

BET 蛋白抑制剂 JQ1 增强 索拉非尼对肝癌细胞的增殖抑制研究

王宇 范璐璐

摘要 目的 探讨 BET 家族小分子抑制剂 JQ1 联合索拉非尼对肝癌细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制。方法 采用 MTT 法检测索拉非尼、JQ1 以及 JQ1 联合索拉非尼作用于人肝癌细胞 HepG2 和 Bel-7402 的增殖抑制率,采用流式细胞术检测细胞凋亡率的变化,Western blot 方法检测 c-MYC、Bcl-2、BIM 蛋白表达水平的变化。结果 与索拉非尼、JQ1 单独用药比较,JQ1 联合索拉非尼作用于肝癌细胞的增殖抑制率增加,凋亡率也增加,JQ1 联合索拉非尼作用于肝癌细胞后可以下调 c-MYC、Bcl-2 蛋白表达水平并且上调 BIM 蛋白表达水平。结论 一定浓度 JQ1 能增强索拉非尼对肝癌细胞的增殖抑制及凋亡作用,其作用机制可能与降低 c-MYC、Bcl-2 表达,上调 BIM 表达相关。

关键词 BET 家族; BRD4; JQ1; 索拉非尼; 肝细胞癌

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)08-1185-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.08.007

肝癌是临床上常见的恶性肿瘤,据最新统计^[1],全世界新发肝癌患者每年约 70 万,居恶性肿瘤的第 5 位,肝癌因此被称为“肿瘤之王”。索拉非尼是治疗晚期肝癌的重要一线靶向药物,但其治疗效果尚不满意^[2],因此努力寻找有效的药物和最优化的治疗方法是当前的研究重点。溴结构域蛋白 4 (bromodomain-containing protein 4, BRD4) 属于溴化结构和 BET 家族蛋白, BRD4 通过结合组蛋白诱导细胞的靶基因活化或抑制,还可以结合乙酰化的非组蛋白,来调控 DNA 复制、细胞周期及基因转录等其他细胞活动。因此, BRD4 在肿瘤发生、发展中起着重要作用^[3]。JQ1 是一种小分子化合物,是 BET 家族蛋白抑制剂,可以竞争性结合于 BRD4 溴化结构,阻止 BRD4 与乙酰化的赖氨酸结合^[4]。该研究通过观察 JQ1 联合索拉非尼对肝癌细胞株的增殖抑制作用,并探讨其可能的机制,为肝癌的临床治疗提

供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人肝癌细胞株 HepG2、Bel-7402 购自中国科学院上海细胞库;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;DMEM 高糖培养基购自美国 Hyclone 公司;索拉非尼购自美国 Selleck 公司;JQ1 购自美国 MedChemExpress 公司;兔来源抗人 Bcl-2 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;兔来源抗人 c-MYC 单克隆抗体购自沈阳万类生物科技有限公司;兔来源抗人 BIM 单克隆抗体购自美国 CST 公司;鼠来源抗人 Actin 抗体和所有二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;化学发光显影试剂盒购自美国 ThermoFisher 公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司;胰蛋白酶和 DMSO 均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 细胞培养 所有细胞在含有 10% 胎牛血清, 1% 青霉素和 1% 链霉素的 DMEM 高糖培养基中培养,在含有 5% CO₂ 的培养箱中于 37 °C 培养,1~2 d 换液一次,在细胞对数生长期时进行传代。

1.3 细胞增殖实验 MTT 方法检测细胞增殖抑制率。首先将 HepG2 和 Bel-7402 以 5 000 个细胞/孔接种于 96 孔培养板中培养。用 JQ1 (1 μmol/L)、索拉非尼 (10 μmol/L)、JQ1 联合索拉非尼分别处理细胞,同时设置空白对照组和阴性对照组,每组设置 5 个复孔,24、48 h 之后向每个孔中加入 10 μl MTT 试剂,在 37 °C 下孵育 4 h。然后,去除细胞培养上清液,并向每个孔中加入 150 μl DMSO。在 37 °C 条件下孵育 15 min。最后,通过酶标仪在 490 nm 处确定每个孔的吸光度值。根据测量的吸光度值计算每个孔的增殖抑制率。

1.4 细胞凋亡实验 Annexin V-FITC/PI 双染检测细胞凋亡。取对数生长期细胞消化计数后按 2 × 10⁵ 个/孔接种于 6 孔细胞培养板中。贴壁后加入 DMSO、JQ1 (5 μmol/L)、索拉非尼 (10 μmol/L)、JQ1 联合索拉非尼分别处理细胞,24、48 h 后用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞,获取上清后使用预冷的

