

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.32.007
文章编号: 1005-8982 (2018) 32-0038-06

临床研究 · 论著

肝细胞癌中 SETDB1 的表达及其对肿瘤生长的影响

陈静, 刘莉, 郑思琳

(西南医科大学附属医院 肝胆外科, 四川 泸州 646099)

摘要: **目的** 探讨人肝细胞癌 (HCC) 中组蛋白赖氨酸 N 端甲基转移酶 SET 结构域分支型 1 (SETDB1) 的表达及其对肿瘤生长的影响。 **方法** 采用免疫组织化学法检测 HCC 组织中 SETDB1 的表达水平; shRNA 慢病毒转染 MHCC97H 细胞构建 SETDB1 稳定敲低细胞系; 平板克隆形成试验及流式细胞仪检测细胞增殖、凋亡的变化; 裸鼠皮下移植瘤模型检测沉默 SETDB1 对肿瘤生长的影响; Western blot 检测组蛋白 H3K9me3 表达变化。 **结果** 在 HCC 组织中 SETDB1 表达水平与正常肝组织比较有差异 ($P < 0.05$); SETDB1 高表达患者肿瘤体积更大 ($P < 0.05$); 下调 SETDB1 能抑制 MHCC97H 细胞增殖, 促进细胞凋亡 ($P < 0.05$); 下调 SETDB1 的表达也抑制 MHCC97H 细胞裸鼠皮下移植瘤的生长 ($P < 0.05$); 沉默 SETDB1 后 MHCC97H 细胞内 H3K9me3 的表达降低 ($P < 0.05$), p53 表达升高 ($P < 0.05$)。 **结论** SETDB1 在 HCC 中表达升高, 下调 SETDB1 能够通过组蛋白 H3 在 K9 位点的甲基化而发挥抗肿瘤生长作用。

关键词: SETDB1; 肝细胞癌; 表达; 生长; H3K9me3

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

Expression of SETDB1 in hepatocellular carcinoma and its role for tumor growth

Jing Chen, Li Liu, Si-lin Zheng

(Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University,
Luzhou, Sichuan 646099, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of SETDB1 in hepatocellular carcinoma (HCC) and its role in tumor growth. **Methods** The expression of SETDB1 in HCC was detected by immunohistochemical staining. SETDB1 specific shRNA-lentivirus was used to knock down the expression of SETDB1 in MHCC97H cells. Clone formation assay and flow cytometry were used to detect cell proliferation and apoptosis. A subcutaneous xenotransplanted tumor model was used to measure the effect of SETDB1 on tumor growth *in vivo*. Western blot was used to detect the expression of H3K9me3. **Results** The expression of SETDB1 in the HCC tissues was higher than that in the normal liver tissues ($P < 0.05$). The tumor volume was bigger in the patients with high SETDB1 expression ($P < 0.05$). Down-regulation of SETDB1 suppressed proliferation and enhanced apoptosis in MHCC97H cells ($P < 0.05$). Knockdown of SETDB1 still inhibited *in vivo* tumor growth in nude mice ($P < 0.05$). Moreover, the expression of H3K9me3 in MHCC97H cells was impaired due to the depletion of SETDB1 ($P < 0.05$), but the p53 expression was up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression of SETDB1 increases in HCC tissues. Down-regulation of SETDB1 could inhibit HCC growth *in vitro* and *in vivo* through inhibiting H3K9 trimethylation.

Keywords: SETDB1; hepatocellular carcinoma; expression; growth; H3K9me3

收稿日期: 2018-05-21

[通信作者] 郑思琳, E-mail: 791697074@qq.com

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是我国最常见的消化系统恶性肿瘤之一^[1-2]。编码基因位于人类染色体 1q21 上的 SET 结构域分支型 1 (SET domain bifurcated 1, SETDB1) 是一种组蛋白赖氨酸 N 端甲基转移酶^[3-5]。有研究显示,前列腺癌及非小细胞肺癌中高表达的 SETDB1 对肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭具有促进作用,并且能对患者预后进行评价^[6-7]。本研究检测 HCC 中 SETDB1 的表达,通过敲除 SETDB1 研究其对肝癌细胞体内外增殖凋亡能力的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 临床资料 选取 2014 年 1 月-2016 年 3 月于西南医科大学附属医院肝胆外科行手术切除的 50 例 HCC 患者的组织标本及 35 例因肝外伤或肝血管瘤而切除患者的正常肝组织标本。所有标本于离体 30 min 内取材,于中性甲醛溶液中保存、固定。

