

BRD4 抑制剂 JQ1 抑制非小细胞肺癌生长的研究

倪萍¹, 吴丹丹¹, 翟溯澜¹, 李萍¹, 邹美娟¹, 李敏¹, 程志祥^{2*}, 王雪融^{1*}

(¹南京医科大学药理学系, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学第二附属医院疼痛科和生物治疗中心, 江苏 南京 210011)

[摘要] 目的:探讨 BRD4 抑制剂 JQ1 对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)细胞株及厄洛替尼耐药细胞株生长的影响并探讨其作用机制。方法:用不同浓度 JQ1 处理不同类型 NSCLC 细胞株, 72 h 后用磺酰罗丹明 B(SRB)法检测 JQ1 对细胞增殖的抑制作用, 分别用实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和 Western blot 法检测癌基因 eIF4E 的 mRNA 及蛋白表达水平。结果:JQ1 呈浓度依赖性抑制 NSCLC 细胞株的生长, 包括厄洛替尼敏感和耐药细胞株, 下调 eIF4E 的 mRNA 及蛋白水平表达。结论:JQ1 可抑制不同 NSCLC 细胞株的生长, 其作用机制可能与降低 eIF4E 表达有关。

[关键词] JQ1; BRD4 抑制剂; 非小细胞肺癌; eIF4E; 厄洛替尼; 耐药性

[中图分类号] Q329.25; R734.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)08-1092-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20150808

A preliminary study of BRD4 inhibitor JQ1 effects on non-small cell lung cancer cells

Ni Ping¹, Wu Dandan¹, Zhai Sulan¹, Li Ping¹, Zou Meijuan¹, Li Min¹, Cheng Zhixiang^{2*}, Wang Xuerong^{1*}

(¹Department of Pharmacology, NJMU, Nanjing 210029; ²Department of Pain Management & Biotherapy Center, Second Affiliated Hospital, NJMU, Nanjing 210011, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects and mechanism of BRD4 inhibitor JQ1 on the growth of human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells including erlotinib resistant cells. **Methods:** The inhibitory effects of JQ1 on the growth of human NSCLC were observed at different concentrations for 72 hours by sulforhodamine B (SRB) assay. mRNA and protein levels of eIF4E were detected by quantitative real-time PCR assay and Western blot, respectively. **Results:** JQ1 inhibited the growth of NSCLC cells including erlotinib parental and resistant cells in a dose dependent manner. The mRNA and protein expression levels of eIF4E decreased significantly by JQ1 treatment. **Conclusion:** JQ1 inhibits the growth of NSCLC cells possibly through downregulating eIF4E expression.

[Key words] JQ1; BRD4 inhibitor; non-small cell lung cancer; eIF4E; erlotinib; drug resistance

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(08): 1092-1095]

JQ1 是一种 BET 蛋白家族抑制剂, 可抑制多发性骨髓瘤、脑胶质瘤、卵巢癌、乳腺癌、胶质母细胞瘤、中线瘤等多种肿瘤的生长, 并用于艾滋病的治疗^[1-6]。肺癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一, 其 5 年存活率明显低于其他恶性肿瘤^[7]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) 占有肺癌患者的 75%~85%, 包括鳞癌、腺癌和大细胞癌等类型, 具有细胞侵袭和转移等生物学特性, 严重危害人类健康和生命。真核起始因子 4E (eukaryotic initiation factor 4E, eIF4E) 可以特异性地识别 mRNA 5' 端的

帽子结构, 是真核生物胞质中 mRNA 翻译最有效的限速因子, eIF4E 作为一种癌基因, 在多种实体瘤中高表达, 与肿瘤的生长、侵袭和转移密切相关^[8]。Li 等^[5]发现, 在肺癌中 eIF4E 的高表达参与了获得性耐药的产生。本研究旨在探究 JQ1 抑制人 NSCLC 细胞(包括耐药细胞株)生长可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人 NSCLC 细胞株 A549、H157、H460 和 Calu-1

[基金项目] 国家自然科学基金(81473241, 81102458, 811172004, 81372395); 南京医科大学基础医学院优势学科, 校引进人才启动基金

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhixiangcheng@njmu.edu.cn; wangxrwn@hotmail.com

