·基础研究·

培美曲塞对SKP2蛋白表达的影响及意义

万　琴,王顺金△
(南昌大学附属第二医院肿瘤科,江西南昌 330006)

摘　要:目的　探讨S期激酶相关蛋白2(SKP2)在培美曲塞(PMX)处理后肺腺癌细胞A549中表达的改变及意义。**方法**　根据PMX的浓度设1个对照组和4个实验组,分别为:0 μmol/L组(A组)、0.01 μmol/L组(B组)、0.1 μmol/L组(C组)、1 μmol/L组(D组)、10 μmol/L组(E组),采用甲基噻唑基四唑(MTT)法检测A549细胞的增殖;利用流式细胞技术分析A549细胞周期的分布;通过Western blot法检测A549细胞SKP2蛋白表达。**结果**　PMX明显抑制A549细胞增殖,以10 μmol/L、72 h作用抑制率最高($P<0.01$);与A组相比C、D、E组S期细胞显著增多($P<0.05$);各组SKP2蛋白相对表达水平差异有统计学意义($P<0.01$);与对照组相比,实验组SKP2蛋白相对表达水平显著增加($P<0.01$)。**结论**　PMX能明显抑制A549细胞增殖且将其阻滞于S期,PMX处理后的A549细胞中SKP2蛋白表达上调,这可能影响PMX对肺腺癌的化疗疗效。

关键词:肺肿瘤;细胞周期;S期激酶相关蛋白质类;培美曲塞
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.16.020　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1671-8348(2012)16-1614-03

Impact of Pemetrexed on expression of SKP2 in adenocarcinoma of lung cell lines A549 cellandits significance

Wan Qin, Wang Shunjin△
(*Department of Oncology, Second Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi* 330006, *China*)

Abstract:Objective　To investigate the expression variation and significance of s-phase kinase-associated protein 2(SKP2) in lung adenocarcinoma A549 cells after the treatment of Pemetrexed(PMX). **Methods**　On the basis of the concentration of PMX, we set one control group and four experimental groups:0μM(group A), 0.01μM(group B), 0.1μM(group C), 1μM(group D), 10μM (group E). The growth of A549 was tested by MTT assay. The effect of PMX on the cell cycle phase distribution of A549 was analyzed by flow cytometry. The expression of SKP2 protein of A549 cells was detected by Western blot. **Results**　MTT assay showed that PMX could significantly inhibit the growth of A549 cells, and the highest inhibitory rate was(78.61±3.66)% at the concentration of 10μM when A549 cells were cultured for 72 h($P<0.01$). Meanwhile, S-phase cells in the group C, D and E was more than those in the group A($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$). The difference of SKP protein expression among various groups was significant($P<0.01$), and compared with the control group, SKP2 protein expression was significantly increased in the experimental groups($P<0.01$). **Conclusion**　PMX could inhibit the growth of A549 cells and arrest them in S-phase. The expression of SKP2 protein in PMX-treated A549 cells is upregulated, which might influence the chemotherapy effect of PMX.

Key words:lung neoplasms; cell cycle; S-phase kinase-associated proteins; pemertrexed

S期激酶相关蛋白2(S-phase kinase-associated protein 2,SKP2)是SCF泛素连接酶复合体(Skp1-Cullin-1-F-box)的特异性底物识别亚单位,大量研究已证实SKP2基因是一种潜在的癌基因,主要存在于恶变细胞的S期,许多肿瘤细胞高表达或普遍表达SKP2蛋白。SKP2的表达与非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)的发生、发展密切相关[1],并且是NSCLC的一个独立的预后指标[2-3]。SKP2表达下调很可能有利于阻止肿瘤增长,被认为是NSCLC分子水平的一个新治疗靶点。培美曲塞(pemetrexed,PMX)是一种新的多靶点叶酸抑制剂,通过抑制叶酸依赖性酶,干扰胸腺嘧啶和嘌呤的合成,达到抗肿瘤的目的。PMX因有效、低毒等优点在NSCLC一线和二线治疗中的地位已经确立,并在维持治疗中显著延长患者总生存期,有关PMX的研究已经成为肿瘤学界的一个热点。Wu等[4]研究发现PMX处理后A549细胞中P27表达上调,且在0～10 μmol/L范围内,具有浓度依赖性。SKP2能介导P27多聚泛素化蛋白水解,有关PMX对SKP2蛋白表达的影响国内外尚未见报道。为此,本组检测了PMX对A549细胞周期及SKP2蛋白表达的影响,以探讨SKP2在PMX处理后的A549细胞中表达的改变及意义。

