

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.03.008

· 基础研究 ·

宫颈癌 HeLa 细胞内 SKP2 结合蛋白的筛选和功能预测

贾静, 方健飞, 任娟, 贾振宇, 王孝举 (浙江省医学科学院 分子医学中心, 浙江 杭州 310013)

[摘要] **目的:**通过免疫共沉淀与质谱分析技术从宫颈癌 HeLa 细胞中获取与 S 期激酶相关蛋白 2(S-phase kinase-associated protein 2, SKP2)结合的蛋白质群体并预测其生物功能。**方法:**以免疫共沉淀与 Western blotting 技术建立 SKP2 免疫共沉淀体系,以 SDS-PAGE 和银染技术获得 SKP2 结合蛋白的特异条带,通过质谱分析技术获得可能与 SKP2 结合的蛋白群体,应用生物信息学技术对筛选得到的蛋白进行 GO 分析与 KEGG 分析。**结果:**HeLa 细胞内存在一定水平的 SKP2 蛋白表达,可进行免疫共沉淀反应;成功建立了 SKP2 免疫共沉淀体系,并获得 SKP2 结合蛋白样品;针对差异的凝胶条带进行质谱分析,共鉴定出 SKP2 结合蛋白 563 个;设定筛选条件后,获得可信度较高的 SKP2 蛋白 270 个,进行 GO 分析与 KEGG 分析后初步预测了结合蛋白参与的细胞功能和信号通路。**结论:**从宫颈癌 HeLa 细胞中成功筛选获取 SKP2 结合蛋白,为后续筛选靶标结合蛋白和寻找细胞靶向药物奠定了基础。

[关键词] 细胞 S 期激酶相关蛋白 2;免疫共沉淀;宫颈癌;结合蛋白

[中图分类号] R737.33; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)03-0258-05

Screening of S-phase kinase-associated protein 2 in the cervical carcinoma HeLa cell

JIA Jing, FANG Jianfei, REN Juan, JIA Zhenyu, WANG Xiaoju (Center for Molecular Medicine, Academy of Medical Science of Zhejiang Province, Hangzhou 310013, Zhejiang, China)

[Abstract] Objective: The co-immunoprecipitation and mass spectrometric analysis was carried out to obtain the S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2)-binding proteins in HeLa cells, and the biological functions of these binding proteins were forecast. **Methods:** The co-immunoprecipitation system was established by co-immunoprecipitation and Western blotting assay; the specific protein gel of SKP2-binding proteins was obtained by SDS-PAGE and silver staining assay; the potential SKP2-binding proteins was identified by mass spectrometric analysis; and the GO (Gene ontology) analysis and KEGG analysis was carried out by bioinformatics technique. **Results:** The expression level of SKP2 protein in HeLa cells was high enough for co-immunoprecipitation assay; the co-immunoprecipitation system was established successfully, and SKP2-binding proteins was obtained; a total of 563 proteins were identified by mass spectrometric analysis, and 270 proteins with high credibility were obtained after screening. The GO analysis and KEGG analysis was carried out for the 270 proteins to forecast their functions and pathways. **Conclusion:** The SKP2-binding proteins were screened successfully, and it was the foundation for the subsequent screening of target-binding proteins and the search for targeting drugs.

[Key words] S-phase kinase-associated protein 2; co-immunoprecipitation; cervical cancer; binding-proteins

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(3): 258-262. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.03.008]

宫颈癌是许多发展中国家女性最常见的肿瘤,发病率为全世界妇科肿瘤的第 3 位。由于发病年轻化,宫颈癌又称为“红颜杀手”,对家庭和社会造成了严重负担。中国宫颈癌发病率居世界第 2 位,每年约有 13.2 万新发病例,占世界宫颈癌新发病例总数的 28%。目前不少早期发现的宫颈癌患者仍然会进展成浸润性肿瘤,且国内宫颈癌主要治疗手段为放射治疗和手术切除,复发率高。因此,寻找简便有效的治疗手段,降低宫颈癌病死率与复发率,是宫颈癌研究亟待解决的问题^[1]。近年来,肿瘤靶向药物是肿瘤生物治疗的研究热点,已有很多肿瘤分子靶向治疗药物研制成功,并获美国 FDA 批准上市。但通常这

