DOI:10.16016/j.1000-5404.201509088

JMJD2B 对人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞株生物学行为的影响

王 月,余南岚,翟志芳,钟白玉,熊 亚,张 恋,冯 林,杨希川 (400038 重庆,第三军医大学西南医院皮肤科)

[摘要] **目的** 探讨组蛋白去甲基化酶 JMJD2B(Jumonji domain-containing protein 2B)小干扰 RNA(siRNA)对人皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞株生物学行为的影响。**方法** 采用免疫组化和细胞免疫荧光的方法检测 JMJD2B 在人皮肤鳞状细胞癌组织和 A431 细胞中的表达,转染 JMJD2B siRNA 至 A431 细胞株,分别采用 CCK-8、克隆形成实验、流式细胞仪、Transwell 法检测细胞增殖、克隆、周期分布、凋亡、迁移及侵袭情况。**结果** JMJD2B 在肿瘤组织中的表达高于正常皮肤。与未转染组和转染对照组比较,JMJD2B siRNA 转染组增殖、克隆、迁移及侵袭能力显著受抑,肿瘤细胞发生 G_1 期阻滞,细胞凋亡比例增加($P<0.05$)。**结论** JMJD2B 在人皮肤鳞状细胞癌中呈高表达,JMJD2B siRNA 能促进 A431 细胞的凋亡,同时也抑制了肿瘤细胞的增殖、克隆、迁移以及侵袭的能力。

[关键词] JMJD2B;鳞状细胞癌;细胞增殖;细胞凋亡
[中图法分类号] R345; R73-362; R739.5 [文献标志码] A

Effect of Jumonji domain-containing protein 2B on biological behaviors in human cutaneous squamous cell carcinoma A431 cells

Wang Yue, Yu Nanlan, Zhai Zhifang, Zhong Baiyu, Xiong Ya, Zhang Lian, Feng Lin, Yang Xichuan (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the inhibitory effect of Jumonji domain-containing protein 2B (JMJD2B) siRNA on biological behaviors in human squamous carcinoma cells. **Methods** The expression of JMJD2B in the human squamous cell carcinoma tissue and A431 cells was detected by immunohistochemical staining and cell immunofluorescence assay. The A431 cells were transfected with JMJD2B siRNA by Liposome. Then the proliferation, colony formation, cell apoptosis, cell cycle, migration and invasion were measured by CCK-8 assay, colony formation assay, flow cytometry, and transwell migration assay, respectively. **Results** JMJD2B was highly expressed in the tumor tissues than normal skin tissues. Compared with the un-transfected A431 cells, the cell proliferation, colony formation, and migration and invasion abilities were significantly decreased, while cell apoptosis was increased in the cells after siRNA transfection ($P<0.05$). Cell cytometry indicated JMJD2B siRNA transfection arrested the cells at G_1 phase ($P<0.05$). **Conclusion** JMJD2B is highly expressed in the human squamous cell carcinoma. JMJD2B siRNA promotes cell apoptosis, and suppresses cell proliferation, colony formation, and migration and invasion abilities in A431 cells.

[**Key words**] Jumonji domain-containing protein 2B; squamous cell carcinoma; proliferation; apoptosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81271771). Corresponding author: Yang Xichuan, E-mail: doctoryxc@msn.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81271771)
[通信作者] 杨希川,E-mail: doctoryxc@msn.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160126.1536.023.html(2016-01-26)

皮肤鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma,SCC)是起源于表皮或附属器角质形成细胞的一种恶性肿瘤,其发病率较高,在皮肤非黑素瘤细胞癌中仅次于基底细胞癌(BCC),约占20%[1]。虽然SCC发病率不及BCC,但其恶性程度高、生长迅速、易发生转移且病因不明[2],因此,对于SCC的病因研究尤为重要。近年来,很多研究发现中波紫外线、人乳头瘤病毒、慢性皮肤溃疡、烧伤疤痕、吸烟、化学致癌物以及免疫抑制等是SCC的高危因素[3-7],然而对于SCC发病的分子机制研究甚少[8]。

