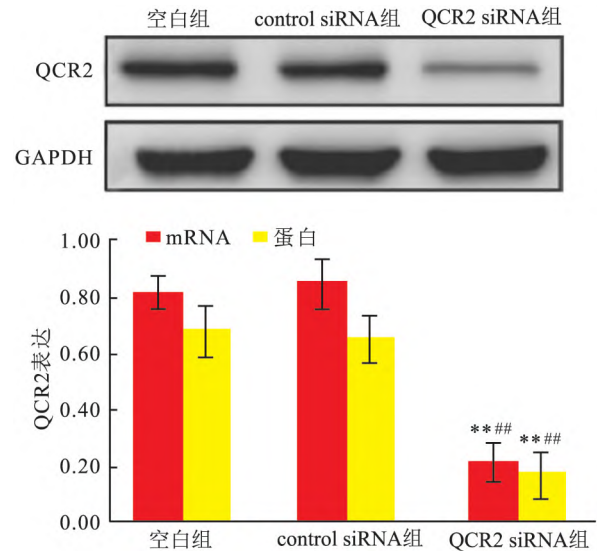


图2 qRT-PCR、Western blot 检测 QCR2 表达
与空白组比较: * $P < 0.01$; 与 control siRNA 组比较: ## $P < 0.01$

p53 mRNA 相对表达量组间比较,差异无统计学意义;与空白组、control siRNA 组比较,QCR2 siRNA 组 p53 蛋白相对表达量升高($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 各组 p53 蛋白相对表达量比较 空白组、QCR2 siRNA 组、QCR2 siRNA + NS 组、QCR2 siRNA + PS341 组 p53 蛋白相对表达量分别为 (0.21 ± 0.03) 、 (0.82 ± 0.09) 、 (0.80 ± 0.10) 、 (0.24 ± 0.04) , 与空白组、QCR2 siRNA + PS341 组比较,