些靶向性药物靶点单一,受患者依从性和给药途径影响很大,同时也不可避免对患者正常组织造成损伤。因此寻找多靶点特异性药物,且将副作用降至

[基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目(No.LY18H160067, LQ12H16013);浙江省医药卫生科技计划资助项目(No.2015KYB090, 2011KYB005)。Project supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province(No.LY18H160067, LQ12H16013), and the Zhejiang Provincial Medical and Healthy Foundation for Science and Technology Program(No.2015KYB090, 2011KYB005)

[作者简介] 贾静(1981-),女,博士,副研究员,主要从事肿瘤早期诊断与靶向药物的研究, E-mail:jjajingzjams@163.com

[通信作者] 王孝举(WANG Xiaoju, corresponding author),博士,研究员,硕士生导师,主要从事肿瘤转化医学的研究, E-mail:wang.x.george@gmail.com

最低, 成为肿瘤靶向药物研究开发的重心。细胞 S 期激酶相关蛋白 2 (S-phase kinase-associated protein 2, SKP2) 与肿瘤的发生发展关系密切, 是肿瘤药物研究的热点靶标^[2]。SKP2 蛋白表达水平在宫颈癌组织中显著升高, 且与宫颈癌进展密切相关^[3]。在 HPV 16/18 感染引起的宫颈鳞癌内, SKP2 通过 E7-SKP2-Rb 信号途径参与肿瘤的进展和恶化。有研究^[4-5]显示, 通过对 DNA 拷贝和基因表达的整合分析, 筛选出宫颈癌的若干分子靶标, 其中包括 SKP2 基因。本课题拟通过免疫共沉淀与质谱分析技术, 获取与 SKP2 结合的蛋白质, 以便为后期寻找 SKP2 靶向药物, 或多肽, 开发治疗宫颈癌的新型小分子靶向药物提供结构基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

宫颈癌 HeLa 细胞株购自上海细胞库。DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司, 胰酶购自 Sigma 公司, 鼠抗 SKP2 抗体购自 Invitrogen 公司, 兔抗 cyclin A 抗体购自 CST 公司, 兔抗 SKP2 抗体、蛋白 A/G 琼脂糖珠子购自 Santa Cruz 公司, 10×RIPA 细胞裂解液购自 Millipore 公司, 蛋白酶抑制剂购自罗氏公司, 银染试剂盒购自 Invitrogen 公司。

1.2 细胞培养

HeLa 细胞培养于 60 mm 培养皿内, 使用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 置于 37 °C、5%CO₂ 孵育箱培养。待细胞汇合至 90% 时, 吸出培养基, PBS 润洗 2 次后, 0.25% 胰酶消化, 并 1 500×g 离心 3 min 收集 HeLa 细胞, 再次 PBS 润洗后, 加入 500 μl RIPA 细胞裂解液裂解。

1.3 Western blotting 检测 HeLa 细胞内 SKP2 蛋白含量

30 μl 蛋白样品与 7 μl 5×蛋白上样缓冲液混匀, 煮沸 5 min 变性, 10% SDS-PAGE 分离各蛋白, 半干转膜法将蛋白条带转移到 PVDF 膜上。PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉 PBST 溶液封闭 30 min 后, 加入含 3% 脱脂奶粉和 PBST 溶液 1:500 稀释的一抗鼠抗 SKP2 抗体, 4 °C 过夜孵育后, PBST 洗 3 遍, PBST 溶液 1:2 000 稀释辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 二抗, 室温孵育 30 min, 膜上滴加 1 ml ECL 化学发光检测试剂, 化学发光成像仪捕获图像。

1.4 免疫共沉淀反应制备 SKP2 结合蛋白群体

HeLa 细胞采用 RIPA 细胞裂解液裂解后, 12 000×g 离心 15 min, 丢弃沉淀, 采用 BCA 法检测裂解上清内蛋白含量。取含 500 μg 总蛋白的裂解上清, RIPA 细胞裂解液调整体积为 500 μl。上清中加入 1 μg 兔抗 SKP2 抗体或鼠抗 SKP2 抗体(对照组加