1.1.2 细胞来源及主要试剂 肝癌 MHCC97H 细胞购自上海细胞库,并由本科实验室保存。SETDB1 特异性 shRNA 慢病毒颗粒 (病毒载体类型: psi-LVRH1GP) 购自广州复能基因公司, DMEM (11965-084)、胎牛血清 (16000044) 购自美国 Gibco 公司, Annexin V 凋亡检测试剂盒 (FITC/PI 双染法, E606336) 购自上海生工生物工程有限公司, Trizol 试剂 (15596026)、RT-PCR 试剂盒 (SuperScript® One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase, 10928042) 及 qPCR 试剂盒 (DyNAmo Flash SYBR Green qPCR Kit, F415L) 购自美国 Invitrogen 公司,兔抗人 SETDB1 单克隆抗体 (#2196)、兔抗人组蛋白 H3 单克隆抗体 (#9717)、兔抗人 H3K9me3 单克隆抗体 (#13969)、兔抗人 p53 单克隆抗体 (#2527) 及兔抗人 β -actin 单克隆抗体 (#4970) 购自美国 CST 公司;兔 SP 免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司。

1.2 免疫组织化学染色

将石蜡包埋的标本组织切片常规进行脱蜡及水化预处理;用抗体稀释液按 1:100 比例稀释兔抗人 SETDB1 多克隆抗体,滴加抗体于组织切片上并充分浸没组织标本。4℃恒温冰箱内孵育过夜,洗净未结合一抗后,使用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗结合相应一抗,DAB 法显示阳性蛋白。每张组织切片在 400 倍视野下随机选取 10 个视野进行阅片。>10%

癌细胞胞核呈棕黄色或棕褐色染色即为阳性,否则判定为阴性。

1.3 细胞培养及慢病毒感染

MHCC97H 细胞于适宜环境中培养,稳定传 2 代或 3 代后进行实验。将 MHCC97H 细胞按过夜增殖至愈合度达 70% 的密度接种于 6 孔细胞培养板。达到预定培养密度后移除培养基,磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 充分洗涤细胞。慢病毒感染分组:每孔加入 1 ml sh-SETDB1 慢病毒上清液、2 ml 完全培养基及 15 μ g Polybrene 作为 sh-SETDB1 组;每孔加入 1 ml sh-Control 慢病毒上清液、2 ml 完全培养基及 15 μ g Polybrene 作为 sh-Control 组。转染 48 h 后,使用含 2 μ g/ml Puromycin 的完全培养液筛选稳定转染细胞株。

1.4 qRT-PCR

通过 Trizol 试剂提取标本及细胞 RNA,配制逆转录及 PCR 扩增体系。逆转录条件:50℃预变性 30 min,94℃变性 2 min,循环 1 次后 94℃变性 15 s,60℃退火 30 s,68℃延伸 3 min,循环 40 次后 72℃继续延伸 10 min。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 SETDB1 基因的相对含量。

1.5 Western blot 检测

采用 RIPA 试剂提取细胞总蛋白,凝胶垂直电泳分离蛋白,70 V 恒压转膜 150 min,5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 室温封闭 1 h;用 3% 浓度的脱脂奶粉溶液按 1:1000 比例稀释 SETDB1、H3K9me3、p53 及 β -actin 抗体。在 4℃下孵育相应条带过夜。洗去残余一抗后采用 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔或抗鼠二抗室温孵育条带 1 h。于暗室内,增强化学发光法观察蛋白表达。每个样本独立重复实验 3 次。