来源于美国菌种保藏中心(ATCC),厄洛替尼敏感细胞株(HCC827-EP)和厄洛替尼耐药细胞株(HCC827-ER)由美国 Emory 大学 Shi-Yong Sun 博士馈赠。JQ1(上海浩元化学科技有限公司),磺酰罗丹明 B(SRB,Sigama 公司,美国),兔抗 eIF4E(Cell Signaling Technology 公司,美国),兔抗 GAPDH(Bioworld 公司,美国),SYBR Green PCR Master Mix(Roche 公司,瑞士)。

1.2 方法

1.2.1 SRB 法检测 JQ1 对 NSCLC 细胞株的增殖抑制作用

人 NSCLC 细胞株 A549、H157、Calu-1、H460 和 HCC827-EP、HCC827-ER 用 RPMI-1640 培养基, H460 用 DMEM 高糖培养基,置于含 5%FBS 5%CO₂ 37℃孵箱中培养,细胞生长融合度达 80%~90%时,用 0.25%胰酶消化细胞后进行细胞计数,按 100 μL/孔接种于 96 孔板,贴壁 18~24 h 后予不同浓度的 JQ1 处理 72 h,弃去培养基,加入 10%三氯乙酸(TCA)100 μL 于 4℃固定,固定后的细胞用去离子水洗净并干燥,再加入 0.4%SRB 50 μL/孔,室温孵育 15 min,用 1%冰醋酸洗涤 5 次以除去未结合 SRB,晾干后加 10 mmol/L Tris 碱 (pH10.5)100 μL/孔,在平板振荡器上常温平摇反应 5 min,最后用酶标仪于 500 nm 波长处读取吸光度值。药物对细胞增殖抑制率 (%)=[1-(用药组吸光度值-空白对照吸光度)/(对照组吸光度值-空白对照吸光度)]×100%。

1.2.2 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测 JQ1 对 NSCLC 细胞株中 eIF4E mRNA 水平调控作用

人 NSCLC 细胞株 A549、H157、Calu-1、H460 和 HCC827-EP、HCC827-ER 细胞接种于 6 孔板,贴壁 18~24 h 后予不同浓度的 JQ1 处理 24 h,弃去培养基,加入 400 μL TRIzol,提取总 RNA 并进行逆转录,具体实验见参考文献[9]。用 SYBR Green 荧光染料进行靶基因相对定量检测。Oligo(dT)18 随机引物、eIF4E、GAPDH 引物由美国 Invitrogen 公司合成,引物序列参照文献设计,序列如下:eIF4E: 上游:5'-CCTACAGAACAGATGGGCACTC-3'和下游:5'-GCC-CAAAAGTCTTCAACAGTATCA-3';GAPDH:上游:5'-ATGGGAAGGTGAAGGTCG-3'和下游:5'-GGGGTCATTGATGGCAACAATA-3'。反应条件:50℃ 2 min;95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,共 40 个循环^[10]。

1.2.3 Western blot 法检测 JQ1 对 NSCLC 细胞株中 eIF4E 蛋白水平的调控作用

人 NSCLC 细胞株 A549、H157、Calu-1、H460 和 HCC827-EP、HCC827-ER 细胞接种于 6 孔板,贴壁 18~24 h 后予不同浓度的 JQ1 处理 24 h,弃去培养基,用全细胞蛋白裂解液裂解细胞,提取总蛋白^[11],SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转移至 PVDF 膜上,用含 5%脱脂奶粉的 PBST 室温封闭 1.5 h,一抗 4℃封闭过夜,以 HRP 标记的羊抗兔二抗室温孵育 1.5 h,ECL 发光液曝光。

1.3 统计学方法

所有数据均采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS18.0 软件进行数据分析,各组间数据差异采用 *t* 检验分析,采用 GraphPad Prism 5 软件作图。 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 JQ1 抑制 NSCLC 细胞株增殖

在 A549、H157、Calu-1 和 H460 这 4 株不同的 NSCLC 细胞上给予不同浓度的 JQ1 处理 72 h,JQ1 对这 4 株细胞都有抑制增殖的作用,且随药物浓度的增加,对细胞增殖抑制作用逐渐增强,具有剂量依赖性,结果具有统计学差异(图 1)。JQ1 对厄洛替尼敏感和耐药细胞株生长同样存在抑制作用,差异具有统计学意义(图 2)。