1　材料与方法

1.1　材料

(1)细胞株:人肺腺癌细胞系A549细胞由南昌大学第二附属医院分子医学中心保存。(2)主要试剂:PMX(江苏豪森,批号061101,含量102.2%)、DMEM培养基、胰蛋白酶(北京Solarbio公司)、胎牛血清(美国Hyclone公司)、二甲基亚砜(美国Ameresco公司)、蛋白提取试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司)、四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT;上海普飞生物技术有限公司)、酶标仪(芬兰Lab systems公司)、流式细胞仪(BD公司)、SKP2抗体(Santa Cruz公司)、山羊抗兔IgG抗体(中杉金桥公司)、免疫印迹配胶、电泳、电转装置(Bio-Rad公司)。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　A549细胞用DMEM培养基(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素),在5% CO_2、37 ℃的条件下常规培养传代。

1.2.2　MTT检测PMX对A549细胞的抑制率　取对数生长期细胞,制成细胞悬液,按每孔5×10^3/200 μL,接种于3块96孔培养板中,24 h后加入PMX,浓度分别为:0、0.01、0.1、1、10 μmol/L。3块板分别作用24、48、72 h后加20 μL浓度为

△　**通讯作者**,Tel:13970018719;E-mail:wangshunjin1950@163.com。

5 g/L的 MTT，37 ℃、5% CO_2 条件下孵育 4 h，吸出培养液，加二甲基亚砜 150 μL/孔，避光条件下置于水平摇床上摇10 min，使 MTT 晶体溶解，经酶标仪 490 nm 波长检测光密度值(optical density，OD)。按以下公式计算各组抑制率(inhibition rate，IR)：抑制率 IR(%)=(对照组 OD 均值－实验组 OD 均值)/对照组 OD 均值×100%。实验重复3 次。

1.2.3 流式细胞周期技术　将细胞接种于 6 孔板，贴壁后加不同浓度 PMX，24 h 后收集细胞，制成单细胞悬液，磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline，PBS)洗 2 次，离心，弃上清液，加 PBS 重悬细胞，加－20 ℃预冷的 75%乙醇并振荡，4 ℃固定 1 h，离心，弃冰乙醇，PBS 冲洗，弃上清液，加入含碘化吡啶和无 DNA 酶污染的 PBS 染色液，4 ℃避光静置 1 h，使用流式细胞检测仪检测 G_1、S、G_2 各期细胞所占的百分率。重复 3 次。

1.2.4 Western blot 法检测 SKP2 的表达　收集处于对数生长期的 A549 细胞，根据细胞计数结果加入含 10%胎牛血清的完全培养基，调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL，接种于培养瓶，贴壁后加入不同浓度 PMX，放入 5% CO_2 孵箱中孵育 48 h 后收集细胞，PBS 洗涤 2 次，提取总蛋白，二喹啉甲酸(bicinchoninic acid，BCA)法测定蛋白浓度。取等量蛋白进行 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，电湿转法将凝胶上蛋白转至聚偏氟乙烯膜上。5%脱脂奶粉室温封闭 2 h。一抗孵育 4 ℃过夜。二抗室温孵育 2 h，暗室曝光。重复 3 次。

1.3 统计学处理　用 SPSS17.0 软件进行数据分析，计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，行单因素方差分析。检验水准 α=0.05。

