

熊代刚,侯泽宇,蔡玉怀,等. 过表达 *JAZF1* 对甲状腺乳头状癌 BCPAP 细胞增殖、凋亡的影响及其机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9): 55-60.

Xiong DG, Hou ZY, Cai YH, et al. Effect of *JAZF1* overexpression on proliferation and apoptosis in papillary thyroid carcinoma BCPAP cells and its mechanism [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(9): 55-60.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.09.008

过表达 *JAZF1* 对甲状腺乳头状癌 BCPAP 细胞增殖、凋亡的影响及其机制

熊代刚¹,侯泽宇¹,蔡玉怀¹,黄亮亮¹,杨 艳²,曾 峰¹,程晓明^{1*}

(1.遵义医学院附属医院乳腺甲状腺疾病诊疗中心,贵州 遵义 563000; 2.遵义医学院附属医院医学检验科,贵州 遵义 563000)

【摘要】 目的 探讨相互并列的锌指基因 1(juxtaposed with another zinc finger gene 1,*JAZF1*)对甲状腺乳头状癌(papillary thyroid cancer,PTC)BCPAP 细胞增殖、凋亡的影响及可能的作用机制。**方法** 采用重组腺病毒 Adv-*JAZF1*-GFP、Adv-GFP 分别感染 BCPAP 细胞,分为阴性对照组(NC 组)、空载组(Adv-GFP 组)、实验组(Adv-*JAZF1*-GFP 组),感染 48 h 后分别提取各组细胞总 RNA、蛋白,采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)、Western blot 检测 *JAZF1* mRNA、蛋白表达水平,MTT、克隆形成实验检测细胞生长及增殖能力,流式细胞术 annexin V-FITC/PI 双染检测各组细胞凋亡情况,Western blot 检测分析 Bcl-2、Bax、PPAR- γ 、PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达水平。**结果** 与阴性对照组、空载组比较,实验组 *JAZF1* mRNA、蛋白表达水平均明显上调($P<0.001$),且随时间增殖能力明显抑制($P<0.01$),克隆形成能力降低($P<0.001$);流式 annexin V-FITC/PI 双染检测结果显示实验组细胞凋亡率[(23.02 $\pm$ 0.35)%]较 NC 组[(8.63 $\pm$ 0.40)%]、空载组[(7.95 $\pm$ 0.32)%]均明显增加($P<0.001$);Western blot 结果显示实验组 Bcl-2 表达较 NC 组、空载组明显下调 66.0%($P<0.001$),Bax 表达明显上调 64.8%($P<0.001$),并显著降低 p-PI3K/PI3K、pAkt/Akt 比值($P<0.001$)。**结论** *JAZF1* 通过调控 Bcl-2/Bax 通路促进细胞凋亡,并且调控 PI3K/Akt 信号通路抑制 BCPAP 细胞增殖,从而在甲状腺乳头状癌的发展进程中可能发挥重要作用。

【关键词】 *JAZF1*;甲状腺乳头状癌;增殖;凋亡;信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 09-0055-06

Effect of *JAZF1* overexpression on proliferation and apoptosis in papillary thyroid carcinoma BCPAP cells and its mechanism

XIONG Daigang¹, HOU Zeyu¹, CAI Yuhuai¹, HUANG Liangliang¹, YANG Yan², ZENG Feng¹, CHENG Xiaoming^{1*}

(1. Medical Center of Breast and Thyroid Diseases, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China.

2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of juxtaposed with another zinc finger 1 (*JAZF1*) on proliferation and apoptosis of papillary thyroid carcinoma (PTC) BCPAP cells and its possible mechanism. **Methods** BCPAP cells were divided into negative control group (NC group), Adv-GFP group and Adv-*JAZF1*-GFP group, which were not infected or infected with recombinant adenoviruses Adv-GFP or Adv-*JAZF1*-GFP, respectively. The total RNA and protein of each

[基金项目] 贵州省科技合作项目(黔科合 LH 字[2015]7489);遵义市红花岗区科技项目([2017]19);遵义医学院硕士启动基金项目(院字[2018]40)。