入 1 μg 兔 IgG 或鼠 IgG), 4 °C 过夜孵育, 再加入 30 μl protein A 4 °C 孵育 3 h 后, 3 500×g 离心 3 min 收集沉淀丢弃上清, PBS 洗涤沉淀 3 次。洗涤结束后, 加入 30 μl loading buffer(2×), 煮沸样品 5 min, 4 °C、13 000×g 离心 2 min 取得上清, -20 °C 储存备用。Cyclin A 是已知的可与 SKP2 结合的蛋白, 用于作为 SKP2 免疫共沉淀反应的阳性对照。采用 Western blotting, 利用鼠抗 SKP2 抗体与兔抗 cyclin A 抗体检测免疫共沉淀样品内的 SKP2 蛋白与 cyclin A 蛋白, 以验证 SKP2 免疫共沉淀方法的建立。

1.5 硝酸银染色试验筛选 SKP2 结合蛋白条带

免疫共沉淀反应获得的 30 μl SKP2 结合蛋白样品及 IgG 对照样品, 通过 7.5% SDS-PAGE 分离各蛋白条带。电泳结束后, 将 PAGE 电泳胶置于 100 ml 固定液(50 ml 乙醇、10 ml 乙酸、40 ml Millipore 超纯水混合均匀)中固定 20 min, 采用 Invitrogen 硝酸银染色试剂盒, 按照试剂盒说明书操作, 对 PAGE 胶进行硝酸银染色, 以筛选 SKP2 免疫共沉淀样品与对照样品的差异条带。从银染胶上切下 SKP2 免疫共沉淀样品泳道内有而 IgG 对照样品泳道内无的差异条带, 送至华大基因公司进行质谱分析。

1.6 生物信息学技术初步分析 SKP2 各结合蛋白的生物学功能及相互关系

采用 R 软件对质谱分析结果进行数据提取和分析, 采用 Barplot 和 Plot 函数将实验组与对照组的 SKP2 结合蛋白以可视化的形式呈现。为避免过高的假阳性, 本实验对华大基因公司质谱分析鉴定出的蛋白, 设定进一步筛选条件为肽段数大于 3, 且评分大于 60。收集符合筛选条件的蛋白, 采用 DAVID 软件对差异蛋白进行基因本体论(Gene ontology, GO)分析和 KEGG 分析。对差异蛋白进行 GO 富集分析, 以了解差异蛋白富集的生物学功能、途径或细胞定位。从生物学过程、细胞组分、分子功能三个方面进行 GO 分析, 并设定 $P < 0.05$ 且富集蛋白数占总蛋白数的百分率不低于 10% 作为筛选条件, 筛选结果中每组选取有代表性的 10 个 GO 分类作图。对差异蛋白进行 Pathway 分析以了解 SKP2 结合蛋白参与的代谢通路^[6-7]。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HeLa 细胞内存在一定水平的 SKP2 蛋白表达

采用 Western blotting 检测结果(图 1)显示, 在 45 000 附近有一条明显的蛋白条带, 与 SKP2 相对分子质量相符, 说明该条带可能为 SKP2 蛋白条带。在 34 000 附近的条带与内参 GAPDH 相对分子质量大小相符, 为 GAPDH 蛋白条带。结果表明 HeLa 细胞

内存在 SKP2 蛋白表达,且蛋白表达水平可进行后续的免疫共沉淀反应。

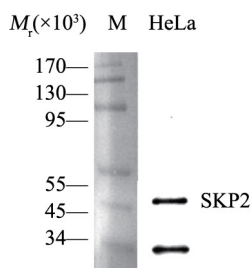


图1 HeLa细胞内的SKP2蛋白表达水平

Fig. 1 The expression levels of SKP2 protein in HeLa cells

2.2 从HeLa细胞中成功获得SKP2结合蛋白样品

将兔抗SKP2与鼠抗SKP2抗体进行免疫共沉淀反应,将HeLa细胞裂解液内的SKP2蛋白以及与SKP2结合的蛋白沉淀出来,获得的免疫共沉淀样品,采用Western blotting检测SKP2蛋白与cyclinA蛋白,并进行验证。结果表明,免疫共沉淀样品在45 000附近有一特异蛋白条带,与SKP2蛋白相对分子质量大小相符,而对照样品内无此条带,与预期相符(图2A),说明免疫共沉淀试验成功地通过SKP2特异抗体富集HeLa细胞裂解液内SKP2蛋白。免疫共沉淀样品在55 000附近有特异的蛋白条带,与cyclin A相对分子质量相同,对照样品内无此条带,与预期相符(图2B),说明免疫共沉淀试验成功地通过富集SKP2蛋白进而富集与SKP2结合的cyclin A蛋白。使用免疫共沉淀方法可成功地富集HeLa细胞裂解液内的SKP2蛋白及与SKP2结合蛋白,这一结果表明已成功建立SKP2免疫共沉淀体系,且通过该体系可获得SKP2结合蛋白样品。