1.6 平板克隆形成试验

将 MHCC97H 细胞按 500 个/孔均匀接种于 6 孔板中,更换完全培养基 2 次/周。培养 2 周后,使用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,1% 结晶紫染色 15 min,置于蒸馏水中洗去多余染液。风干后将 6 孔板置于网格纸上统计每孔克隆形成数量,计算克隆形成率。每个样本独立重复实验 3 次。

1.7 流式细胞术

将 MHCC97-H 细胞用预冷 PBS 工作液冲洗 2 次,胰酶消化细胞后 1500 r/min 离心 5 min 沉淀细胞,预

制缓冲液调整细胞数为 1×10^6 个/ml, 将 $500 \mu\text{l}$ 细胞悬液与 $5 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC 及 $10 \mu\text{l}$ PI 混合, 室温避光反应 10 min 后上机测试。

1.8 裸鼠皮下移植瘤模型的复制

6 只 5 周龄 BLAB/c 裸鼠, 随机分为 sh-SETDB1 组和 sh-Control 组, 每组 3 只, 分组后各组适应性饲养 1 周。分别取对数生长期的 sh-SETDB1 和 sh-Control 细胞, 以冷 PBS 溶液制成细胞悬液, 调整细胞终浓度为 2.0×10^7 个/ml。使用 1 ml 注射器, 将 0.2 ml 细胞悬液 (约含 4.0×10^6 个细胞) 接种于裸鼠背部近右下肢处皮下组织内, 复制裸鼠皮下移植瘤模型。裸鼠饲养 4 周, 每周测量肿瘤长度及宽度, 按 (长轴 $\times$ 短轴²) / 2 来计算肿瘤体积, 绘制肿瘤生长曲线。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计学软件, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验或单因素方差分析, 计数资料以率 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SETDB1 蛋白在 HCC 和正常肝组织中的阳性表达

免疫组织化学染色发现, SETDB1 位于细胞核。50 例 HCC 组织中 SETDB1 蛋白的阳性表达率为 80.00% (40/50), 35 例正常肝组织中 SETDB1 蛋白的阳性表达率为 31.43% (11/35), 经 χ^2 检验, 差异有统计学意义 ($\chi^2=20.238$, $P=0.000$)。见图 1。

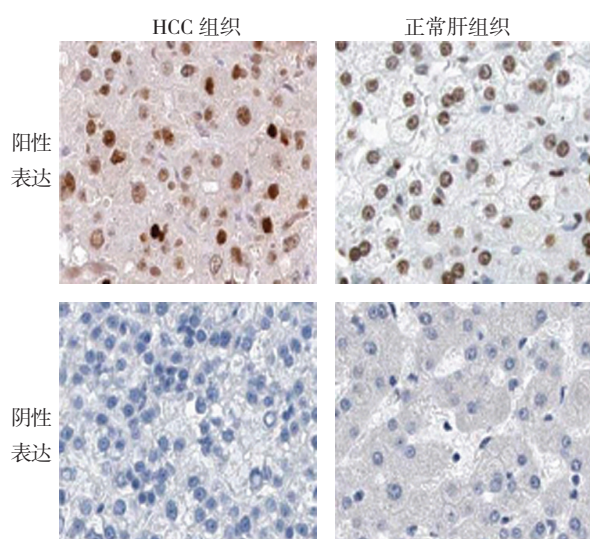


图 1 SETDB1 在 HCC 和正常肝组织中的表达
(免疫组织化学法 $\times 400$)

