

组蛋白甲基转移酶SMYD3在不同HBV表达水平肝癌细胞中的差异表达

何军, 马兆龙, 陈立波, 王国斌

■背景资料

HBV作为肝癌发生首要促进因素已被科学界公认。HBx蛋白作为一种HBV功能蛋白通过多种作用机制促使肝癌的发生和发展。SMYD3是一种组蛋白转移酶, 通过组蛋白修饰在肝癌、大肠癌等多种肿瘤的发生和进展中起着重要的调控作用。但关于HBV是否通过SMYD3途径参与肝癌发生尚缺乏研究。

何军, 马兆龙, 陈立波, 王国斌, 华中科技大学协和医院肝胆外科中心 湖北省武汉市 430022

国家自然科学基金资助项目, No. 30672067

作者贡献分布: 何军与陈立波对此文所作贡献均等; 此课题由何军, 陈立波及王国斌设计; 研究过程由何军和马兆龙操作完成; 所用试剂及分析操作由何军和马兆龙提供; 本文写作由何军和陈立波完成。

通讯作者: 陈立波, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学协和医院肝胆外科中心. libo_chen@hotmail.com
电话: 027-85351623

收稿日期: 2008-02-26 修回日期: 2008-04-16

SMYD3 expression differences in hepatoma cell lines with different HBV expression levels

Jun He, Zhao-Long Ma, Li-Bo Chen, Guo-Bin Wang

Jun He, Zhao-Long Ma, Li-Bo Chen, Guo-Bin Wang, Hepatobiliary Surgery Center, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30672067

Correspondence to: Li-Bo Chen, Hepatobiliary Surgery Center, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, 1277 Jiefang Avenue, Wuhan 430022, Hubei Province, China. libo_chen@hotmail.com

Received: 2008-02-26 Revised: 2008-04-16

Abstract

AIM: To evaluate correlation between histone methyltransferase SMYD3 expression in hepatoma and HBV infection.

METHODS: SMYD3 mRNA expressions and SMYD3 protein expression levels in HBV-negative HepG2 and HBV-positive hepatoma cell line HepG2.2.15 were determined using real time PCR and Western blot, respectively.

RESULTS: SMYD3 mRNA and protein levels were significantly higher in HepG2.2.15 than those in HepG2 (0.92 ± 0.12 vs 0.18 ± 0.05 , 0.28 ± 0.03 vs 0.54 ± 0.05 , both $P < 0.01$).

CONCLUSION: HBV may promote hepatoma cell malignancy through its SMYD3 up-regulat-

ing pathways.

Key Words: SMYD3; Epigenetics; Hepatoma; Hepatitis B virus; Real time RT-PCR

He J, Ma ZL, Chen LB, Wang GB. SMYD3 expression differences in hepatoma cell lines with different HBV expression levels. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(18): 2036-2039

摘要

目的: 探讨HBV组蛋白甲基转移酶SMYD3在肝癌细胞中的表达与HBV感染状态相关性。

方法: 选取HBV阴性和HBV阳性的肝癌细胞株HepG2、HepG2.2.15, 利用实时逆转录聚合酶链反应(real time RT-PCR)方法检测SMYD3 mRNA表达水平, Western blot检测细胞中SMYD3蛋白表达差异。

结果: SMYD3 mRNA及蛋白在HepG2.2.15的表达水平显著高于HepG2(0.92 ± 0.12 vs 0.18 ± 0.05 , 0.28 ± 0.03 vs 0.54 ± 0.05 , 均 $P < 0.01$), 有统计学差异。

结论: HBV可能通过上调SMYD3途径促进肝癌的恶性生物学行为。

关键词: SMYD3; 表观遗传学; 肝肿瘤; 乙肝病毒; 实时逆转录聚合酶链反应

何军, 马兆龙, 陈立波, 王国斌. 组蛋白甲基转移酶SMYD3在不同HBV表达水平肝癌细胞中的差异表达. *世界华人消化杂志* 2008; 16(18): 2036-2039

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2036.asp>

0 引言

SMYD3是最近发现的具有催化组蛋白H3-K4甲基化位点发生甲基化活性的甲基转移酶, 通过组蛋白甲基化、活化癌基因表达等在肝癌等恶性肿瘤中发挥重要的调控作用^[1-2]. 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是我国肝细胞癌发生