2020-01-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81402040)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科,合肥 230022

作者简介: 王宇,女,硕士研究生;

范璐璐,女,博士,硕士生导师,责任作者, E-mail: fanlu-lu8332@sina.com

PBS 洗涤后离心,将离心后的细胞重悬于结合缓冲液中,加入 5 μl Annexin V-FITC 室温避光孵育 15 min,之后加入 5 μl PI 混匀。室温避光孵育 5 min。使用 FACS 流式细胞仪测定凋亡细胞。早期和晚期凋亡细胞均包括在细胞死亡测定中。

1.5 蛋白提取与 Western blot 实验 取对数生长期细胞消化计数后按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔细胞培养板中。贴壁后加入 JQ1 (5 μmol/L)、索拉非尼 (10 μmol/L)、JQ1 联合索拉非尼分别处理细胞,同时设置对照组,24 h 后加入含有蛋白酶抑制剂的裂解液置于冰上裂解 30 min,将裂解物在低温 (4 ℃) 和高速 (15 000 r/min) 下离心 15 min。通过 BCA 试剂盒检测上清液的蛋白质含量。在纯化的蛋白质样品中加入蛋白上样缓冲液,并在 95 ℃ 条件下加热 10 min。通过 SDS-PAGE 分离蛋白质样品,并在恒定电流下转移到 PVDF 膜上。使用 5 % 脱脂牛奶封闭含有蛋白质的膜,在 4 ℃ 下与特异性一抗孵育过夜,然后加入相应的二抗 (1 : 50 000) 在 37 ℃ 孵育 2 h。使用化学发光显影液使蛋白质条带可视化,上机扫描捕获信号并保存。

1.6 统计学处理 每项实验均重复 3 次,使用 Graphpad Prism 6.0 软件进行统计分析和绘图,实验数据主要以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用析因设计方差分析处理数据,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 JQ1 联合索拉非尼对 HepG2 和 Bel-7402 肝癌细胞的增殖抑制作用 使用 MTT 测定法分别检测对照组、JQ1 (1 μmol/L)、索拉非尼 (10 μmol/L)、JQ1 联合索拉非尼作用于 HepG2 和 Bel-7402 肝癌细胞 24 h 或 48 h 后,肝癌细胞的增殖抑制率 (图 1)。结果显示,在 HepG2 肝癌细胞中,24 h 各组的增殖抑制率分别是 (14.31 ± 0.79) %、(23.94 ± 1.23) %、(32.36 ± 1.72) % 和 (61.78 ± 1.48) %; 48 h 各组的增殖抑制率分别是 (8.47 ± 1.73) %、(46.32 ± 6.45) %、(54.40 ± 1.30) % 和 (65.86 ± 2.76) %。在 Bel-7402 肝癌细胞中,24 h 各组的增殖抑制率分别是 (7.43 ± 1.65) %、(34.82 ± 3.23) %、(44.87 ± 7.34) % 和 (58.50 ± 0.40) %; 48 h 各组的增殖抑制率分别是 (8.77 ± 1.90) %、(33.87 ± 0.36) %、(42.61 ± 9.50) % 和 (56.75 ± 0.55) %。单独应用索拉非尼或 JQ1 以及 JQ1 联合索拉非尼组均可在体外抑制肝癌细胞的增殖,与单药组比较,联合用药组的增殖抑制率提高,差异有统

计学意义 ($F_{HepG2, 24 h} = 243.177$, $F_{HepG2, 48 h} = 30.012$, $F_{Bel-7402, 24 h} = 7.62$, $F_{Bel-7402, 48 h} = 12.437$, 均 $P < 0.05$)。

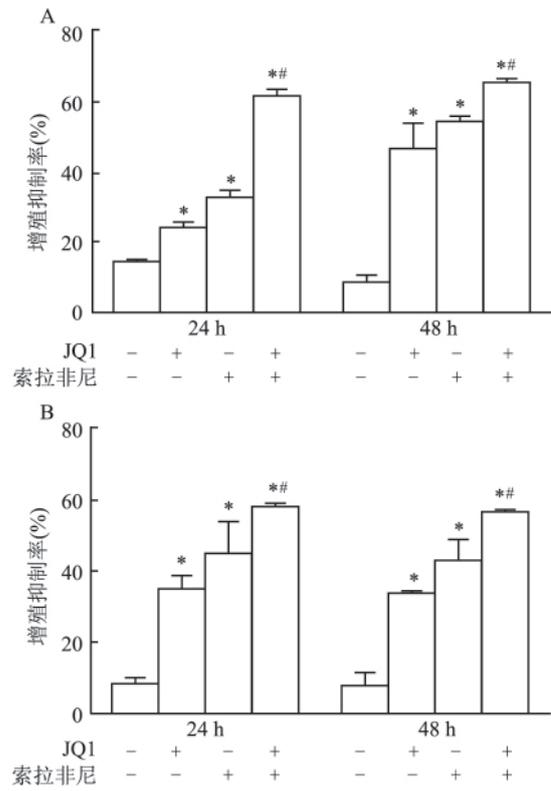


图 1 JQ1 联合索拉非尼对肝癌细胞增殖率的影响
A: HepG2; B: Bel-7402; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 JQ1 组或索拉非尼组比较: # $P < 0.05$