[作者简介] 熊代刚(1993—),男,硕士研究生,研究方向:甲状腺癌与乳腺癌基础与临床研究。E-mail: xionгдаigang@163.com

[通信作者] 程晓明(1964—),女,教授,主任医师,研究方向:甲状腺癌与乳腺癌基础与临床研究。E-mail: cxm1688@sina.com

group were extracted 48 h after infection. The relative *JAZF1* mRNA and protein expressions were determined by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting, and the growth and proliferation of cells were examined by the MTT and clone formation assays. Annexin V-FITC/PI double staining was used to determine the apoptosis of cells in each group by flow cytometry. The relative protein expressions of Bcl-2, Bax, PPAR- γ , PI3K, Akt and p-Akt were determined by Western blotting. **Results** Compared with the NC and Adv-GFP groups, the relative *JAZF1* mRNA and protein expression in the experimental group was significantly upregulated ($P < 0.001$), the proliferation ability was significantly inhibited ($P < 0.01$), and the clone formation ability was decreased ($P < 0.001$). The Annexin V-FITC/PI double staining results showed that the apoptosis rate of the Adv-*JAZF1*-GFP group ($23.02 \pm 0.35\%$) was significantly increased than the NC group ($8.63 \pm 0.40\%$) and the Adv-GFP group ($7.95 \pm 0.32\%$) ($P < 0.001$). Compared with NC and Adv-GFP groups, the expression level of Bcl-2 was significantly downregulated by 66.0% and the expression of Bax was upregulated by 64.8% in the Adv-*JAZF1*-GFP group ($P < 0.001$). Furthermore, the p-PI3K/PI3K and pAkt/Akt ratios were significantly decreased in the experimental group compared with the controls ($P < 0.001$). **Conclusions** *JAZF1* may play an important role in the development of papillary thyroid cancer by regulating the Bcl-2/Bax pathway to promote apoptosis and by regulating the PI3K/Akt signaling pathway to inhibit the proliferation of BCPAP cells.

[Keywords] *JAZF1*; thyroid papillary carcinoma; proliferation; apoptosis; signaling pathway

甲状腺癌(thyroid carcinoma, TC)是目前最常见的内分泌系统肿瘤,近年来其在全球的发病率持续上升,TC 病理分型主要包括分化型甲状腺癌(differentiated thyroid carcinoma, DTC)、未分化型甲状腺癌(anaplastic thyroid cancer, ATC)、髓样癌(medullary thyroid carcinoma, MTC),其中乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)属于分化型甲状腺癌,是目前临床上最常见的类型,多数预后较好,但仍有部分患者复发率高、预后差。随着对甲状腺癌分子发病机制的深入研究,癌基因扩增或抑癌基因表达或功能障碍在 TC 发病中的不断认识,更多关于 TC 分子诊断、靶向治疗的分子研究被关注。*JAZF1*(juxtaposed with another zinc finger protein 1)又名孤儿核受体 TAK1 相互作用蛋白 27(TAK1-interacting protein 27, Tip27),研究报道 *JAZF1* 参与子宫内膜间质肉瘤^[1, 2]、前列腺癌^[3]、非 HBV 及非 HCV 相关肝细胞癌^[4]的进展,可能是抑癌基因。本课题组前期研究^[5]发现 *JAZF1* 在甲状腺癌组织中表达相对良性甲状腺结节、癌旁组织明显下调,提示 *JAZF1* 可能参与了 TC 的发展,但具体机制不清楚。本研究将在甲状腺乳头状癌细胞 BCPAP 中过表达 *JAZF1*,探讨 *JAZF1* 对 BCPAP 细胞增殖、凋亡的生物学作用及可能机制,从而为 PTC 的分子靶向治疗提供新思路。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人甲状腺乳头状癌 BCPAP 细胞购自中科院上海干细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

胎牛血清(FBS)、RPMI 1640、非必需氨基酸(NEAA)、丙酮酸钠、谷氨酰胺购至 Gibco 公司;RNA 提取试剂盒、qRT-PCR 试剂购自 TaKaRa 公司;GAPDH 购自华安生物技术有限公司;PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 购自 CST 公司;全蛋白提取试剂盒、MTT 试剂盒购自索莱宝科技有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自雅酶生物科技有限公司;Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自凯基生物。FACS Aria II 流式细胞仪购自美国 BD 公司;ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司;Gel Doc XR+凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养与转染