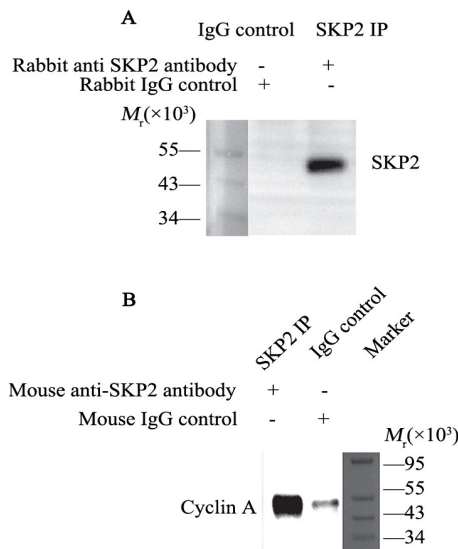
2.3 从SKP2结合蛋白中鉴定出563个蛋白

SKP2免疫共沉淀样品与对照样品进行SDS-PAGE并银染后,可见2条差异条带(图3)分别位于72 000~95 000、95 000~130 000处。对差异条带进行质谱分析,共鉴定出蛋白563个,分布于144个信号通路,参与转录、翻译、DNA修饰等20多种细胞功能。

2.4 SKP2结合蛋白参与多种细胞功能和信号通路

华大基因公司质谱分析鉴定出563个蛋白,其中270个蛋白符合设定的筛选条件:GO分析和Pathway分析结果如图4所示,SKP2结合蛋白参与的生物学过程包括翻译后修饰、细胞代谢相关、RNA与病毒处理等,参与的细胞组分包括细胞核、细胞质、外泌体、细胞囊泡、蛋白复合体等,参与的分子功能包括细胞黏附、分子结合、核酸结合、蛋白结合以及与磷酸化组分结合等。Pathway分析结果显示,SKP2

结合蛋白参与的细胞信号通路包括TCA循环、内质网内蛋白处理、RNA降解与转运、糖类和碳的代谢、碱基切除修复、DNA复制等。



A: SKP2; B: SKP2 bind cyclin A

图2 免疫共沉淀法获取SKP2结合蛋白

Fig. 2 The SKP2-binding proteins were obtained by co-immunoprecipitation assay

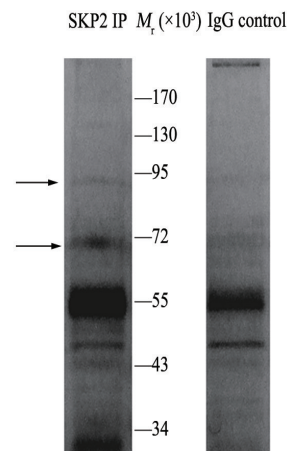


图3 硝酸银染色法鉴定SKP2结合蛋白

Fig. 3 SKP2-binding proteins were identified by silver nitrate staining

3 讨论

SKP2蛋白的主要生物学功能是作为E3泛素化连接酶SCF复合体的底物识别亚基,特异性识别磷酸化底物蛋白并介导其泛素化,使底物蛋白被26S蛋白酶降解。由于某些肿瘤抑制因子也是SKP2的作用底物,可通过泛素化途径被蛋白酶降解,因此SKP2也是一种癌基因。SKP2参与多种肿瘤发生的病理过程,并与肿瘤转移和预后密切相关^[8-9]。有报道^[10-13]认

为 SKP2 可作为肿瘤预后的标志物和肿瘤治疗的靶点药物, 已有若干靶向 SKP2 的小分子药物正积极进行药效与药理学研究。本研究基于 SKP2 的重要生物学功能, 试图通过免疫共沉淀与质谱分析方法筛选 SKP2 结合蛋白, 以便深入研究 SKP2 的生物学功