组蛋白去甲基化是一种重要的表观遗传性修饰方式,能调节染色质结构和基因表达,是一种可逆的动态调节过程。组蛋白去甲基化酶在胚胎发育、干细胞的维持和分化、肿瘤发生和发展中起着重要的作用[9]。含Jumonji结构域的蛋白2B(Jumonji domain-containing protein 2B,JMJD2B)属于组蛋白去甲基化酶家族成员之一,它可将组蛋白H3上三甲基化修饰的第9位赖氨酸(trimethylated lysine 9 of histone H3,H3K9me3)特异性地去甲基化[10]。以往研究发现JMJD2家族在前列腺癌、乳腺癌、大肠癌以及肺癌中表达显著升高[10-11],而该家族与SCC发生、发展的关系目前尚不清楚。因此,本课题组欲探讨JMJD2B与皮肤SCC的关系,从而为皮肤SCC的临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

DMEM培养液、胎牛血清(FBS)、PBS、0.25%胰酶消化液(Hyclone公司)、脂质体Lipofectamine 2000(Invitrogen公司)、si-JMJD2B(锐博公司)、抗原修复液(中杉公司)、JMJD2B抗体(Abcam公司,ab27531)、Ⅱ抗(中杉公司,山羊抗小鼠)、甲醇、0.1% Triton(上海索莱宝公司)、DAPI染液(碧云天公司)、水溶性封片剂、CCK-8、96孔培养板、24孔培养板、6孔培养板等。

1.2 方法

1.2.1 组织收集 收集2013-2015年西南医院皮肤科SCC患者石蜡标本共30例,泌尿外科包皮环切术后的成人正常包皮组织8例。

1.2.2 细胞培养 SCC细胞株A431购自中国科学院上海细胞生物研究所,培养于10%小牛血清的DMEM培养基中,于5% CO_2和37 ℃条件下培养。

1.2.3 免疫组化检测SCC和健康成人包皮组织JMJD2B的表达 石蜡切片脱蜡,抗原修复,滴加山羊血清封闭液,滴加JMJD2B抗体,4 ℃过夜。室温复温,滴加Ⅱ抗,37 ℃孵育30 min。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液,DAB显色,苏木精复染后脱水、透明、封片、镜检。

1.2.4 细胞免疫荧光检测JMJD2B在A431细胞中的表达 弃去A431细胞培养基,冰甲醇固定,0.1% Triton通透15 min,加入JMJD2B抗体,4 ℃过夜。室温复温,滴加荧光二抗,室温孵60 min,加入DAPI染液染色,捞出细胞爬片,用水溶性封片剂将其封片至载玻片上,利用激光共聚焦显微镜观察并拍照。

1.2.5 转染A431细胞株 采用脂质体lipofectamine 2000进行转染。分别设JMJD2B siRNA组,control siRNA组和未转染组。

1.2.6 CCK-8检测细胞增殖 实验分3组,分别为未转染组、control siRNA组、JMJD2B siRNA组,分别接种于96孔培养板,每孔100 μL(1×10^4/mL),共接种15孔。培养24 h后转染control siRNA和JMJD2B siRNA,分别于转染后1~5 d检测。检测时,每孔加入90 μL DMEM/高糖培养基10 μL CCK-8,再取3个没有接种细胞的孔加入相同量的培养基和CCK-8作为空白对照,放细胞培养箱孵育2 h后,用酶标仪读取450 nm处光密度值。

1.2.7 克隆形成实验 A431细胞接种6孔板,培养24 h后转染siRNA,实验分JMJD2B siRNA组,control siRNA组和未转染组,转染24 h后,将各组细胞消化,并分别计数。将每组细胞分别接种24孔板,200个细胞/孔,每孔培养基体积补加至0.5 mL,2周后观察细胞克隆现象。4%中性甲醛固定30 min,伊红染色约3 min,PBS清洗后进行拍照。

1.2.8 流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡 A431细胞转染48h后做细胞周期检测。PBS重悬细胞(约1×10^6个细胞),75%乙醇固定,PBS重悬细胞,加入150 μL RNase,37 ℃孵育40 min后加入200 μL PI,4 ℃孵育2 h,流式细胞仪检测。采用ModfitLT for Mac 3.0软件进行分析。