BCPAP 细胞采用含 10% FBS、1% NEAA、1% 丙酮酸钠、1% 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基、置于 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。细胞传至第 6 代且处于对数生长期,Adv-GFP、Adv-*JAZF1*-GFP 分别感染 BCPAP 细胞,分为阴性对照组、空载组(Adv-GFP)、实验组(Adv-*JAZF1*-GFP),转染 48 h 后收集各组细胞,各实验重复 3 次。

1.3.2 MTT 检测细胞增殖活性

收集对数生长期细胞制备细胞悬液并接种于 96 孔板,每孔细胞悬液 10^3 个/200 μ L, 37℃、5% CO₂ 培养过夜,次日转染 Adv-GFP/Adv-*JAZF1*-GFP,继续培养 24 h、48 h、72 h,各时间点吸去上清,加入 90 μ L 新鲜完全培养基,再加入 10 μ L MTT 溶液,继续培养 4 h,然后弃上清,各孔加入 110 μ L Formazan 溶解液,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶

物充分溶解,在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔吸光度值,同时设置调零孔、对照组,每组设定至少 3 个复孔。

1.3.3 平板克隆形成实验

将对数生长期细胞接种于 6 cm 培养皿,调整每皿细胞数为 10^3 个,每皿加入 3 mL 细胞完全培养基,混匀使细胞分布均匀静置于培养箱中培养,每 2 d 换一次液,14 d 后出现肉眼可见的克隆,弃培养基后固定 15 min,染色 20 min,PBS 漂洗 3 次,显微镜下计数细胞克隆数,并根据公式:克隆形成效率=克隆数量/接种细胞数量 $\times 100\%$,分别计算各组细胞克隆形成效率。

1.3.4 流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 检测各组细胞凋亡

将细胞接种于 6 孔板,转染后 48 h,用不含 EDTA 的胰酶消化并收集细胞,PBS 洗涤细胞 2 次,加入 500 μ L 的 binding buffer 重悬细胞,再加入 5 μ L 的 annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μ L 的碘化丙啶(propidium iodide),混匀,室温避光反应 15 min,流式细胞仪检测分析。

1.3.5 qRT-PCR 检测

转染 48 h 后,分别提取各组细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA,采用 SYBR-Green I 法、ABI 7500、qRT-PCR 二步法检测 *JAZF1* mRNA 的表达水平,以 *GAPDH* 作为内参,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值表示基因相对表达量。所用引物:*GAPDH*:上游 5'-GGAGCGAGATCCTCCAAAAT-3',下游 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3';*JAZF1*:上游 5'-CACGCCACAGCAGTGGAAGC-3',下游 5'-AGCAGTGGGAAGCCTTACTCC-3'。

1.3.6 Western blot 法检测各组细胞蛋白的相对表达水平

转染 48 h 后,采用全蛋白提取试剂盒提取各组细胞总蛋白,BCA 法定量各蛋白浓度,调整各蛋白浓度使电泳时上样量与体积一致,蛋白变性后,每个泳道上样量 20 μ g,10% SDS-PAGE 电泳并 4℃ 湿转过夜,封闭、洗膜、一抗(Bcl-2、Bax、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt)4℃ 孵育过夜、洗膜、二抗室温孵育 1 h,洗膜并显色成像,以 *GAPDH* 作为内参,采用 Image J 软件比较条带灰度值与灰度比即半定量各蛋白质含量。

1.4 统计学方法

各实验数据采用 SPSS 22.0 软件进行分析,结果以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异用单因素方差分析, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