2.2 JQ1 联合索拉非尼对 HepG2 和 Bel-7402 肝癌细胞的凋亡作用 使用 Annexin V-FITC / PI 流式细胞术测定对照组、JQ1 (5 μmol/L)、索拉非尼 (10 μmol/L)、JQ1 联合索拉非尼作用于 HepG2 和 Bel-7402 肝癌细胞 24 h 或 48 h 后的细胞凋亡率 (图 2)。结果显示,在 HepG2 肝癌细胞中,24 h 各组凋亡率分别是 (6.53 ± 1.60) %、(9.03 ± 1.44) %、(18.97 ± 2.74) % 和 (34.00 ± 4.14) %; 48 h 各组凋亡率分别是 (4.57 ± 0.85) %、(12.20 ± 1.78) %、(27.96 ± 7.59) % 和 (59.73 ± 2.12) %。在 Bel-7402 肝癌细胞中,24 h 各组凋亡率分别是 (7.23 ± 1.53) %、(10.83 ± 1.70) %、(16.20 ± 1.75) % 和 (26.30 ± 1.43) %; 48 h 各组凋亡率分别是 (7.87 ± 0.63) %、(9.57 ± 0.39) %、(16.60 ± 4.65) % 和 (48.83 ± 3.77) %。结果显示 JQ1 联合索拉非尼处理后, HepG2 和 Bel-7402 肝癌细胞凋亡增加,差异有统计学意义 ($F_{HepG2, 24 h} = 11.016$, $F_{HepG2, 48 h} = 18.125$, $F_{Bel-7402, 24 h} = 8.174$, $F_{Bel-7402, 48 h} =$