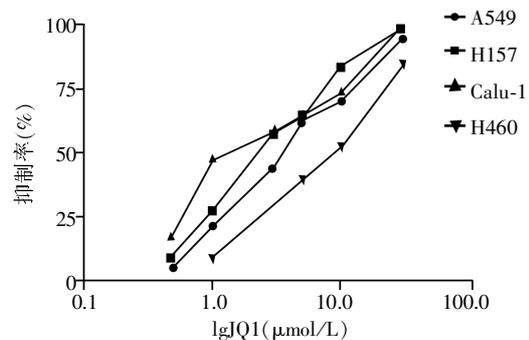


图 1 SRB 法检测 JQ1 抑制 NSCLCs 细胞的生长
Figure 1 The inhibition effect of JQ1 on NSCLCs

2.2 JQ1 下调 NSCLC 中 eIF4E mRNA 和蛋白表达

A549、H157、Calu-1、H460 这 4 株不同的 NSCLC 细胞分别给予 JQ1 处理 24 h 后,收集 RNA 和蛋白,分别用 qRT-PCR 和 Western blot 检测,结果显示 eIF4E 的 mRNA 水平和蛋白水平均显著下调,且呈浓度依赖性(图 3)。

2.3 JQ1 下调厄洛替尼敏感和耐药细胞株中 eIF4E mRNA 和蛋白表达

厄洛替尼耐药细胞株 eIF4E 的 mRNA 和蛋白表达高于敏感细胞株(图 4A、4B)。本研究检测了

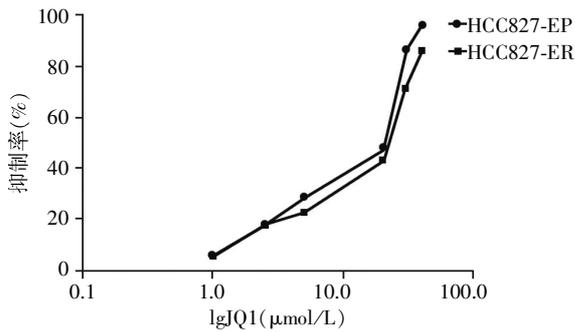


图 2 JQ1 抑制厄洛替尼敏感和耐药细胞株的生长

Figure 2 JQ1 inhibits the growth of HCC827-EP and HCC827-ER cells

JQ1 对该细胞株 eIF4E 的调节作用, HCC827-EP 和 HCC827-ER 给予 JQ1 处理 24 h, qRT-PCR 结果显示 HCC827-EP、HCC827-ER 上 eIF4E 的 mRNA 的水平降低(图 4A)。Western blot 结果也显示, 在 JQ1 处理 24 h 后, HCC827-EP、HCC827-ER 上 eIF4E 的

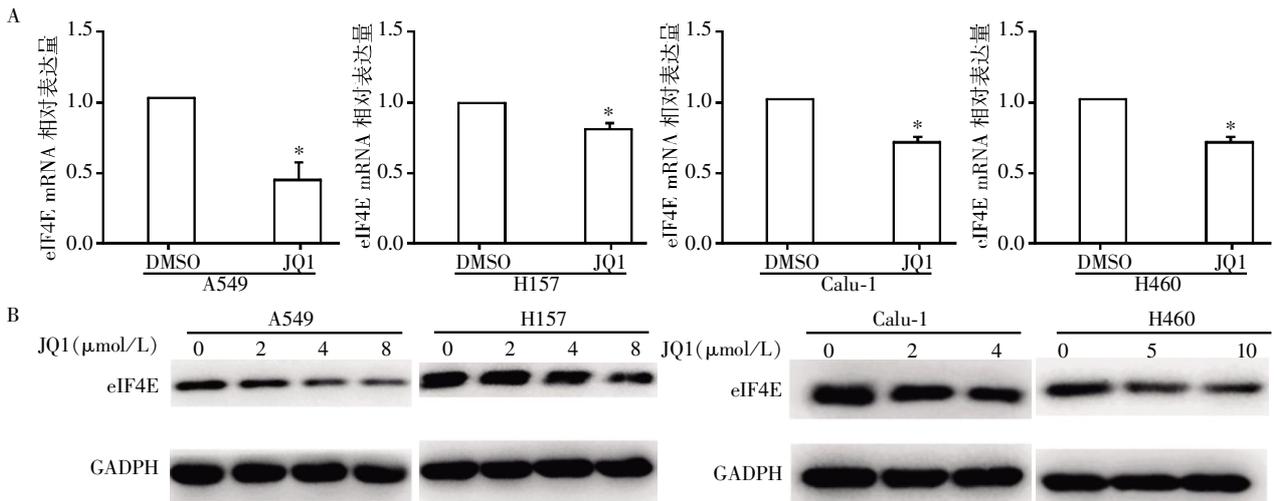
蛋白水平也显著下调(图 4C)。

3 讨论

随着细胞生物学、分子生物学和现代医学的发展, 对肺癌发病、侵袭和转移等机制的研究有了很大进展, 但最新的数据统计结果显示, 肺癌的 5 年存活率仍不容乐观, 1999—2006 年的生存率仅为 16%^[11]。