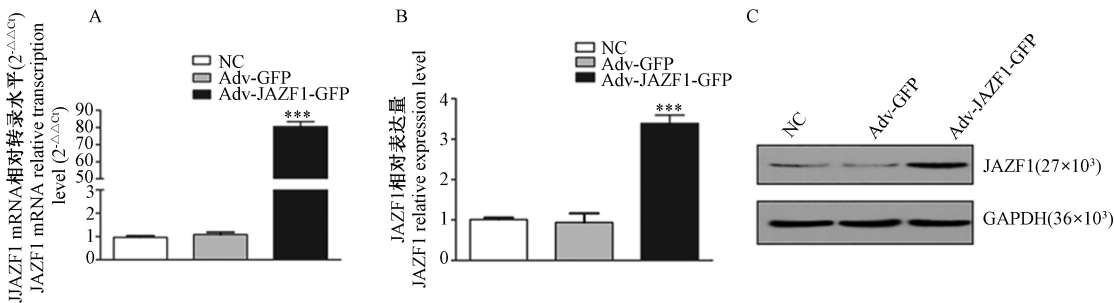
2 结果

2.1 *JAZF1* 在 BCPAP 细胞中形成过表达

Adv-GFP、Adv-*JAZF1*-GFP 转染 BCPA 细胞 48 h 后,NC 组与空载组比较无明显统计学差异,实验组 *JAZF1* mRNA、蛋白相对表达水平均较 NC 组、空载组明显上调(mRNA: $P<0.001$;蛋白: $P<0.001$),见图 1。

2.2 过表达的 *JAZF1* 对 BCPAP 细胞增殖及集落形成能力的影响

MTT 结果提示过表达的 *JAZF1* 在 24 h、48 h、72 h 明显抑制 BCPAP 细胞增殖(均 $P<0.01$);平板克隆形成实验表明实验组克隆形成效率较 NC 组、空载组明显降低(均 $P<0.001$),见图 2。



注:与 NC 组相比,*** $P<0.001$ 。

图 1 qRT-PCR、Western blot 检测各组 BCPAP 细胞 *JAZF1* mRNA、蛋白相对表达水平

Note. Compared with the negative control group, *** $P<0.001$.

Figure 1 Relative expression levels of *JAZF1* and *JAZF1* mRNA in each group of BCPAP cells assessed by qRT-PCR and Western blot assay

2.3 上调 JAZF1 对 BCPAP 细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC/PI 法流式细胞术检测结果显示:实验组细胞凋亡率较 NC 组、空载组明显增加 ($23.02\pm0.35\%$ vs. $8.63\pm0.40\%$, $7.95\pm0.32\%$, 均 $P<0.001$), 见图 3。

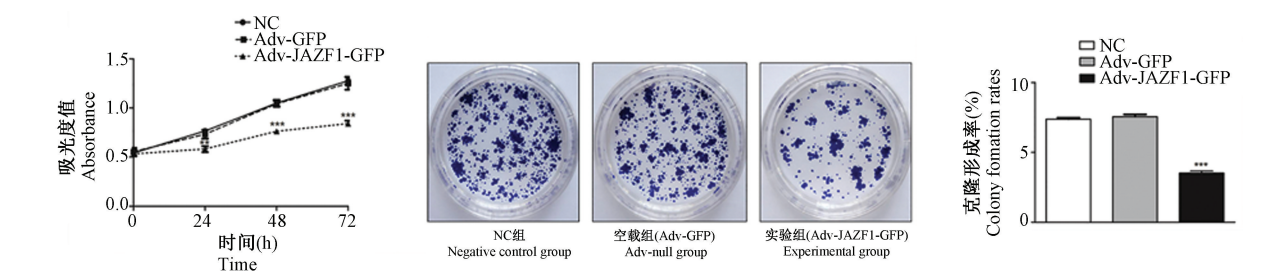
2.4 过表达的 JAZF1 对 Bcl-2/Bax 信号通路的调控作用

Western blot 实验结果表明:实验组 Bcl-2 蛋白相对表达水平明显下调,较 NC 组降低了 66.0% (P

<0.001), Bax 相对蛋白表达水平明显上调,较 NC 组增加了 64.8% ($P<0.001$), NC 组与 Adv-GFP 组无统计学差异 (均 $P>0.05$) 见图 4。

2.5 过表达的 JAZF1 对 PI3K/Akt 信号通路的影响

Western blot 实验结果发现过表达的 JAZF1 抑制 BCPAP 细胞 p-PI3K、p-Akt 蛋白相对表达水平 (均 $P<0.001$), 能明显下调 p-PI3K/t-PI3K、pAkt/t-Akt 的比值 ($P<0.001$), 见图 5。



注:与 NC 组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。
图 2 JAZF1 过表达对各组 BCPAP 细胞增殖、克隆形成能力的影响