1.2.9 Transwell法检测JMJD2B siRNA对细胞迁移与侵袭的影响 实验分为未转染组、control siRNA组、JMJD2B siRNA组。将转染24 h后的A431细胞取出制备单细胞悬液,密度为1×10^6个细胞/mL。取出3个细胞小室放入24孔板中,每个细胞小室加入对应分组稀释后的细胞悬液100 μL(即每孔细胞数为1×10^5个),细胞小室的下室加入500 μL 10%胎牛血清的DMEM/高糖完全培养基,放细胞培养箱培养10 h,PBS浸泡洗涤,80%乙醇固定,伊红染色。取出小室放入盛有3 mL PBS的6孔板中。倒置荧光显微镜下随机取6个视野照相、计数(200倍),取平均数。另外将-20 ℃保存Matrigel胶置于4 ℃冰箱过夜,融化稀释后加入细胞小室上室,覆盖整个聚碳酯膜,重复以上相同步骤检测细胞侵袭能力。

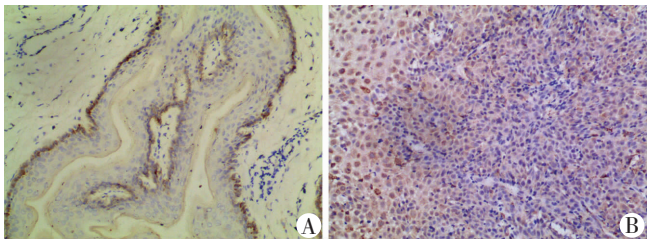
1.3　统计学分析

应用SPSS 13.0统计软件,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数的比较采用单因素方差分析。

2　结果

2.1　JMJD2B在SCC中的表达高于皮肤正常组织

在正常成人包皮组织中仅有少量细胞表达JMJD2B,主要分布于表皮基底层。而在SCC患者组织中JMJD2B呈高表达,阳性细胞弥漫性分布,且能同时表达在细胞核与细胞质(图1)。



A:正常皮肤组织,B:SCC组织

图1　免疫组化检测JMJD2B在正常皮肤和SCC组织中的表达　(S-P ×200)

2.2　JMJD2B同时表达在A431细胞的细胞核与细胞质

在A431细胞中,JMJD2B能同时表达于细胞核、细胞质(图2)。该结果和免疫组化检测结果一致。

2.3　JMJD2B siRNA抑制细胞增殖活性

3组细胞增殖均呈增长趋势,JMJD2B siRNA组细胞增殖活性明显降低($P<0.05$),而control siRNA组的细胞增殖活性比未转染组稍低(表1)。

表1　CCK-8法检测各组细胞不同时间细胞增殖活性($\bar{x} \pm s$)

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
未转染组	0.58±0.12	0.83±0.08	1.13±0.16	1.46±0.20	2.00±0.16
control siRNA组	0.57±0.08	0.79±0.09	1.09±0.11	1.40±0.20	1.83±0.16
JMJD2B siRNA组	0.41±0.08[a]	0.52±0.12[a]	0.80±0.17[a]	1.05±0.16[a]	1.36±0.23[a]