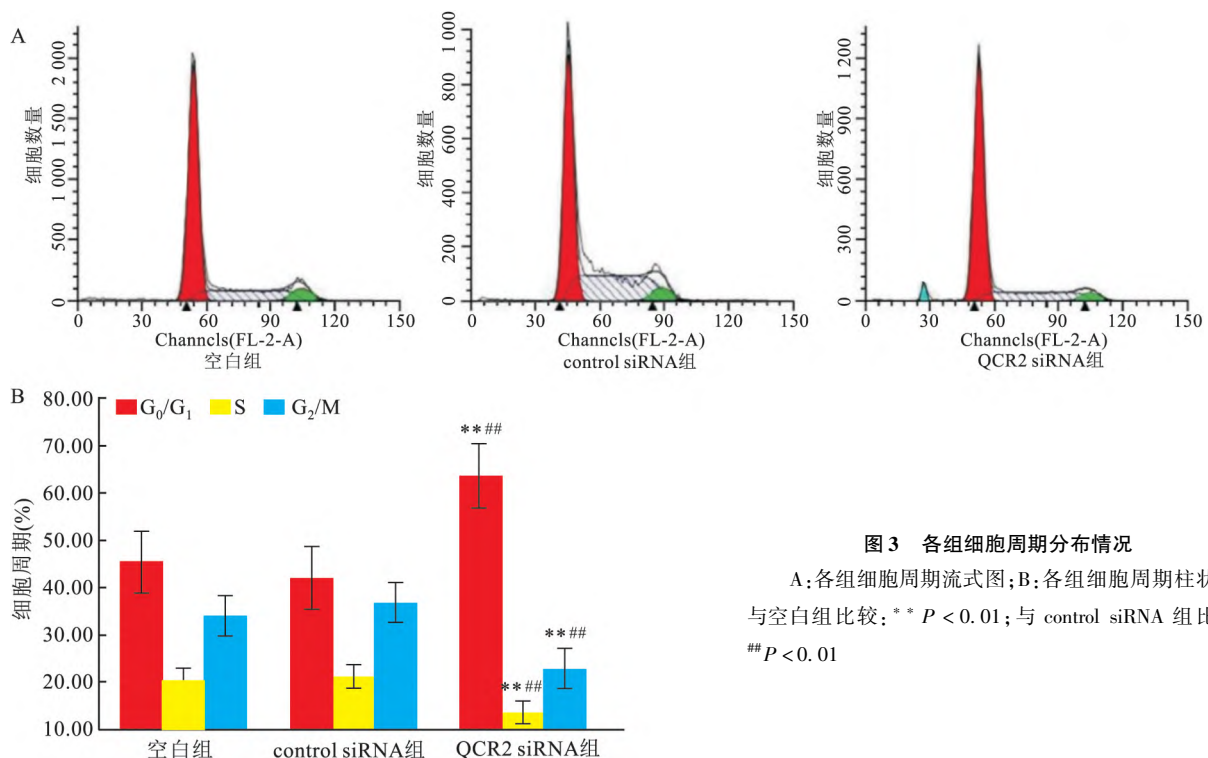


图3 各组细胞周期分布情况

A: 各组细胞周期流式图; B: 各组细胞周期柱状图;
与空白组比较: * $P < 0.01$; 与 control siRNA 组比较: ## $P < 0.01$

QCR2 siRNA 组、QCR2 siRNA + NS 组 p53 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$)。见图 5。

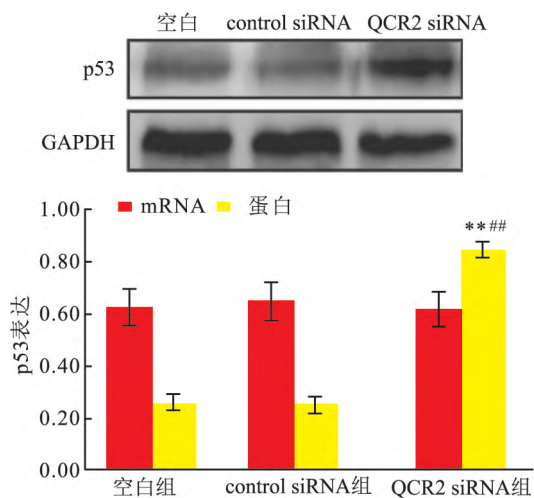


图 4 qRT-PCR、Western blot 检测 QCR2 表达
与空白组比较: * $P < 0.01$; 与 control siRNA 组比较: ** $P < 0.01$

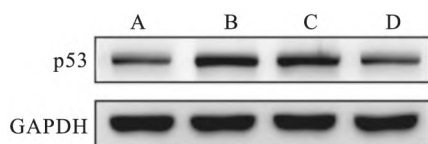


图 5 Western blot 检测 p53 蛋白表达

A: 空白组; B: QCR2 siRNA 组; C: QCR2 siRNA + NS 组; D: QCR2 siRNA + PS341 组

2.6 各组 p53 泛素化程度比较 空白组、control siRNA 组、QCR2 siRNA 组 p53 泛素化程度分别为 $(70.58 \pm 8.54)\%$ 、 $(71.03 \pm 8.62)\%$ 、 $(20.27 \pm 4.15)\%$, 与空白组、control siRNA 组比较, QCR2 siRNA 组 p53 泛素化程度降低 ($t = 11.848$, $P < 0.001$; $t = 11.864$, $P < 0.001$)。见图 6。

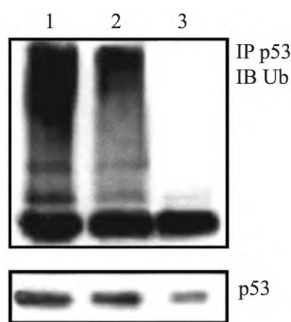


图 6 免疫共沉淀实验检测 p53 泛素化水平
1: 空白组; 2: control siRNA 组; 3: QCR2 siRNA 组

3 讨论

宫颈癌是妇科高发生殖系统恶性肿瘤之一,目

前临床关于其发病机制尚未完全明确,多认为与细胞周期调控异常、ATM 信号通路被激活、3q 区域扩增、内切酶活性增强等有关^[4-5]。由于该病早期无明显及特异性症状,多数患者早期难以确诊,仅能采取放化疗为主的姑息治疗方式,但治疗靶向性不足,且具有较强的神经、肝肾毒性,预后不良^[6]。随着对宫颈癌分子机制研究的逐步深入,基因靶向干预为该病治疗提供了新的方向。