2 结　　果

2.1 MTT 比色法检测 PMX 对 A549 细胞增殖的抑制情况　见表 1。由表 1 可见，PMX 对 A549 细胞具有抑制作用，同一时间不同浓度 PMX 组之间的细胞增殖抑制率以 10 μM 浓度组最高，同一浓度组分别作用 24 h、48 h、72 h 后，以 72 h 抑制率最高。

表 1　不同浓度 PMX 对 A549 细胞增殖的抑制率($\bar{x}\pm s$，%，$n=3$)

PMX (μmol/L)	24 h	48 h	72 h
0.01	7.19±3.31	10.93±7.31	21.88±10.23
0.1	17.07±7.89	18.53±7.33	27.39±7.66
1	28.03±7.39*	29.62±10.47*	44.34±7.04*
10	58.63±0.86*	68.24±4.29*#	78.61±3.66*#

*：$P<0.01$，与同时间组比较；#：$P<0.01$，与同浓度组比较。

2.2 PMX 使 A549 细胞周期阻滞在 S 期　不同浓度(0.01、0.1、1、10 μM)的 PMX 处理 A549 细胞 48 h 后，细胞周期被阻滞于 S 期。见表 2、封 4 图 1。

表 2　流式细胞仪检测细胞周期分布的结果($\bar{x}\pm s$，%，$n=3$)

细胞周期	0 μmol/L	0.01 μmol/L	0.1 μmol/L	1 μmol/L	10 μmol/L
G_1	77.22±3.64	68.34±10.71	63.72±6.86	59.36±4.75	54.31±2.54
S	17.39±4.21	21.57±3.53	26.95±4.71*	34.76±3.85#	42.47±2.96#
G_2	5.39±3.69	10.09±7.88	9.33±2.44	5.88±3.91	3.22±1.85

*：$P<0.05$，#：$P<0.01$，与同周期 0 μmol/L 组比较。

2.3 PMX 处理 A549 细胞后 SKP2 蛋白表达升高　以目标蛋白灰度值与 β-actin 蛋白灰度值之比表示蛋白相对表达水平，各组的蛋白相对表达水平分别为：A 组 0.38±0.03、B 组 0.79±0.02、C 组 0.84±0.02、D 组 0.80±0.05、E 组 0.96±0.03，差异有统计学意义($P<0.01$)；与 A 组相比，B、C、D、E 组蛋白相对表达水平显著增加($P<0.01$)。PMX 处理后 SKP2 蛋白表达升高，且在一定的浓度范围内，表达量随着 PMX 浓度的增加蛋白表达量也增加。见封 4 图 2。

3 讨　　论

SKP2 位于人类第 5 号染色体短臂上(5p13)，主要存在于恶变细胞的 S 期，能特异性地识别磷酸化的细胞周期蛋白(cyclin)如：p27kip1、p130、p21waf1、p53、E2F、cyclin D1、cyclin E、cyclin A、cyclin B 等依赖性激酶抑制剂，并参与这些蛋白的降解，导致细胞周期抑制物减少，细胞过度增殖，促进恶性肿瘤的发生、发展。SKP2 在许多肿瘤细胞中高表达或普遍表达，在高表达的肿瘤中，通过下调 SKP2 的表达可能抑制肿瘤的增长[5]。Kudo 等[6]将 SKP2 siRNA 质粒转染于口腔鳞癌细胞后发现，SKP2 沉默会导致 P27kip1 表达的增加，抑制口腔鳞癌细胞的增殖。同样，Lee 与 McCormick [7]通过干扰恶性脑胶质瘤细胞株 T98G 中 SKP2 的表达可以促进 T98G 凋亡，推断 SKP2 可作为癌基因治疗的一个靶点。SKP2 在 NSCLC 中也普遍表达，并在 NSCLC 的发生、发展中起重要作用，下调 SKP2 会导致 NSCLC 细胞的凋亡[8]。Jiang 等[9]将 SKP2-siRNAs 转染于 3 株肺癌细胞株后 SKP2 蛋白表达降低，P27 蛋白表达升高，其中肺腺癌细胞 A549 细胞转染 SKP2-siRNAs 后，细胞增殖率降低 12%，凋亡率升高 36%。因而，本组认为剔除 SKP2 基因的过度拷贝或抑制 SKP2 蛋白的表达，将成为治疗恶性肿瘤的一条新路径。