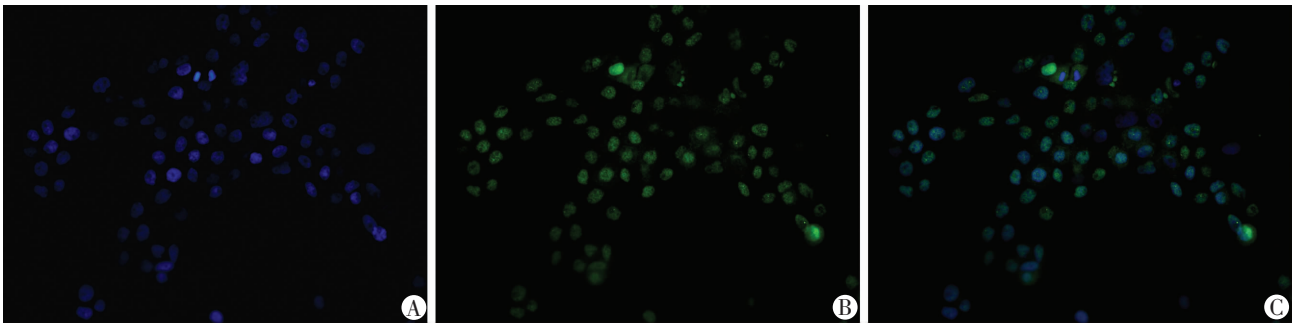
a:$P<0.05$,与其他2组比较

2.4　细胞克隆能力受抑

JMJD2B siRNA组(29.00±11.53)细胞克隆能力较未转染组(70.67±15.18)、control siRNA组(69.67±10.60)显著受抑,细胞克隆数目及大小显著降低($P<0.05$)。未转染组和转染control siRNA组细胞克隆数目及大小接近($P>0.05$)。

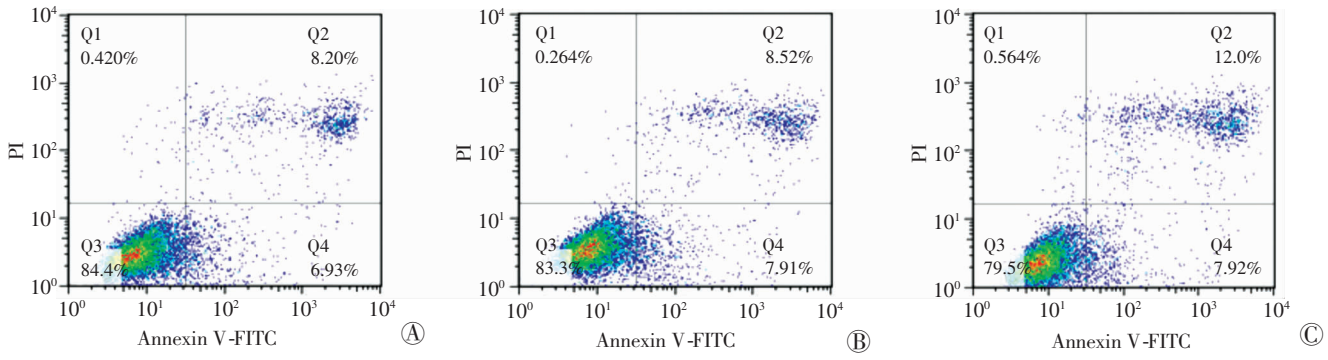
2.5　细胞周期分析

JMJD2B siRNA组A431细胞凋亡率增加(19.92%),细胞更多地阻滞在G_1期(59.70%),而control siRNA及未转染组细胞凋亡率分别为16.43%和15.13%,而G_1期细胞比例分别为55.85%和55.75%($P<0.05$,图3)。



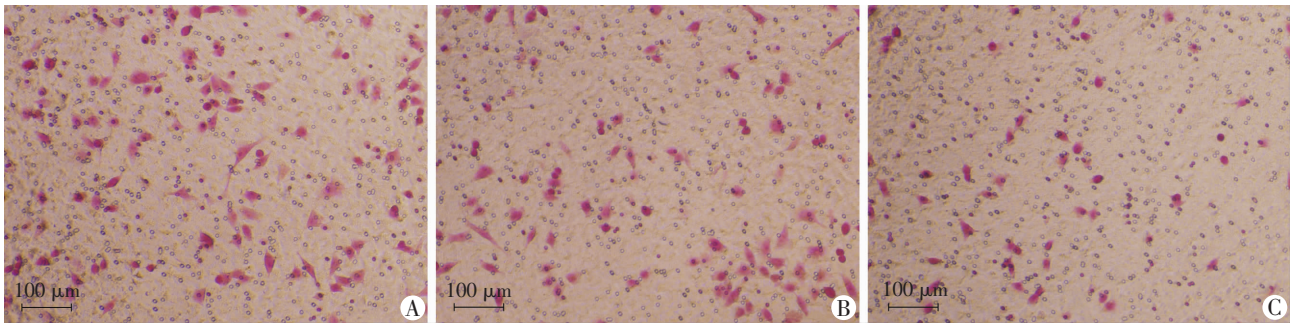
A:DAPI;B: JMJD2B表达;C: DAPI和JMJD2B共定位

图2　免疫荧光检测JMJD2B在A431细胞中的表达　(×200)