■同行评议者

沈柏用, 副教授, 上海交通大学医学院瑞金医院肝胆胰外科中心

的重要原因. 研究表明, HBV可以通过破坏正常细胞凋亡, 抑制抑癌基因 $p53$ 活性, 破坏DNA损伤修复, 诱导抑癌基因启动子甲基化导致抑癌基因沉默等途径发挥诱癌、促癌作用, 但关于HBV和肝癌发生、进展的关系还没完全阐明; HBV是否通过影响SMYD3等组蛋白甲基化酶表达、改变组蛋白甲基化状态来调控肝癌发生与进展还未见报道. 我们通过检测不同HBV表达水平肝癌细胞株中SMYD3的表达差异, 初步探讨HBV是否可能通过上调SMYD3途径参与肝癌发生、发展的调控.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2, HepG2.2.15细胞由我院中心实验室保存; Anti-SMYD3(羊抗人), Anti-HBx(小鼠抗人)购自美国Abcam公司; RNA提取试剂盒TRIzol Reagent为Invitrogen公司产品, 逆转录试剂盒购自Gibco公司, 荧光定量PCR试剂盒购自Roche公司, 引物由上海Invitrogen公司合成.

1.2 方法

1.2.1 HepG2细胞和HepG2.2.15细胞培养: 分别在含100 mL/L胎牛血清的R1640培养基和DMEM高糖培养基、50 mL/L CO_2 、37℃饱和湿度条件下培养, 每2-3天用2.5 g/L胰酶消化传代.

1.2.2 HepG2和HepG2.2.15细胞中HBV检测: 在6孔细胞培养板中放置无菌盖玻片, 并以细胞密度 $2 \times 10^4/L$, 2 mL/孔接种于培养板. HepG2细胞和HepG2.2.15细胞各3孔. 当细胞在盖玻片上的密度达到90%时用PBS冲洗, 40 g/L多聚甲醛固定, Anti-HBcAg以1:200比例稀释点滴细胞4℃过夜. 加SABC及DAB染色, 操作按照说明书进行.

1.2.3 肝癌细胞中SMYD3的mRNA的检测: 采用TRIzol一步法提取细胞总RNA. 逆转录后得到cDNA后行real time RT-PCR, SMYD3引物正义: 5'-TGAATGTGACTGTTTCCGTTGC-3', 反义5'-ATTGCTGCTTATGATCGCCTGG-3', 产物为172 bp; 内参照 β -actin引物正义: 5'-GAACGGTG AAGGTGACAG-3', 反义5'-TAGAGAGAAGTG GGGTGG-3', 产物为168 bp; 反应参数设置95℃ 2 min; 94℃ 30 s; 57℃ 30 s; 72℃ 30 s, 循环45次; 72℃ 5 min.在延伸过程中收集荧光信号, 计算样品的Ct值, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算SMYD3 mRNA的表达量.

1.2.4 肝癌细胞中SMYD3蛋白表达的检测: 细胞培养融合80%, 收集细胞提取总蛋白. 将定量后的蛋白质样品每孔20 μ g点样于SDS聚丙烯

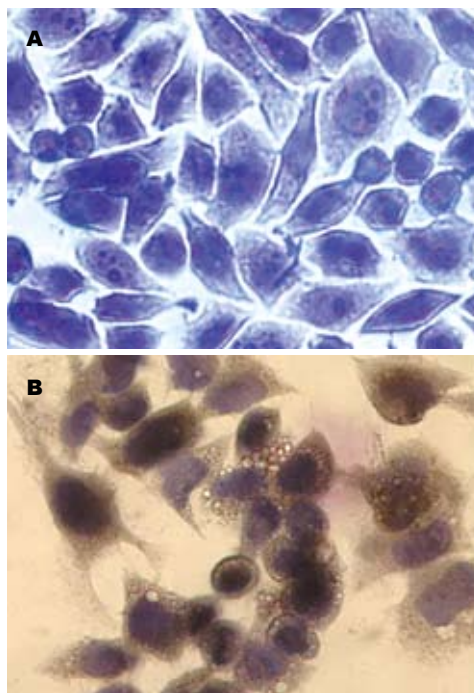


图1 HepG2、HepG2.2.15细胞中HBV检测. A: HepG2; B: HepG2.2.15.

酰胺凝胶小孔, 100 V电泳1 h, 300 mA下转膜1.5 h, 将转好的硝酸纤维素膜用封闭液室温振荡封闭2 h, 然后加入1:200 SMYD3一抗, 37℃孵育2 h, TBS缓冲液漂洗15 min, 共3次, 再加入1:5000辣根过氧化酶标记的二抗, 37℃孵育1 h, TBS缓冲液漂洗15 min, 共3次, 增强化学发光剂(Amersham公司)显影, 胶片曝光, 结果用UVP扫描仪扫描成像.

统计学处理 各组实验分别重复3次, 计算平均值, 再进行SPSS One-way ANOVA(SNK method)方差分析, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义.