PMX 是一种新的多靶点叶酸抑制剂，通过抑制胸腺嘧啶核苷酸合酶、二氢叶酸还原酶和甘氨酰胺核苷酸转甲基酶，影响 DNA 和 RNA 的合成，使细胞停滞于 S 期，从而促进肿瘤细胞的凋亡达到抗肿瘤的作用。在 NSCLC 中，PMX 主要用于治疗局部晚期或转移性 NSCLC(不包括大多数的鳞状细胞癌)，它对肺腺癌及大细胞癌的疗效远远优于鳞状细胞癌。因此，本研究选用 PMX 敏感的肺腺癌细胞 A549 细胞为实验对象，通过 MTT 证实 PMX 对 A549 细胞具有明显抑制作用，且在一定浓度范围内，抑制作用随着浓度增加而增强，以 10 μmol/L的抑制作用最明显。通过流式细胞周期技术分析发现，PMX 主要使 A549 细胞阻滞于 S 期，这与 Wouters 等[10]的文献报道相符。

本研究旨在探讨 NSCLC 治疗中常用新药 PMX 对 SKP2 蛋白表达的影响及意义，以了解 PMX 是否能通过对 SKP2 的下调进一步促进肿瘤细胞的抑制。本实验通过 Wes tern blot 法表明 PMX 处理后的 A549 细胞中 SKP2 表达并未下调，相反，实验组 SKP2 蛋白表达量明显高于对照组，且随着药物浓度的增加，其表达量也增加。SKP2 表达上调可能促进肿瘤细

胞的增殖，然而 MTT 法显示 PMX 对 A549 细胞具有明显的抑制作用，本组推断虽然 PMX 处理后细胞 SKP2 表达升高，但是 SKP2 的升高引起的细胞增殖不足以抵抗 PMX 对肺腺癌细胞的抑制作用，所以总体表现为抑制。SKP2 表达的增加是 PMX 直接作用的结果还是对细胞周期调节后的表现，其具体机制还不清楚，需要作进一步研究。再者，SKP2 是癌基因，SKP2 蛋白表达上调是否与 PMX 治疗的疗效及预后有关目前尚不知晓，这必须引起重视并进行更深入的研究。

SKP2 也是一个重要的预后评价指标，SKP2 在卵巢癌、软组织肉瘤、口腔鳞癌、胃癌和直肠癌中的表达与预后相关都见诸报道。人们发现 SKP2 高表达患者预后差，SKP2 的表达就像 N 分期一样是总生存率的一个独立预测指标。Osoegawa 等[11]通过多因素分析显示 SKP2 是 NSCLC 的一个独立预后因子，SKP2 高表达的 NSCLC 患者预后不良。SKP2 是否是 PMX 治疗肺腺癌的一个预后指标也有待进一步的研究。

总之，本实验再次肯定了 PMX 对肺腺癌细胞的抑制作用以及 S 期阻滞；本研究发现 PMX 处理后肺腺癌细胞 A549 细胞中 SKP2 蛋白表达升高，其具体机制目前尚不清楚，但 SKP2 是癌基因，其表达上调可能影响 PMX 的化疗疗效及预后。同时，进一步探讨 PMX 与特异性下调 SKP2 表达的药物联用后疗效是否会增加将为今后临床更好地使用 PMX 以及提高肺腺癌患者的化疗疗效提供重要的理论基础。

参考文献：

[1] Ishii T，Matsuse T，Masuda M，et al. The effects of S-phase kinase-associated protein 2（SKP2）on cell cycle status，viability，and chemoresistance in A549 lung adenocarcinoma cells[J]. Exp Lung Res，2004，30(8)：687-703.

[2] Ishii T，Fujishiro M，Masuda M，et al. Effects of p27Kip1 on cell cycle status and viability in A549 lung adenocarcinoma cells[J]. Eur Respir J，2004，23(5)：665-670.