A:未转染组;B:control siRNA组;C:JMJD2B siRNA组

图3　流式细胞仪检测各组细胞凋亡



A:未转染组;B:control siRNA 组;C:JMJD2B siRNA 组

图 4 Transwell 法检测各组细胞迁移

2.6 细胞迁移及侵袭

JMJD2B siRNA 组细胞迁移力和侵袭力明显降低($P<0.05$),control siRNA 组的细胞迁移力及侵袭力只比未转染组稍低(图 4,表 2)。

表 2 各组细胞迁移和侵袭(个,$\bar{x}\pm s$)

组别	细胞迁移	细胞侵袭
未转染组	88.00±10.00	59.33±7.57
control siRNA 组	86.67±7.57	46.67±6.11
JMJD2B siRNA 组	39.33±6.66[a]	24.33±5.51[a]

a:$P<0.05$,与其他 2 组比较

3 讨论

近年来,表观遗传改变和肿瘤发生、发展的关系是研究的一大热点,涉及的主要变化包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰、染色质重构、非编码 RNA 改变等,其中组蛋白甲基化酶与去甲基化酶的失衡在肿瘤形成中起着重要作用[12-14]。组蛋白去甲基化酶 JMJD2 家族包含四个成员,分别为 JMJD2A、B、C 和 D,能特异性地将组蛋白 H3 上三甲基化修饰的第 9 位赖氨酸(trimethylated lysine 9 of histone H3,H3K9me3)去甲基化。H3K9me3 位于基因转录启动子区,能抑制染色质的转录,因此 JMJD2 家族是通过特异性地使 H3K9me3 去甲基,来激活染色质的转录。研究发现在大肠癌中,JMJD2B 的过表达能激活癌基因如 JUN、MYC 以及 Cyclin D1 的转录[15]。

本课题研究发现:JMJD2B 在 SCC 中的表达远高于正常皮肤组织,据本实验 30 例高中低分化 SCC 结果分析,JMJD2B 的核表达与肿瘤分化程度有呈负相关的趋势,但仍需后续大样本实验验证。研究结果与之前 JMJD2B 在胃癌中分布研究基本一致[10]。另外,siRNA 特异性抑制 JMJD2B 表达后的 A431 细胞较未转染组和 control siRNA 组细胞凋亡增加、增殖受抑,而 control siRNA 组较未转染组细胞的增殖、迁移及侵袭稍低,推测与转染操作有关。虽然目前有关于 JMJD2B 与乳腺癌、前列腺癌、大肠癌以及肺癌等关系的文献报道,但 JMJD2B 参与肿瘤形成的具体机制仍不清楚。在大肠癌研究中发现 JMJD2B 能与 β-catenin/TCF4 形成复合物,当特异性抑制 JMJD2B 后,β-catenin/TCF4 下游编码癌蛋白的靶基因 JUN、MYC 以及 Cyclin D1 表达降低。另外,JMJD2B 也可能通过减少 DNA 修复所需的 53BPI 募集,来阻止 DNA 的损伤修复,从而影响基因组的稳定性[15]。在胃癌研究中发现:当特异性抑制 JMJD2B 后,肿瘤抑制因子 P53 及下游基因 P21 表达增加,从而使肿瘤细胞增殖与克隆活性受抑,凋亡增加[10]。虽然 JMJD2B 参与 SCC 形成的具体机制不明,但近年来研究发现肿瘤抑制因子 P53 参与 SCC 的形成[8,16-19],且 P53 在 SCC 中的基因突变率约为 40%~50%[20],因此,我们推想在 SCC 中,若特异性抑制 JMJD2B 表达后,则 P53 表达增加,从而使得 A431 细胞凋亡增加、增殖受抑。

综上所述,JMJD2B 在 SCC 中呈高表达,当 siRNA 抑制 JMJD2B 表达后,A431 细胞凋亡增加、增殖受抑。对于 JMJD2B 参与 SCC 形成的具体机制仍需进一步研究,以期为 SCC 药物的靶向治疗提供理论基础。

参考文献:

[1] Mateus C. Cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Rev Prat, 2014, 64(1): 45-52.