2.2 不同影响因素下的 SETDB1 阳性表达

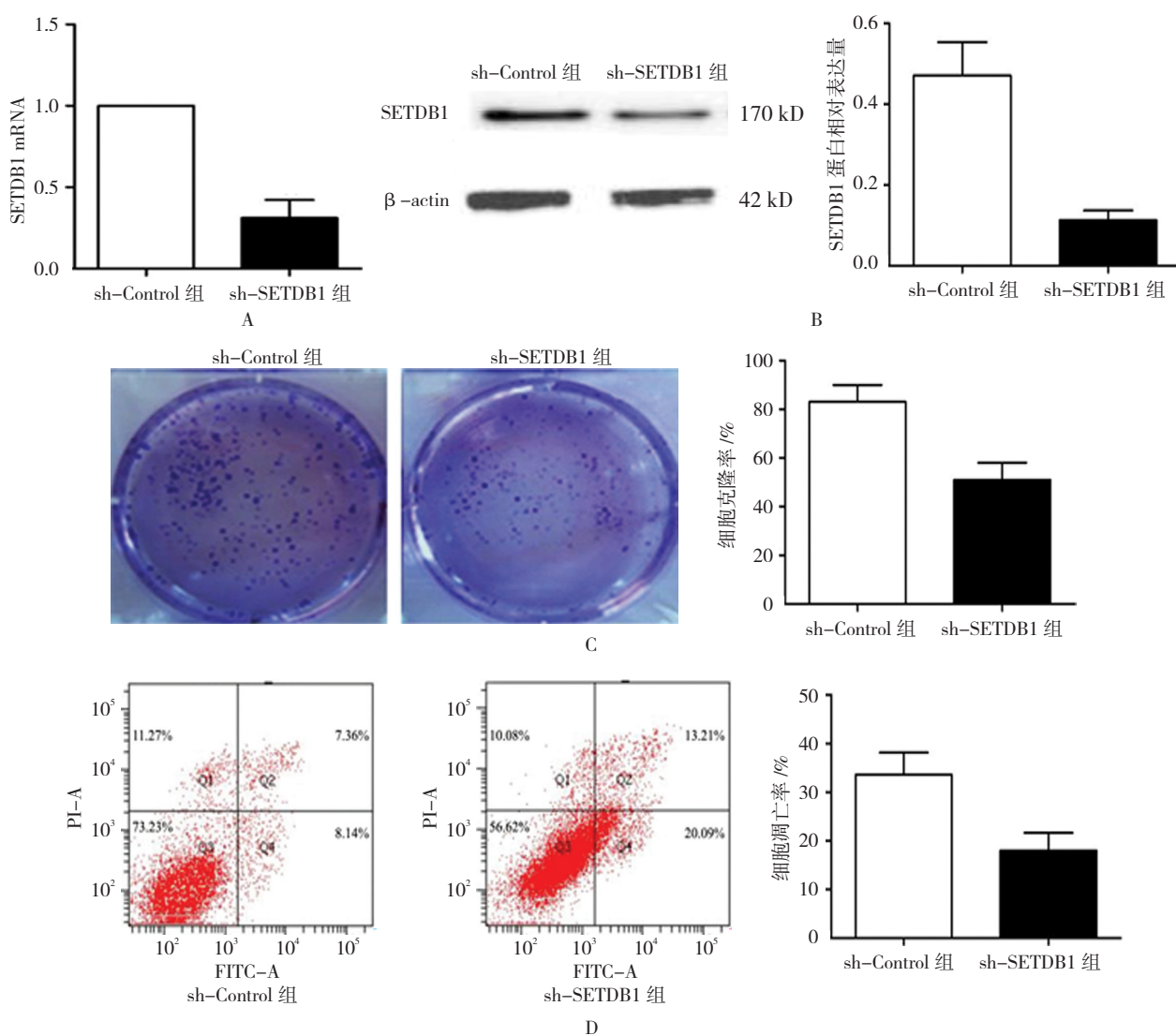
HCC 组织中不同直径肿瘤比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), SETDB1 阳性表达与肿瘤体积增大关系密切。见表 1。

表 1 不同影响因素下的 SETDB1 阳性表达率比较

因素	例数	阳性 例 (%)	χ^2 值	<i>P</i> 值
性别				
男	36	31 (86.11)	3.001	0.083
女	14	9 (64.29)		
年龄				
≤ 60 岁	34	28 (82.35)	0.052	0.820
>60 岁	16	12 (75.00)		
HBV 感染				
是	36	31 (86.11)	3.001	0.083
否	14	9 (64.29)		
肿瘤直径				
≤ 5 cm	15	8 (53.33)	7.292	0.007
>5 cm	35	32 (91.43)		
组织学分级				
G ₁ 、G ₂	24	16 (66.66)	3.651	0.056
G ₃ 、G ₄	26	24 (92.31)		
TNM 分期				
I、II	17	11 (64.71)	2.457	0.117
III、IV	33	29 (87.88)		