能, 并分离 SKP2 结合短肽作为设计小分子药物的结构基础。本实验筛选结果包含已知和未知的 SKP2 结合蛋白, 可为筛选 SKP2 靶向多肽提供更多的选择空间, 并为揭示 SKP2 未知的生物学功能提供可能性。

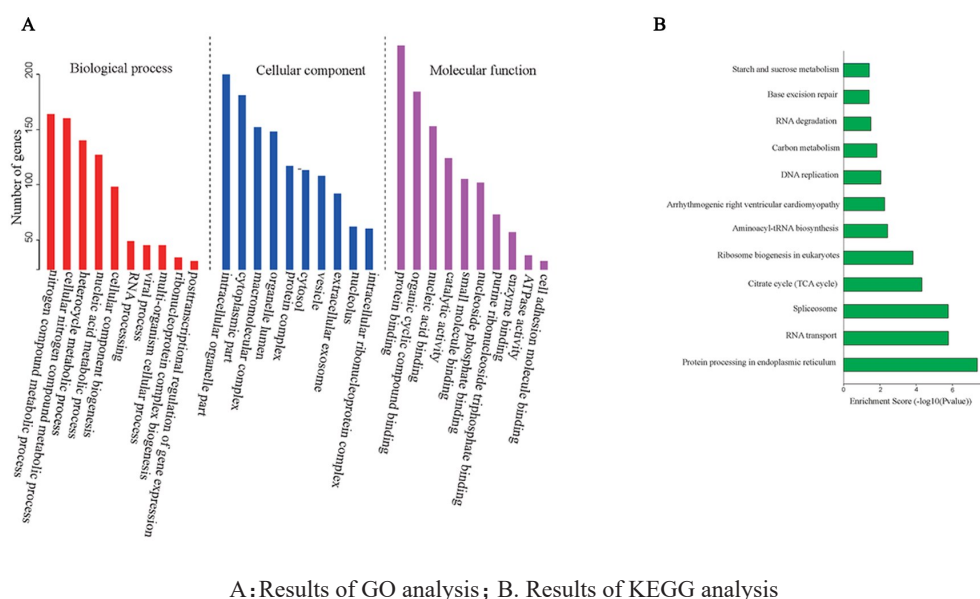


图4 生物信息学方法分析 SKP2 结合蛋白参与的多种细胞功能和信号通路

Fig. 4 The cellular functions and signaling pathways involved in SKP2 binding proteins analysed by bioinformatics

SKP2 作为 PI3K/AKT, mTOR、ERK、NF κ B、Ras/MAPK、IGF 等多个肿瘤相关信号通路的组分, 可同时介导多个信号通路之间的信号交联, 参与肿瘤的发生发展。本实验 GO 分析和 Pathway 分析结果表明, SKP2 结合蛋白广泛地参与了细胞增殖、细胞代谢等多个细胞生命活动, 且与多个细胞信号通路相关, 与已知的 SKP2 生物学特性相一致^[14-17]。

本实验不足之处是对于 SKP2 结合蛋白的初筛, 采用多克隆抗体进行免疫共沉淀检测, 难免会因为抗体的特异性不够好而导致非特异性吸附的存在, 从而使质谱分析存在筛选出假阳性结果的可能。虽然本实验为尽可能去掉假阳性结合蛋白, 给预期的结合蛋白设定了筛选条件, 但是仍无法保证所获得的蛋白群体中无非特异性结合蛋白。其次, 通过免疫共沉淀技术获得的结合蛋白, 有直接结合蛋白, 也有间接结合蛋白, 本实验技术尚无法区分所获得的结合蛋白与 SKP2 是直接结合还是间接结合。因此, 在后续实验中, 首先要根据功能挑选感兴趣的结合蛋白, 采用特异性更好的单克隆抗体, 通过免疫共沉淀等技术方法, 验证该蛋白与 SKP2 的结合关系, 并通过分子生物学技术寻找两个蛋白的结合位点, 才能确证该蛋白与 SKP2 的直接结合关系, 从而进行生物学功能与药物靶点研究。

[参考文献]