Note. Compared with the negative control group, * $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 2 Effect of JAZF1 overexpression on the proliferation and clone formation of BCPAP cells in each group

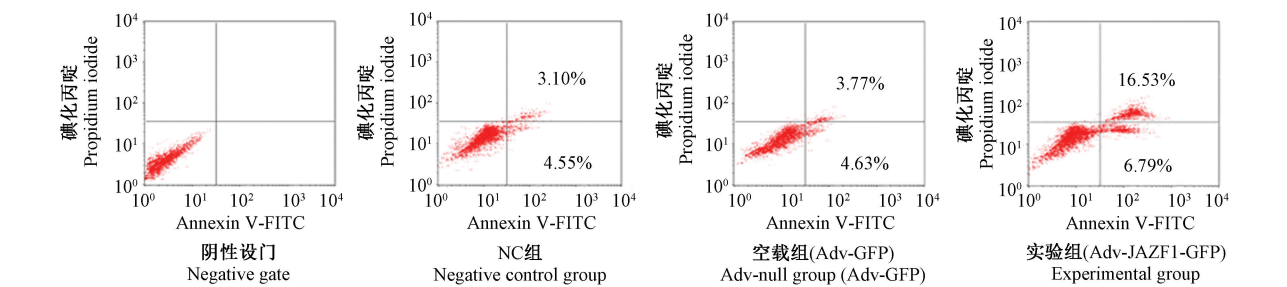
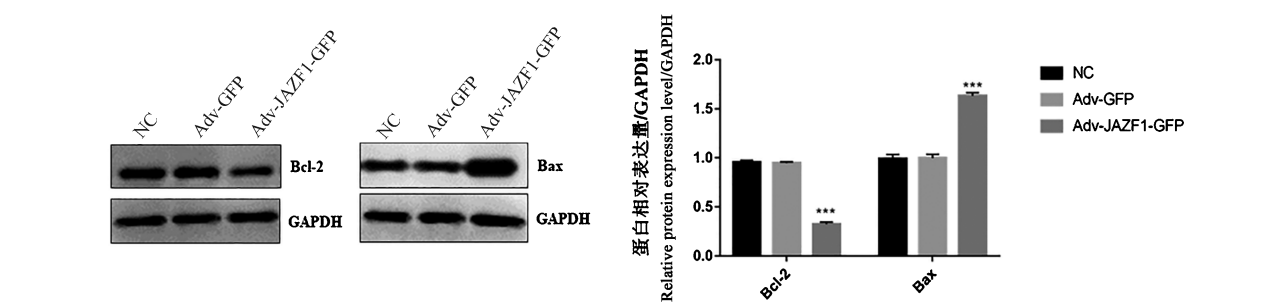


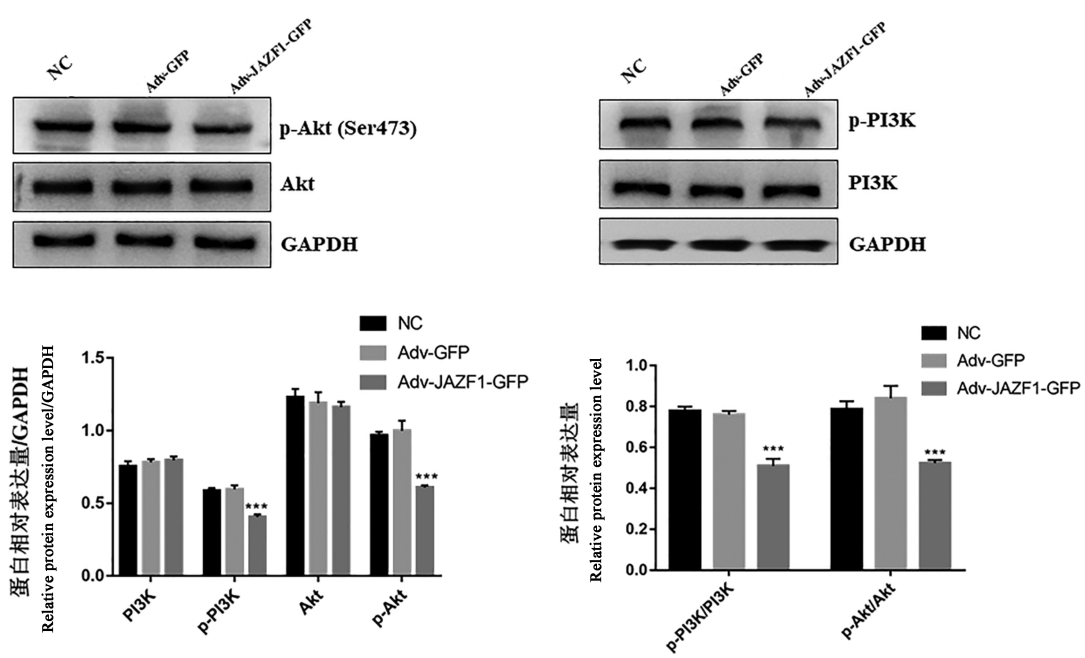
图 3 JAZF1 过表达对各组 BCPAP 细胞凋亡的影响
Figure 3 Effect of JAZF1 overexpression on apoptosis in the BCPAP cells in each group