2.3 沉默 SETDB1 表达对 MHCC97H 细胞增殖、凋亡的影响

sh-Control 组 SETDB1 mRNA 相对表达量为 (1.00 ± 0.00), sh-SETDB1 组为 (0.38 ± 0.11), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=5.219$, $P=0.017$)。sh-Control 组 SETDB1 蛋白相对表达量为 (0.46 ± 0.08), sh-SETDB1 组为 (0.17 ± 0.02), 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=3.071$, $P=0.036$)。sh-SETDB1 组抑制 MHCC97H 细胞克隆率为 (81.34 ± 10.29)%, sh-Control 组为 (53.22 ± 8.31)%, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=4.025$, $P=0.029$)。sh-SETDB1 组促进 MHCC97H 细胞凋亡率为 (31.45 ± 6.19)%, sh-Control 组为 (18.08 ± 5.33)%, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=3.740$, $P=0.031$)。见图 2。



A: sh-SETDB1 慢病毒转染沉默 MHCC97H 细胞内 SETDB1 mRNA 表达; B: sh-SETDB1 慢病毒转染沉默 MHCC97H 细胞内 SETDB1 蛋白表达; C: 沉默 SETDB1 表达后抑制 MHCC97H 细胞克隆形成率; D: 沉默 SETDB1 表达后提高 MHCC97H 细胞凋亡率

图 2 沉默 SETDB1 表达对 MHCC97H 细胞增殖、凋亡的影响

2.4 沉默 SETDB1 表达对裸鼠皮下移植瘤生长的影响

sh-SETDB1 组 MHCC97H 细胞在裸鼠体内的生长速度为 $(0.010 \pm 0.004) \text{ cm}^3/\text{d}$, sh-Control 组为 $(0.050 \pm 0.010) \text{ cm}^3/\text{d}$, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=23.605$, $P=0.039$)。饲养 4 周后处死动物获取皮下肿瘤, sh-SETDB1 组最终肿瘤体积为 $(1.34 \pm 0.31) \text{ cm}^3$, sh-Control 组为 $(0.41 \pm 0.12) \text{ cm}^3$, 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=3.581$, $P=0.031$)。见图 3。

2.5 沉默 SETDB1 表达对 MHCC97H 细胞中 H3K9me3 和 p53 表达的影响

sh-Control 组 MHCC97H 细胞中 H3K9me3 的表

达水平为 (0.73 ± 0.09) , sh-SETDB1 组为 (0.13 ± 0.02) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=4.427$, $P=0.025$)。sh-Control 组 p53 的表达水平为 (0.67 ± 0.06) , sh-SETDB1 组为 (0.21 ± 0.04) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t=3.060$, $P=0.041$)。sh-Control 组 H3 的表达水平为 (0.42 ± 0.03) , sh-SETDB1 组为 (0.39 ± 0.02) , 两组比较, 差异无统计学意义 ($t=1.036$, $P=0.205$)。SETDB1 并未调控组蛋白 H3 的表达, 而是通过调控组蛋白 H3 甲基化抑制 p53 的表达, 促进肿瘤细胞增殖。见图 4。