研究^[7-8]证实,细胞周期调控基因突变是肿瘤发生的重要机制之一。该研究结果中,与空白组、control siRNA 组比较,QCR2 siRNA 组 QCR2 mRNA 与蛋白表达降低,细胞周期 G_0/G_1 占比升高,提示沉默 QCR2 可将宫颈癌细胞阻滞在 G_0/G_1 期,从而抑制肿瘤。Abbaszadeh et al^[9] 研究认为,肿瘤细胞中无氧糖酵解途径增强的主要原因是线粒体氧化磷酸化水平提高,且伴随相关蛋白表达的增加。QCR2 是线粒体氧化磷酸化复合体三的重要组成蛋白,本课题组以其与肿瘤细胞凋亡具有相关性为线索,进一步检测其在多种肿瘤组织中的表达情况,发现其普遍高表达于乳腺癌、宫颈癌、肺癌、食管癌等疾病中,且与部分临床特征具有相关性,揭示其致癌作用,为进一步研究其参与肿瘤发生发展的机制奠定基础。

p53 是目前公认的作用最广泛、最重要的抑癌基因,恢复其表达及功能活性是治疗肿瘤的重要思路^[10-11]。调控 p53 蛋白可从转录、翻译、蛋白修饰等层面进行,其中泛素化降解过程是最重要的调控方式。泛素化是一种对靶蛋白进行特异性修饰的过程,可调控细胞增殖、细胞周期、凋亡等多种进程,泛素-蛋白酶体系统在肿瘤进程中发挥重要作用^[12]。该研究结果显示,与空白组、control siRNA 组比较,QCR2 siRNA 组 p53 mRNA 表达未发生明显变化,蛋白表达升高,推测 QCR2 对 p53 具有调控作用,且该调控并非在转录水平,而是发生在蛋白水平,可能经 p53 泛素-蛋白酶体降解途径对其蛋白表达进行调控。为验证该推测,该研究在沉默宫颈癌细胞 QCR2 的同时加入泛素-蛋白酶体抑制剂 PS341,结果显示 p53 蛋白表达未发生变化,提示 QCR2 对 p53 蛋白表达的调控可能依赖于蛋白酶体。由于蛋白酶体是泛素化蛋白发生降解的主要场所,该研究进一步检测了沉默 QCR2 对 p53 泛素化水平的影响,显示其泛素化水平降低。综合以上结果,推测沉默 QCR2 可将宫颈癌细胞阻滞在 G_0/G_1 期,其作用机制与抑制 p53 泛素化,提高其蛋白表达有关。Han

et al^[13] 研究显示, QCR2 在多种人类肿瘤中表达上调, 抑制其表达可通过激活 p53 信号传导并诱导 p21 依赖性细胞周期阻滞和衰老来抑制癌细胞生长, 该研究结果与其具有相似性。