[3] Takanami I. The prgnostic value of overexpression of Skp2 mRNA in non-small cell lung cancer[J]. Oncol Rep，2005，13(4)：727-731.

[4] Wu MF，Hsiao YM，Huang CF，et al. Genatic determinants of pemetrexed responsiveness and nonresponsiveness in non-small cell lung cancer cell[J]. J Thora Oncol，2010，5(8)：1143-1151.

[5] Bar-On O，Shapira M，Hershko DD. Differential effects of doxorubicin treatment on cell cycle arrest and skp2 expression in breast cancer cells[J]. Anticancer Drugs，2007，18(10)：1113-1121.

[6] Kudo Y，Kitajima S，Ogawa I，et al. Small interfering RNA targeting of S phase kinase-interacting protein 2 inhibits cell growth of oral cancer cells by inhibiting p27 degradation[J]. Mol Cancer Ther，2005，4(3)：471-476.

[7] Lee SH，McCormick F. Downregulation of Skp2 and p27/Kip1 synergistically induces apoptosis in T98G glioblastoma cells[J]. J Mol Med(Berl)，2005，83(4)：296-307.

[8] Yokoi S，Yasui K，Iizasa T，et al. TERC identified as a probable target within the 3q26 amplicon that is detected frequently in non-small cell lung cancers[J]. Clin Cancer Res，2003，9(13)：4705-4713.

[9] Jiang F，Caraway NP，Li R，et al. RNA silencing of S-phase kinase-interacting protein 2 inhibits proliferation and centrosome amplification in lung cancer cells[J]. Oncogene，2005，24(21)：3409-3418.

[10] Wouters A，Pauwels B，Lardon F，et al. In vitro study on the schedule-dependency of the interaction between pemetrexed，gemcitabine and irradiation in non-small cell lung cancer and head and neck cancer cells[J]. BMC Cancer，2010，10：441.

[11] Osoegawa A，Yoshino I，Tanaka S，et al. Regulation of p27 by S-phase kinase-associated protein 2 is associated with aggressiveness in non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol，2004，22(20)：4165-4173.

（收稿日期：2011-11-08 修回日期：2011-12-22）

（上接第 1613 页）

2009，5(10)：16-17.

[8] Dolcet X，Llobet D，Pallares J，et al. NF-κB in development and progression of human cancer[J]. Virchows Arch，2005，446(5)：475-482.

[9] Kim H，Lim JW，Seo JY，et al. Oxidant-sensitive transcription factor and cyclooxygenase-2 by Helicobacter pylori stimulation in human gastric cancer cells[J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol，2002，21(2)：121-129.

[10] Wu W，Yao DF，Qiu LW，et al. Characteristics of hepatic nuclear-transcription factor-kappa B expression and quantitative analysis in rat hepatocarcinogenesis[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int，2009，8(5)：504-509.

[11] Gasparian AV，Yao YJ，Lü J，et al. Selenium compounds inhibit I kappa B kinase(IKK) and nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in prostate cancer cells[J]. Mol Cancer Ther，2002，1(12)：1079-1087.

[12] 田芳，徐培荣，侯卫红，等. NF-κB 信号通路在食管鳞癌细胞系的激活[J]. 肿瘤防治研究，2006，33(1)：11-14.

[13] Kang MR，Kim MS，Kim SS，et al. NF-kappaB signalling proteins p50/p105，p52/p100，RelA，and IKKepsilon are over-expressed in oesophageal squamous cell carcinomas[J]. Pathology，2009，41(7)：622-625.

[14] Alwahaibi NY，Budin SB，Mohamed J，et al. Nuclear factor-kappa B as a promising target for selenium chemoprevention in rat hepatocarcinogenesis[J]. J Gastroentrol Hepatol，2010，25(4)：786-791.

[15] Sarkar FH，Li Y. NF-kappaB：a potential target for cancer chemoprevention and therapy [J]. Front Biosci，2008，13：2950-2959.

（收稿日期：2011-10-11 修回日期：2011-12-26）