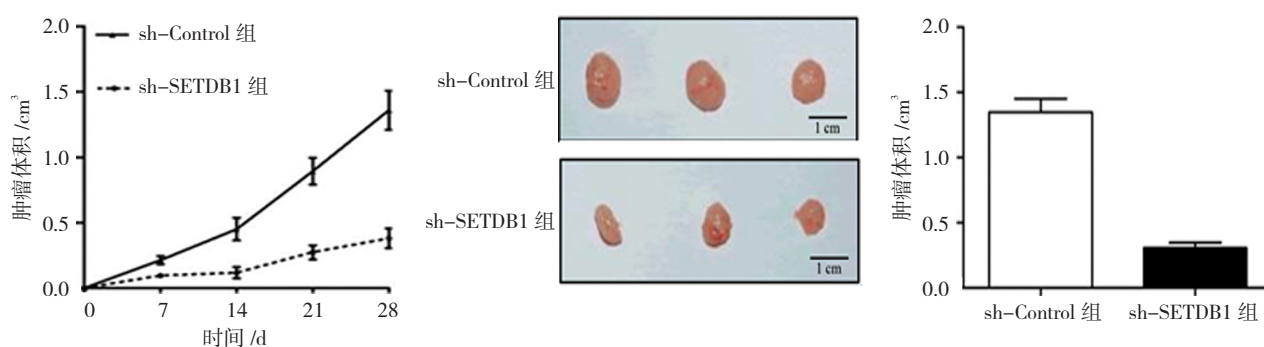


图 3 沉默 SETDB1 表达对 MHCC97H 细胞移植瘤生长的影响

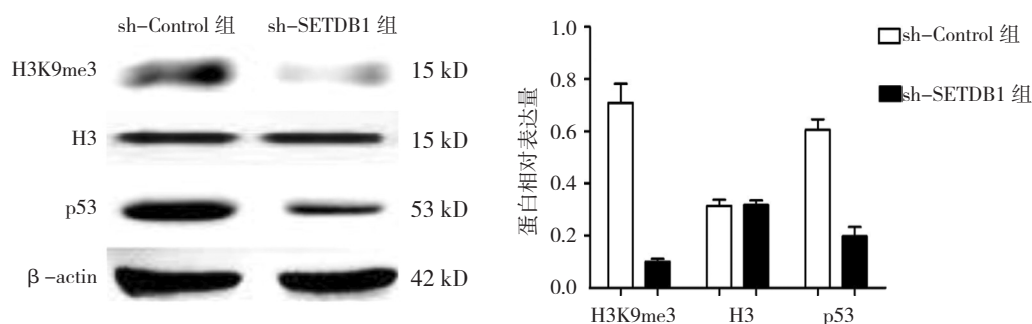


图 4 沉默 SETDB1 表达对 MHCC97H 细胞内 H3K9me3 和 p53 表达的影响

3 讨论

SETDB1 作为一种蛋白甲基化转移酶,实验证据表明其能与异染色质蛋白 1 及其共抑制子 KAP1 在异染色质中结合而促进 H3K9me3 形成^[8-9]。本研究的免疫组织化学染色结果显示,50 例 HCC 组织中 SETDB1 的阳性表达率要高于 35 例正常肝组织,并且高表达 SETDB1 的患者肿瘤体积增大。说明在临床上检测肝癌组织中 SETDB1 的表达对判断患者肿瘤进展有一定参考价值。

目前,虽然在许多肿瘤中都发现了 SETDB1 的异常表达,但是其具体的生物学功能尚不完全清楚^[10]。在非小细胞肺癌中,SETDB1 通过正向激活 WNT-β-catenin 信号通路来促进 HCC 细胞增殖,相似的生物学作用也存在于胶质母细胞瘤中^[11-12]。但是 WU 等^[13]的研究结果却指出,SETDB1 能与 SMAD2 和 SMAD3 形成 SETDB1/SMAD2/3 抑制性复合体来抑制 TGF-β 诱导的肺癌细胞转移。在本研究中,笔者通过细胞增殖及凋亡实验表明,体外沉默 SETDB1 的表达致使肝癌 MHCC97H 细胞的增殖能力受到抑制。除此之外,动物肿瘤生长模型也指明,下调 SETDB1 的表达能够抑制 MHCC97H 细胞在体内的生长。综合上述结果表明,下调 SETDB1 的表达是抑制肝癌生长的有效

手段之一。SETDB1 能够特异性甲基化组蛋白 H3 的 K9 位点,形成甲基化的组蛋白 H3K9me3。有研究指出,H3K9me3 的形成与包括 p53 在内的许多抑制肿瘤细胞生长的基因失活有关^[14]。在本研究中,笔者在沉默 SETDB1 表达后发现 H3K9me3 的表达水平降低,而 p53 的表达水平升高,提示 SETDB1 促肿瘤生长可能与抑制 p53 的表达有关。另外,p53 在肺癌中还可能作为一种转录抑制因子结合在 SETDB1 的启动子区域,抑制其转录过程^[15]。说明 p53 与 SETDB1 存在复杂的相互制约关系。在 HCC 中 p53 的失活是一种普遍现象,这也部分揭示了 SETDB1 在 HCC 中高表达的原因^[16]。