注:与 NC 组相比, *** $P<0.001$ 。
图 4 过表达的 JAZF1 对 Bcl-2/Bax 信号通路的影响

Note. Compared with the negative control group, *** $P<0.001$.

Figure 4 Effect of JAZF1 overexpression on the Bcl-2/Bax signaling pathway



注:与 NC 组相比,*** $P<0.001$ 。

图 5 过表达的 JAZF1 对 PI3K/Akt 信号通路的影响

Note. Compared with the negative control group, *** $P<0.001$.

Figure 5 Effect of JAZF1 overexpression on the PI3K/Akt signaling pathway

3 讨论

JAZF1 是核孤儿受体 TAK1 的竞争抑制因子,包含三个假定的锌指基序和一个富含谷氨酸/天冬氨酸的区域,研究推测 JAZF1 中锌指结构域和富含谷氨酸/天冬氨酸的区域可能在 TAK1-JAZF1 复合物募集其他核蛋白中起作用^[6]。既往研究表明 JAZF1 调控糖、脂代谢^[7]、胰岛素抵抗^[8],其变异体参与前列腺癌、子宫内膜间质肉瘤的发生与发展。由于 TAK1 的转录活性依赖于细胞类型,可能存在正调控或负调控转录作用,因此,作为 TAK1 竞争抑制因子的 JAZF1 可能在不同的细胞中表现不同的生物学效应。Bae 等^[9]研究表明过表达的 JAZF1 可以通过上调促凋亡基因诱导心肌细胞心力衰竭症状。Yuasa 等^[10]研究认为过表达 JAZF1 能促进 C2C12 细胞周期进展和细胞增殖。

基于本课题的前期研究提示:JAZF1 可能在甲状腺癌的进程中可能发挥抑制作用,为进一步明确其生物学功能,本研究通过 MTT 实验观察过表达的 JAZF1 对乳头状甲状腺癌细胞 BCPAP 的增殖活性的影响,结果表明:过表达的 JAZF1 随时间明显抑制了 BCPAP 细胞的增殖(均 $P<0.01$);同时,平板克隆形成实验结果显示上调的 JAZF1 明显抑制

BCPAP 细胞的克隆形成(均 $P<0.001$),即 JAZF1 抑制了 BCPAP 细胞群体依赖性细胞增殖能力。

细胞凋亡是细胞重要的生物学现象,且是多基因严格控制的过程。Bcl-2 蛋白家族是通过控制线粒体通透性调节细胞凋亡,因其 Bcl-2 同源结构域分为三个亚家族:抗凋亡蛋白如 Bcl-2、仅含 BH3 的促凋亡蛋白如 BAD、孔隙形成促凋亡蛋白如 Bax^[11]。本研究通过流式细胞术检测分析细胞凋亡率,结果表明过表达的 JAZF1 促进了 BCPAP 细胞凋亡,进一步探讨 JAZF1 对 BCPAP 促凋亡的相关机制,Western blot 结果证实了上调的 JAZF1 抑制了 Bcl-2、增强了 Bax 蛋白相对表达水平。

磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B (PI3K /AKT) 信号通路是细胞生长、增殖、蛋白质合成、凋亡和代谢过程中最关键的分子信号通路之一^[12],全基因组测序研究也表明 PI3K 信号通路是甲状腺肿瘤发生的主要激活途径之一^[12]。研究发现 TC 中 PI3K、Akt 发生遗传学改变,导致其表达量异常增加且信号通路呈过度激活状态^[13-15]。在本研究中,上调的 JAZF1 能抑制 p-PI3K 和 p-Akt 表达,显著降低 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 的比值,表明过表达的 JAZF1 能抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活,这也可能是抑制 BCPAP 细胞增殖和凋亡的可能机制。

综上所述,过表达的 *JAZF1* 能有效抑制 BCPAP 细胞增殖及克隆形成,且促进细胞凋亡,作用机制可能与 Bcl-2/Bax、PI3K/Akt 信号通路活性改变有关,这将可能为抑制 PTC 的治疗提供潜在的治疗靶点。

参考文献:

- [1] Agaimy A, Moskalev EA, Weissner W, et al. Low-grade endometrioid stromal sarcoma of the paratestis: A novel report with molecular confirmation of *JAZF1*/*SUZ12* translocation [J]. *Am J Surg Pathol*, 2018, 42(5): 695–700.
- [2] Tsuyoshi H, Yoshida Y. Molecular biomarkers for uterine leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(6): 1743–1752.
- [3] Sung Y, Park S, Park SJ, et al. *Jazf1* promotes prostate cancer progression by activating *JNK/Slug* [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(1): 755–765.
- [4] Ueyama M, Nishida N, Korenaga M, et al. The impact of *PNPLA3* and *JAZF1* on hepatocellular carcinoma in non-viral hepatitis patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *J Gastroenterol*, 2016, 51(4): 370–379.
- [5] 马宁, 杨艳, 冯辉豪, 等. *Tip27* 基因在甲状腺肿瘤组织的表达及临床意义 [J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(5): 843–845.
- [6] Nakajima T, Fujino S, Nakanishi G, et al. *TIP27*: a novel repressor of the nuclear orphan receptor *TAK1/TR4* [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(14): 4194–4204.
- [7] Wei Q, Zhou B, Yang G, et al. *JAZF1* ameliorates age and diet-associated hepatic steatosis through *SREBP-1c*-dependent mechanism [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(9): 859.
- [8] Yuan L, Luo X, Zeng M, et al. Transcription factor *TIP27* regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity in a *PI3-kinase/Akt*-dependent manner in mice [J]. *Int J Obes (Lond)*, 2015, 39(6): 949–958.
- [9] Bae KB, Kim MO, Yu DH, et al. Overexpression of *Jazf1* induces cardiac malformation through the upregulation of pro-apoptotic genes in mice [J]. *Transgenic Res*, 2011, 20(5): 1019–1031.
- [10] Yuasa K, Aoki N, Hijikata T. *JAZF1* promotes proliferation of C2C12 cells, but retards their myogenic differentiation through transcriptional repression of *MEF2C* and *MRF4*-Implications for the role of *Jazf1* variants in oncogenesis and type 2 diabetes [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 336(2): 287–297.
- [11] Warren C, Wong-Brown MW, Bowden NA. *BCL-2* family isoforms in apoptosis and cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(3): 177.
- [12] Zaballos MA, Santisteban P. Key signaling pathways in thyroid cancer [J]. *J Endocrinol*, 2017, 235(2): R43–R61.
- [13] Zhang J, Du Y, Zhang X, et al. Downregulation of *BANCR* promotes aggressiveness in papillary thyroid cancer via the *MAPK* and *PI3K* pathways [J]. *J Cancer*, 2018, 9(7): 1318–1328.
- [14] Nozhat Z, Hedayati M. *PI3K/AKT* pathway and its mediators in thyroid carcinomas [J]. *Mol Diagn Ther*, 2016, 20(1): 13–26.
- [15] Zhou Q, Chen J, Feng J, et al. *SOSTDC1* inhibits follicular thyroid cancer cell proliferation, migration, and EMT via suppressing *PI3K/Akt* and *MAPK/Erk* signaling pathways [J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 435(1–2): 87–95.

[收稿日期] 2019-04-15