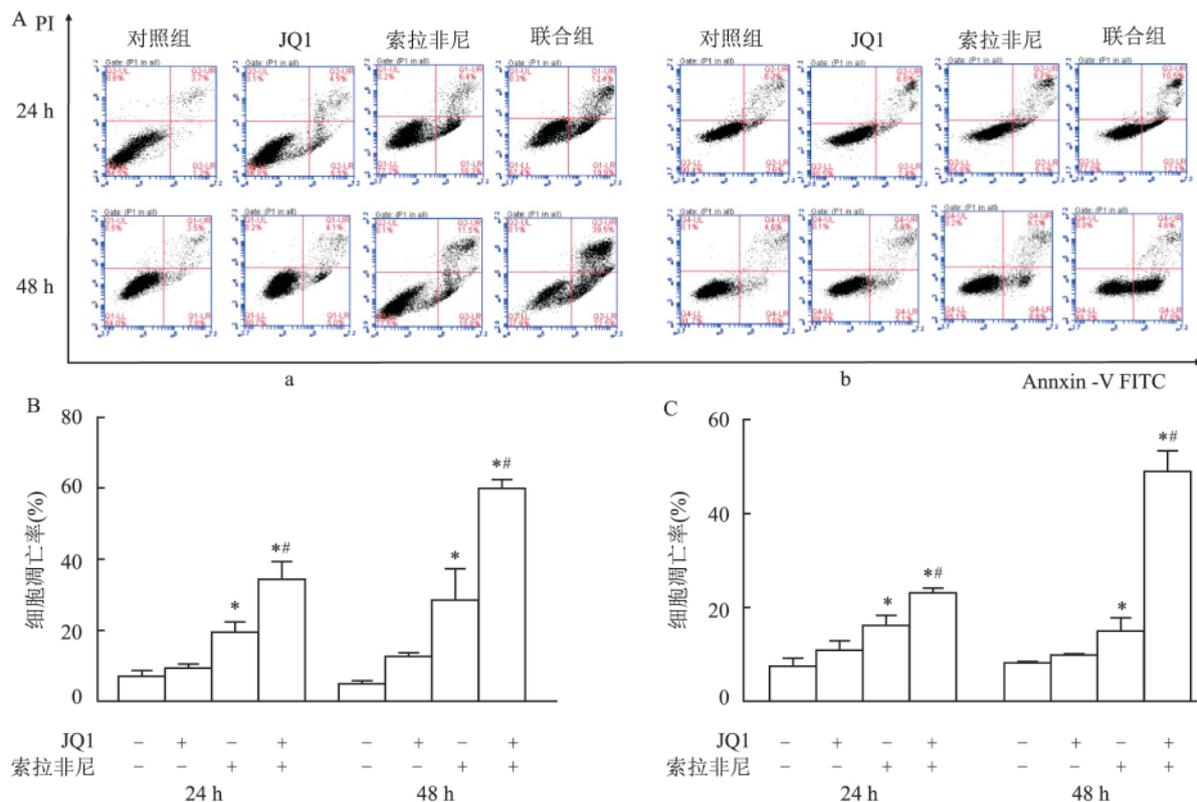


图2 JQ1 联合索拉非尼对肝癌细胞凋亡的影响

A: JQ1 联合索拉非尼作用于肝癌细胞流式凋亡图 (a: HepG2; b: Bel-7402); B: JQ1 联合索拉非尼对 HepG2 凋亡的影响; C: JQ1 联合索拉非尼对 Bel-7402 凋亡的影响; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 JQ1 组或索拉非尼组比较: # $P < 0.05$

51.243 均 $P < 0.05$)。

2.3 JQ1 联合索拉非尼对 c-MYC、Bcl-2、BIM 表达的影响 通过 Western blot 检测 JQ1 联合索拉非尼对 HepG2 和 Bel-7402 细胞中 c-MYC 和凋亡蛋白 Bcl-2、BIM 的表达的影响,在索拉非尼和 JQ1 单独用药组,Bcl-2 和 c-MYC 表达降低,BIM 表达增加,以联合用药组最为明显(图 3)。

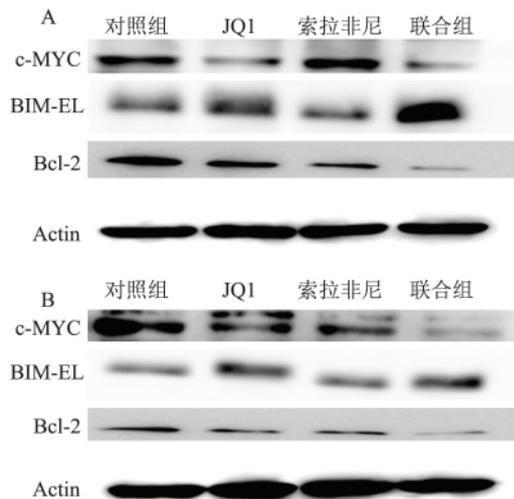


图3 JQ1 联合索拉非尼对 c-MYC、Bcl-2、BIM 表达的影响
A: HepG2; B: Bel-7402

3 讨论

索拉非尼是一种口服多激酶抑制剂,是治疗晚期肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)的重要靶向药物。但其疗效尚不满意^[5],因此,发现新的干预手段以期提高肝癌细胞对靶向药物的敏感性,是一种治疗肿瘤的新策略。

BRD4 是一种表观遗传调节因子,其结构包含两个溴化结构域,可识别组蛋白氨基端(N 端)的乙酰化赖氨酸残基,从而调控 DNA 复制、DNA 修复、染色质重塑和转录调控^[6]。已有研究^[7]表明 BRD4 表达水平失调或功能紊乱与多种肿瘤的发生有关,如肝癌、黑色素瘤、结直肠癌等。JQ1 是 BRD4 溴化结构的小分子抑制剂,是一种硫二氮杂革类似物,可竞争性结合于 BRD4 溴化结构域,使 BRD4 蛋白从乙酰化的赖氨酸结合位点分离,抑制染色质活化,从而抑制相应基因转录,可抑制多发性骨髓瘤、急性髓性白血病、乳腺癌等多种肿瘤生长^[8]。在本实验中 JQ1 和索拉非尼以及联合用药对肝癌细胞株均有增殖抑制及诱导凋亡作用,并且联合用药组对肝癌细胞株的增殖抑制及诱导凋亡作用高于 JQ1 或索拉非尼单药组。