JQ1 作为一种小分子化合物, 是 BET 蛋白家族的抑制剂, 作用于 BRD4。BRD4 是 BET 家族的一个成员, 能够特异性识别并结合染色质组蛋白 H3/H4 乙酰化赖氨酸残基, 调节基因转录, 是细胞生长所必需, 与细胞周期调控、DNA 复制及基因重排等密切相关, 并在肿瘤发生发展过程中起重要作用。Bradner 实验室的化学家 Jun Qi 命名了这种化合物。研究证明, JQ1 在几种血癌模型, 如白血病和多发性骨髓瘤中有效^[3]。

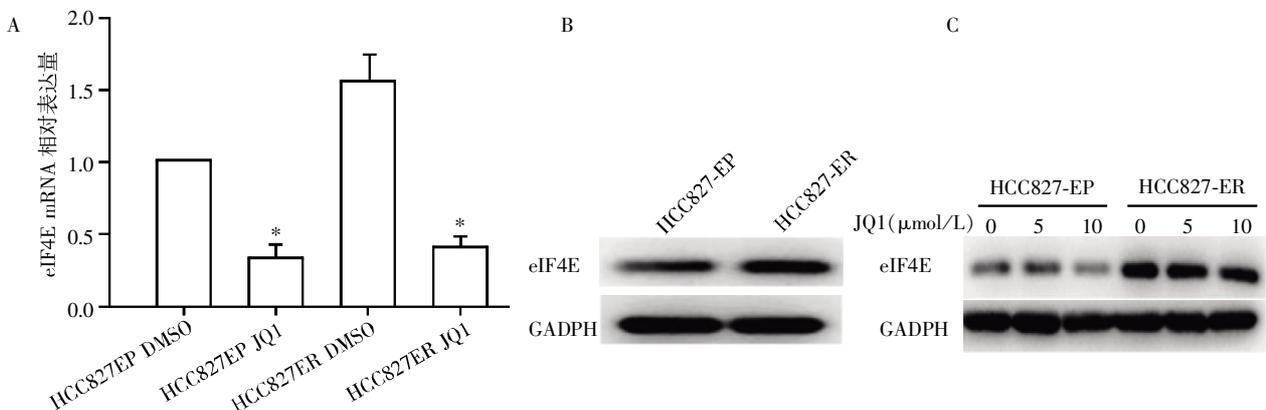
eIF4E 是分子量约为 25 000 的多肽, 是真核细



A: qRT-PCR 检测 eIF4E mRNA 的表达, 与 DMSO 组比较, * $P < 0.05$ ($n=3$); B: Western blot 检测 eIF4E 蛋白水平的表达。

图 3 JQ1 降低 NSCLC 细胞 eIF4E mRNA 和蛋白水平的表达

Figure 3 JQ1 downregulated eIF4E mRNA and protein expression of NSCLCs



A: qRT-PCR 检测 eIF4E mRNA 的表达, 与 DMSO 组比较, * $P < 0.05$ ($n=3$); B: Western blot 检测 HCC827-EP、HCC827-ER eIF4E 本底蛋白水平表达; C: Western blot 检测 eIF4E 蛋白水平的表达。

图 4 JQ1 下调厄洛替尼敏感细胞和耐药细胞株 eIF4E mRNA 和蛋白水平的表达

Figure 4 JQ1 downregulated eIF4E mRNA and protein expression of HCC827-EP and HCC827-ER cells

胞翻译起始因子。近年来研究表明 eIF4E 在多种恶性肿瘤中发挥重要作用,一方面 eIF4E 可以调控促癌 mRNA,这类 mRNA 在真核细胞发生翻译时,可以触发不可控的细胞复制,从而导致肿瘤的发生^[12]。此外,在乳腺癌、头颈部肿瘤、结肠癌、胃癌等组织和癌旁组织中,eIF4E 呈高表达,且其表达水平与肿瘤的侵袭和转移能力正相关^[13]。本实验中发现 JQ1 可以抑制多种 NSCLC 的生长,提示 JQ1 对 NSCLC 可能有抑制作用。