参考文献

- [1] 张韶凯, 赵方辉, 乔友林. 中国宫颈癌防治研究 20 年历程与成就[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(6):809-12.
- [2] Kafkova A, Trnka J. Mitochondria-targeted compounds in the treatment of cancer[J]. Neoplasma, 2020, 67(3):450-60.
- [3] Buoncervello M, Maccari S, Ascione B, et al. Inflammatory cytokines associated with cancer growth induce mitochondria and cytoskeleton alterations in cardiomyocytes[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(11):20453-68.
- [4] Belglaiia E, Mougin C. Cervical cancer: current situation and management in Morocco[J]. Bull Cancer, 2019, 106(11):1008-22.
- [5] 陈艳, 牛三强, 胡卫平, 等. 宫颈癌 ING4 基因启动子区甲基化状态及其临床意义[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(10):142-6.
- [6] Wang R, Pan W, Jin L, et al. Human papillomavirus vaccine against cervical cancer: opportunity and challenge[J]. Cancer Lett, 2020, 471:88-102.
- [7] Bonelli M, La Monica S, Fumarola C, et al. Multiple effects of CDK4/6 inhibition in cancer: from cell cycle arrest to immunomodulation[J]. Biochem Pharmacol, 2019, 170:113676.
- [8] Lee J H, Berger J M. Cell cycle-dependent control and roles of DNA topoisomerase II[J]. Genes (Basel), 2019, 10(11):859.
- [9] Abbaszadeh Z, Çeşmeli S, Biray Avcı. Crucial players in glycolysis: cancer progress[J]. Gene, 2020, 726:144158.
- [10] Stein Y, Rotter V, Aloni-Grinstein R. Gain-of-function mutant p53: all the roads lead to tumorigenesis[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24):6197.
- [11] 董娟娟, 彭万仁, 颜兵雪, 等. H3K27me3 聚集 MEG3 lncRNA 启动子通过 MDM2/p53 途径诱导多发性骨髓瘤 RPMI8226 细胞凋亡逃逸[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(7):994-9.
- [12] Narayanan S, Cai C Y, Assaraf Y G, et al. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway to overcome anti-cancer drug resistance[J]. Drug Resist Updat, 2020, 48:100663.
- [13] Han Y, Wu P, Wang Z, et al. Ubiquinol-cytochrome C reductase core protein II promotes tumorigenesis by facilitating p53 degradation[J]. EBioMedicine, 2019, 40:92-105.

QCR2 regulates the cycle arrest effect of p53 ubiquitination on SiHa cell line

Cheng Hailing, Wang Ning, Cao Qinxue, Huo Huican, Wang Chen

(Dept of Obstetrics and Gynecology, Huaihe Hospital of Henan University, Kaifeng 475000)

Abstract Objective To study the effect of ubiquinol-cytochrome C reductase subunit 2 (QCR2) on cell cycle arrest of cervical cancer SiHa cell line, and to explore related mechanisms. **Methods** The log-phase SiHa cells were taken, and QCR2 siRNA and control siRNA were transfected into SiHa cells by liposome transfection, which were set as QCR2 siRNA group and control siRNA group, and untreated cells were set as a blank group. qRT-PCR and Western blot were used to determine the relative expression of QCR2, p53 mRNA and protein. Propidium iodide (PI) staining was used to determine cell cycle. The cells in the QCR2 siRNA group were taken, and were intervened with a final concentration of 50 nmol/L ubiquitin-proteasome inhibitor PS341 as the QCR2 siRNA + PS341 group. In addition, the cells in the QCR2 siRNA group were intervened with the same amount of normal saline (NS) and set as the QCR2 siRNA + NS group. Western blot was used to determine the relative expression of p53 protein. The immunoprecipitation test was used to determine the level of p53 ubiquitination. **Results** Observed under a fluorescence microscope, the transfection efficiency of QCR2 siRNA group and control siRNA group were both >80%. Compared with the blank group and control siRNA group, the relative expression of QCR2 mRNA and protein in the QCR2 siRNA group decreased ($P < 0.05$), the proportion of G_0/G_1 increased ($P < 0.05$), and the proportion of S, G_2/M decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference in the relative expression of p53 mRNA between the groups. Compared with the blank group and control siRNA group, the relative expression of p53 protein in the QCR2 siRNA group increased ($P < 0.05$). Compared with the blank group and QCR2 siRNA + PS341 group, the relative expression of p53 protein in the QCR2 siRNA group and QCR2 siRNA + NS group increased ($P < 0.05$). Compared with the blank group and control siRNA group, the degree of p53 ubiquitination in the QCR2 siRNA group was reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** Silencing QCR2 can block SiHa cells in G_0/G_1 phase. Its mechanism may be related to the inhibition of p53 ubiquitination and the increase of its protein expression. **Key words** cervical cancer; ubiquinol-cytochrome C reductase subunit 2; p53; ubiquitination; cell cycle arrest