研究^[9]表明在 Bcl-2 家族的多种成员中 ,Bcl-2 是最主要的凋亡抑制基因 ,BIM 是 Bcl-2 家族蛋白中最重要的成员 ,在 Bcl-2 家族蛋白的 4 个结构域 (BH1 ~ BH4) 中 ,BIM 与 BH3 具有相同的结构域 ,在本质上具有高度促凋亡作用。BIM 在生理和病理生理条件下都启动了内在的凋亡通路。BIM 表达的减少与肿瘤的促进和自身免疫有关 ,而过表达则抑制肿瘤生长和耐药性 因为癌细胞会抑制 BIM 的表达和稳定性^[10]。c-MYC 基因通过易位、扩增和突变参与许多肿瘤癌变过程 ,如神经母细胞瘤、乳腺癌、胰腺癌、结肠癌、前列腺癌等^[11]。本研究 Western blot 结果显示 ,各给药组均可促进了 BIM 的表达 ,抑制 Bcl-2 的表达 致使 HCC 细胞的凋亡。以联合用药组最为显著 ,JQ1 和索拉非尼联合应用可能存在协同作用。

综上所述 ,一定浓度 JQ1 能增强索拉非尼对肝癌细胞的增殖抑制及凋亡作用 ,其机制可能在于通过下调 Bcl-2 和 c-MYC 的表达 ,上调 BIM 表达 ,JQ1 和索拉非尼联合应用可能存在协同作用 ,为肝癌的治疗提供新思路。但是本研究只是在细胞水平的初步探讨 ,还需要大量的动物和临床试验进一步证明。

参考文献

[1] Pan C , Xiang L , Pan Z , et al. MiR-544 promotes immune escape through downregulation of NCR1 /NKp46 via targeting RUNX3 in liver cancer[J]. *Cancer Cell Int* ,2018 , 18: 52.

- [2] Méndez-Blanco C ,Fondevila F ,García-Palomo A ,et al. Sorafenib resistance in hepatocarcinoma: role of hypoxia-inducible factors [J]. *Exp Mol Med* 2018 ,50(10) : 134.
- [3] Huang W ,Zheng X ,Yang Y ,et al. An overview on small molecule inhibitors of BRD4 [J]. *Minirev Med Chem* 2016 ,16(17) : 1403 - 14.
- [4] Duan Y ,Guan Y ,Qin W ,et al. Targeting BRD4 for cancer therapy: inhibitors and degraders [J]. *Med Chem Comm* 2018 ,9(11) : 1779 - 802.
- [5] Zhu Y J ,Zheng B ,Wang H Y. New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer [J]. *Acta Pharmacol Sin* , 2017 ,38(5) : 614 - 22.
- [6] Donati B ,Lorenzini E. BRD4 and cancer: going beyond transcriptional regulation [J]. *Mol Cancer* 2018 ,17(1) : 164.
- [7] Ba M ,Long H ,Yan Z ,et al. BRD4 promotes gastric cancer progression through the transcriptional and epigenetic regulation of c-MYC [J]. *J Cell Biochem* 2018 ,119(1) : 973 - 82.
- [8] Shi X ,Liu C ,Liu B ,et al. JQ1: a novel potential therapeutic target [J]. *Pharmazie* 2018 ,73(9) : 491 - 3.
- [9] Hong-Duck U . Bcl-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species [J]. *Oncotarget* ,2016 ,7(5) : 5193 - 203.
- [10] Shukla S ,Saxena S ,Singh B K ,et al. BH3-only protein BIM: An emerging target in chemotherapy [J]. *Eur J Cell Bio* ,2017 , 96(8) : 728 - 38.
- [11] LanchO O. The MYC enhancer-ome: long-range transcriptional regulation of MYC in cancer [J]. *Trends Cancer* 2018 ,4(12) : 810 - 22.

BET protein inhibitor JQ1 enhances the proliferation inhibition of sorafenib on liver cancer cells

Wang Yu ,Fan Lulu

(Dept of Oncology ,The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of BET family small molecule inhibitor JQ1 combined with sorafenib on the proliferation and apoptosis of liver cancer cells and its mechanism. **Methods** The proliferation inhibition rate of sorafenib ,JQ1 and JQ1 combined with sorafenib on HepG2 and Bel-7402 human liver cancer cells was detected by MTT assay ,the change of apoptosis rate was detected by flow cytometry ,the expression of c-MYC ,Bcl-2 and BIM proteins was detected by Western blot. **Results** Compared with sorafenib and JQ1 alone ,the proliferation inhibition rate and apoptosis rate of liver cancer cells increased when treated with JQ1 combined with sorafenib ,the expression of c-MYC and Bcl-2 protein was down-regulated and the expression of BIM protein was up-regulated after treated with JQ1 combined with sorafenib on liver cancer cells. **Conclusion** A certain concentration of JQ1 can enhance the proliferation inhibition and apoptosis effects of sorafenib on liver cancer cells ,and its mechanism may be related to the down-regulated expression of c-MYC and Bcl-2 ,and the up-regulated expression of BIM.

Key words BET family; BRD4; JQ1; sorafenib; hepatocellular carcinoma