表皮生长因子受体(EGFR)靶向治疗药物厄洛替尼在部分有 EGFR 突变的 NSCLC 患者有明显作用,但是常在使用 6 个月至 1 年后出现耐药性,是限制其疗效的重要因素^[14]。既往研究发现,eIF4E 表达增高与其耐药性有关,抑制 eIF4E 的表达可部分抑制其耐药性^[8-15]。HCC827-EP 存在 EGFR 基因突变,使得 EGFR 处于异常活化状态,对厄洛替尼极度敏感。HCC827-ER 是本实验室给予厄洛替尼处理而获得的耐药细胞株,DNA 测序结果表明,HCC827-EP 和 HCC827-ER 都未发生 EGFR T790M 位点的突变。因此选取了 HCC827-EP 和 HCC827-ER 作为实验对象。本研究发现 JQ1 能够下调厄洛替尼敏感和耐药细胞株中 eIF4E mRNA 和蛋白的水平,并显著抑制厄洛替尼敏感和耐药细胞的增殖。结果提示,JQ1 有可能通过下调 eIF4E 的表达,部分克服对厄洛替尼的耐药性。

鉴于 eIF4E 与肿瘤的关系十分密切,目前有关以 eIF4E 为靶点的肿瘤相关研究较多。同样,近年来关于 BRD4 功能和调控机制的研究也日益受到关注,作为 BRD4 的抑制剂 JQ1 的研究也成为研究热点。我们发现 JQ1 可以明显下调 eIF4E 的 mRNA 和蛋白水平,可能是其发挥抑制 NSCLC 生长的作用机制之一,但更多具体的作用机制还有待进一步研究。此外,在肺癌中 eIF4E 的表达增高与 NSCLC 对厄洛替尼产生获得性耐药有关,JQ1 通过下调 eIF4E 的 mRNA 和蛋白水平来抑制厄洛替尼耐药细胞株的生长。故本研究不仅可以为治疗 NSCLC 提供新思路,也可以为克服耐药提供新的研究方向。

[参考文献]

[1] Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, et al. Selective inhibition of BET bromodomains[J]. *Nature*, 2010, 468 (7327): 1067-1073

[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] Cheng Z, Gong Y, Ma Y, et al. Inhibition of bet bromodomain targets genetically diverse glioblastoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(7): 1748-1759

[4] Mertz JA, Conery AR, Bryant BM, et al. Targeting MYC dependence in cancer by inhibiting BET bromodomains[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108 (40): 16669-16674

[5] Li Z, Guo J, Wu Y, et al. The BET bromodomain inhibitor JQ1 activates HIV latency through antagonizing Brd4 inhibition of Tat-transactivation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(1): 277-287

[6] Baratta MG, Schinzel AC, Zwang Y, et al. An in-tumor genetic screen reveals that the BET bromodomain protein, BRD4, is a potential therapeutic target in ovarian carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112 (1): 232-237

[7] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008[J]. *CA Cancer J Clin*, 2008, 58(2): 71-96

[8] 李敏, 谌茜, 马倬, 等. eIF4E 在非小细胞肺癌耐药性中的作用[J]. *南京师大学报: 自然科学版*, 2014 (2): 91-95

[9] Ma Z, Zhu L, Luo X, et al. Perifosine enhances mTORC1-targeted cancer therapy by activation of GSK3beta in NSCLC cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(11): 1009-1017

[10] Nowak DE, Tian B, Jamaluddin M, et al. RelA Ser276 phosphorylation is required for activation of a subset of NF-kappaB-dependent genes by recruiting cyclin-dependent kinase 9/cyclin T1 complexes[J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(11): 3623-3638

[11] Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics, 2011[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(4): 212-236

[12] Feoktistova K, Tuvshintogs E, Do A, et al. Human eIF4E promotes mRNA restructuring by stimulating eIF4A helicase activity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110 (33): 13339-13344

[13] Liang S, Guo R, Zhang Z, et al. Upregulation of the eIF4E signaling pathway contributes to the progression of gastric cancer, and targeting eIF4E by perifosine inhibits cell growth[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(6): 2422-2430

[14] Onitsuka T, Uramoto H, Nose N, et al. Acquired resistance to gefitinib; the contribution of mechanisms other than the T790M, MET, and HGF status[J]. *Lung Cancer*, 2010, 68 (2): 198-203

[15] Li Y, Fan S, Koo J, et al. Elevated expression of eukaryotic translation initiation factor 4E is associated with proliferation, invasion and acquired resistance to erlotinib in lung cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(5): 272-280