[2] Prado R, Francis S O, Mason M N, *et al*. Nonmelanoma skin cancer chemoprevention[J]. Dermatol Surg, 2011, 37(11): 1566-1578. DOI:10.1111/j.1524-4725.2011.02108.x

[3] Iannacone M R, Gheit T, Pfister H, *et al*. Case-control study of genus-beta human papillomaviruses in plucked eyebrow hairs and cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer,

2014, 134(9): 2231 – 2244. DOI:10.1002/ijc.28552

[4] Garcia-Zuazaga J, Olbricht S M. Cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Adv Dermatol, 2008, 24: 33 – 57.

[5] Gressel K L, Duncan F J, Oberyszyn T M, *et al*. Endogenous Retinoic Acid Required to Maintain the Epidermis Following Ultraviolet Light Exposure in SKH-1 Hairless Mice [J]. Photochem Photobiol, 2015, 91 (4): 901 – 908. DOI: 10.1111/php.12441

[6] Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous-cell carcinoma[J]. N EnglJMed, 2001, 344 (13): 975 – 983. DOI:10.1056/NEJM200103293441306

[7] Aldabagh B, Angeles J G, Cardones A R, *et al*. Cutaneous squamous cell carcinoma and human papillomavirus: is there an association? [J]. Dermatol Surg, 2013, 39 (1 Pt 1): 1 – 23. DOI:10.1111/j.1524-4725.2012.02558.x

[8] Li L, Jiang M, Feng Q, *et al*. Aberrant Methylation Changes Detected in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of Immunocompetent Individuals [J]. Cell Biochem Biophys, 2015, [Epub ahead of print]. DOI:10.1007/s12013-014-0507-2

[9] 叶覃, Holowatyj A, Labbe R M, 等. 组蛋白去甲基化酶家族中组蛋白去甲基化酶4作用机制及其应用的研究进展[J]. 转化医学杂志, 2014, 3(1): 13 – 18.

[10] Li W, Zhao L, Zang W, *et al*. Histone demethylase JMJD2B is required for tumor cell proliferation and survival and is overexpressed in gastric cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 416 (3/4): 372 – 378. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.11.045

[11] Berry W L, Janknecht R. KDM4/JMJD2 histone demethylases: epigenetic regulators in cancer cells[J]. Cancer Res, 2013, 73 (10): 2936 – 2942. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4300

[12] Paolicchi E, Crea F, Farrar W L, *et al*. Histone lysine demethylases in breast cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2013, 86(2): 97 – 103. DOI:10.1016/j.critrevonc.2012.11.008

[13] Lan F, Nottke A C, Shi Y. Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases[J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20 (3): 316 – 325. DOI: 10.1016/j.ceb.2008.03.004

[14] Brookes E, Shi Y. Diverse epigenetic mechanisms of human disease[J]. Annu Rev Genet, 2014, 48: 237 – 268. DOI: 10.1146/annurev-genet-120213-092518

[15] Hoffmann I, Roatsch M, Schmitt M L, *et al*. The role of histone demethylases in cancer therapy [J]. Mol Oncol, 2012, 6(6): 683 – 703. DOI:10.1016/j.molonc.2012.07.004

[16] Berry W L, Kim T D, Janknecht R. Stimulation of β-catenin and colon cancer cell growth by the KDM4B histone demethylase[J]. Int J Oncol, 2014, 44(4): 1341 – 1348. DOI: 10.3892/ijo.2014.2279

[17] Ratushny V, Gober M D, Hick R, *et al*. From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma[J]. J Clin Invest, 2012, 122(2): 464 – 472. DOI:10.1172/JCI57415

[18] Loeb K R, Asgari M M, Hawes S E, *et al*. Analysis of Tp53 codon 72 polymorphisms, Tp53 mutations, and HPV infection in cutaneous squamous cell carcinomas[J]. PLoS One, 2012, 7 (4): e34422. DOI: 10.1371/journal.pone.0034422

[19] wens D M. p53, chemokines, and squamous cell carcinoma [J]. JClinInvest, 2007, 117(7): 1752 – 1755. DOI:10.1172/JCI32719

[20] Black A P, Ogg G S. The role of p53 in the immunobiology of cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Clin Exp Immunol, 2003, 132(3): 379 – 384.

(收稿:2015-09-16;修回:2015-11-30)

(编辑 邓强庭)