综上所述,SETDB1 是 HCC 中高表达的促癌分子,沉默 SETDB1 的表达可能通过恢复 p53 的表达而抑制 HCC 增殖并促进其凋亡。

参考文献:

- [1] 张松,潘树波,谢坤,等.精准肝脏外科理念在肝细胞肝癌治疗中的价值[J].安徽医科大学学报,2016,51(1):94-97.
- [2] 王晓耘,王健东.肝癌淋巴结转移手术治疗进展[J].中国实用外科杂志,2015,35(4):454-456.
- [3] LI L, CHEN B F, CHAN W Y. An epigenetic regulator: methyl-CpG-binding domain protein 1 (MBD1)[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(3): 5125-5140.

- [4] INOUE Y, MATSUURA S, KURABE N, et al. Clinicopathological and survival analysis of Japanese patients with resected non-small-cell lung cancer harboring NKX2-1, SETDB1, MET, HER2, SOX2, FGFR1, or PIK3CA gene amplification[J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(11): 1590-1600.
- [5] MATSUMURA Y, NAKAKI R, INAGAKI T, et al. H3K4/H3K9me3 bivalent chromatin domains targeted by lineage-specific dna methylation pauses adipocyte differentiation[J]. *Mol Cell*, 2015, 60(4): 584-596.
- [6] SUN Y, WEI M, REN S C, et al. Histone methyltransferase SETDB1 is required for prostate cancer cell proliferation, migration and invasion[J]. *Asian J Androl*, 2014, 16(2): 319-324.
- [7] LAFUENTE-SANCHIS A, ZÚÑIGA Á, GALBIS J M, et al. Prognostic value of ERCC1, RRM1, BRCA1 and SETDB1 in early stage of non-small cell lung cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2016, 18(8): 798-804.
- [8] ALAGOZ M, KATSUKI Y, OGIWARA H, et al. SETDB1, HP1 and SUV39 promote repositioning of 53BP1 to extend resection during homologous recombination in G2 cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(16): 7931-7944.
- [9] THOMPSON P J, DULBERG V, MOON K M, et al. hnRNP K coordinates transcriptional silencing by SETDB1 in embryonic stem cells[J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(1): DOI: 10.1371/journal.pgen.1004933.
- [10] KARANTH A V, MANISWAMI R R, PRASHANTH S, et al. Emerging role of SETDB1 as a therapeutic target[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21(3): 319-331.
- [11] SUN Q Y, DING L W, XIAO J F, et al. SETDB1 accelerates tumorigenesis by regulating the WNT signalling pathway[J]. *J Pathol*, 2015, 235(4): 559-570.
- [12] SPYROPOULOU A, GARGALIONIS A, DALAGIORGOU G, et al. Role of histone lysine methyltransferases SUV39H1 and SETDB1 in gliomagenesis: modulation of cell proliferation, migration, and colony formation[J]. *Neuromolecular Med*, 2014, 16(1): 70-82.
- [13] WU P C, LU J W, YANG J Y, et al. H3K9 histone methyltransferase, KMT1E/SETDB1, cooperates with the SMAD2/3 pathway to suppress lung cancer metastasis[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(24): 7333-7343.
- [14] NICOLAI S, ROSSI A, DI DANIELE N, et al. DNA repair and aging: the impact of the p53 family[J]. *Aging (Albany NY)*, 2015, 7(12): 1050-1065.
- [15] NOH H J, KIM K A, KIM K C. p53 down-regulates SETDB1 gene expression during paclitaxel induced-cell death[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 446(1): 43-48.
- [16] POLLUTRI D, GRAMANTIERI L, BOLONDI L, et al. TP53/MicroRNA Interplay in Hepatocellular Carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): E2029.

(李科 编辑)