- [1] LI S, HU T, LV W G, et al. Changes in prevalence and clinical characteristics of cervical cancer in the People's Republic of China: a study of 10,012 cases from a nationwide working group[J]. *Oncologist*, 2013, 18 (10): 1101-1107. DOI: 10.1634/theoncologist.2013-0123.
- [2] QIU L, LV J, CHEN Y, et al. Expression of SKP2 and p27(kip1) proteins in hypopharyngeal squamous cell carcinoma and its clinical significance[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10 (6): 3756-3760. DOI: 10.3892/ol.2015.3799.
- [3] FU H C, YANG Y C, CHEN Y J, et al. Increased expression of SKP2 is an independent predictor of locoregional recurrence in cervical cancer via promoting DNA-damage response after irradiation[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 44047-44061. DOI: 10.18632/oncotarget.10057.
- [4] CHEN T P, CHEN C M, CHANG H W, et al. Increased expression of SKP2 and phospho-MAPK/ERK1/2 and decreased expression of p27 during tumor progression of cervical neoplasms[J]. *Gynecologic Oncol*, 2007, 104(3): 516-523. DOI: 10.1016/j.ygyno.2006.09.015.
- [5] NARAYAN G, MURTY V V. Integrative genomic approaches in cervical cancer: implications for molecular pathogenesis[J]. *Future oncology*, 2010, 6(10): 1643-1652. DOI: 10.2217/fon.10.114.
- [6] HARRIS M A, CLARK J, IRELAND A, et al. The gene ontology (GO) database and informatics resource[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(suppl 1): D258-261. DOI: 10.1093/nar/gkh036.
- [7] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and

- genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28 (1): 27-30. DOI: 10.7717/peerj.1991/supp-10.
- [8] WANG G, CHAN C H, GAO, et al. Novel roles of Skp2 E3 ligase in cellular senescence, cancer progression, and metastasis[J]. *Chin J Cancer*, 2012, 31 (4): 169-177. DOI: 10.5732/cjc.011.10319.
- [9] WEI Z, JIANG X, LIU F, et al. Downregulation of SKP2 inhibits the growth and metastasis of gastric cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(1): 181-192. DOI: 10.1007/s13277-012-0527-8.
- [10] MORROW J K, LIN H K, SUN S C, et al. Targeting ubiquitination for cancer therapies[J]. *Future Med Chem*, 2015, 7 (17): 2333-2350. DOI: 10.4155/fmc.15.148.
- [11] OH M, LEE J H, MOON H, et al. A chemical inhibitor of the Skp2/p300 interaction that promotes p53-mediated apoptosis[J]. *Ange wandte Chemie*, 2016, 55 (2): 602-606. DOI: 10.1002/anie.2015 08716.
- [12] CHAN C H, MORROW J K, LI C F, et al. Pharmacological inactivation of SKP2 SCF ubiquitin ligase restricts cancer stem cell traits and cancer progression[J]. *Cell*, 2013, 154 (3): 556-558. DOI: 10.1016/j.cell.2013.06.048.
- [13] UNGERMANNOVA D, LEE J, ZHANG G, et al. High-throughput screening alpha screen assay for identification of small-molecule inhibitors of ubiquitin E3 ligase SCFSkp2-Cks1[J]. *J Biomolecular Screening*, 2013, 18 (8): 910-920. DOI: 10.1177/1087057 113485789.
- [14] CHAN C H, LI C F, YANG W L, et al. The Skp2-SCF E3 ligase regulates Akt ubiquitination, glycolysis, herceptin sensitivity, and tumorigenesis[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1098-1111. DOI: 10.1016/j.cell.2012.10.025.
- [15] LU H, CAO X, ZHANG H, et al. Imbalance between MMP-2, 9 and TIMP-1 promote the invasion and metastasis of renal cell carcinoma via SKP2 signaling pathways[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35 (10): 9807-9813. DOI: 10.1007/s13277-014-2256-7.
- [16] BHATTACHARYA S, GARRIGA J, CALBO J, et al. SKP2 associates with p130 and accelerates p130 ubiquitylation and degradation in human cells[J]. *Oncogene*, 2003, 22 (16): 2443-2451. DOI: 10.1038/sj.onc.1206339.
- [17] HUANG H, SONG Y, WU Y, et al. Erbin loss promotes cancer cell proliferation through feedback activation of Akt-Skp2-p27 signaling [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(3): 370-376. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.05.071.

[收稿日期] 2017-12-16

[修回日期] 2018-01-23

[本文编辑] 韩丹