2 结果

2.1 HepG2.2.15和HepG2细胞中HBV的检测 通过SABC法检测细胞中的HBcAg表达, 表明HepG2、HepG2.2.15分别是HBV阴性和HBV阳性细胞(图1).

2.2 肝癌细胞中SMYD3 mRNA的表达 Real-time RT-PCR结果显示; HepG2.2.15细胞组的SMYD3 mRNA表达量明显高于HepG2细胞组(0.92 ± 0.12 vs 0.18 ± 0.05 $P < 0.01$), 具有显著统计学差异(图2).

2.3 SMYD3蛋白在不同肝癌细胞株中的表达差异 Western blot结果灰度值相对量显示: HepG2.2.15细胞组中的SMYD3也呈高表达状态, 显著高于HepG2细胞组(0.28 ± 0.03 vs $0.54 \pm$

■ 研发前沿

目前关于HBV研究的热点主要集中在HBx蛋白在乙肝相关性肝癌的作用和致病机制. 至于HBx和组蛋白转移酶SMYD3联系在一起的表现遗传学途径报道甚少.

■ 创新盘点

本文首次将HBV中的HBx和组蛋白转移酶SMYD3结合到一起, 证实两者之间的相互关系, 从而为HBV从表现遗传学方面研究其促癌作用提供新的依据.

■应用要点

本实验结果为研究HBV提出一个新的方向, HBV可能在表观遗传学途径通过调控SMYD3表达参与肝癌的发生与进展。

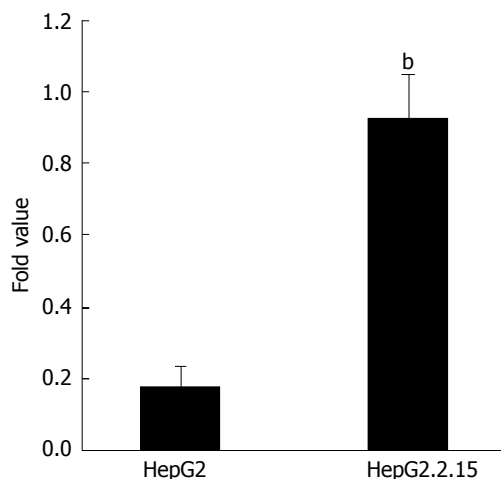


图2 SMYD3 mRNA在不同肝癌细胞株的表达水平差异。
^b $P < 0.01$.

0.05, $P < 0.01$, 图3).

3 讨论

HBV感染是原发性肝癌的首要病因. 国内外对HBV在肝癌发生进展中的作用进行了大量的研究, 尤其是HBx基因与肝癌的关系. 目前认为HBx蛋白致癌作用主要有以下5方面: (1)HBx可上调HepG2细胞端粒酶活性, 使较多的细胞进入S期^[3]. 这些都表明X基因通过上调细胞端粒酶活性而抑制宿主细胞凋亡, 是诱导肝细胞癌变的一条可能途径. (2)HBx可通过蛋白质-蛋白质作用阻断p53的功能. 同时, HBx对p53的转录亦有强烈的抑制作用. Park *et al*^[4]报道, HBx可抑制p53的活性, 减少细胞周期蛋白激酶抑制剂P21Waf1/cip1蛋白表达, 延长细胞从G₁期向S期的转换, 增加肝细胞基因突变的可能性. HBx能和参与核酸外切修复的ERCC竞争p53结合位点, 抑制p53对损伤核酸的外切修复作用, 增加重要基因的变异频率. HBx还可下调p53对抑癌基因PTEN的转录激活作用, 使PTEN的表达水平下降, 增加细胞恶性转化的危险性^[5]. (3)HBV X破坏DNA损伤的修复, 单纯HBx在肝细胞的表达并不足以引起HCC, 环境因素与HBx的协同作用是HCC形成的主要机制. HBx并不显著增加DNA的变异率(mutation frequency, MF), 但他可使环境致癌因素如黄曲霉毒素B₁、UV射线和二乙基亚硝基胺(DEN)引起的DNA损伤产生累积, 即HBx抑制了损伤DNA的修复. (4)HBx诱导肿瘤细胞的侵袭依赖于MT1-MMP和COX2活性, 一方面HBx使膜型基质金属蛋白酶-1(MT1-MMP)和环氧合酶-2(COX-2)表达上调^[6-7]降解细胞周围细胞外基质(ECM)促进

■名词解释

SMYD3: 催化组蛋白H3-K4甲基化的组蛋白甲基化转移酶. SMYD3在肝癌等肿瘤中大量表达, 促进肿瘤细胞异常增殖.

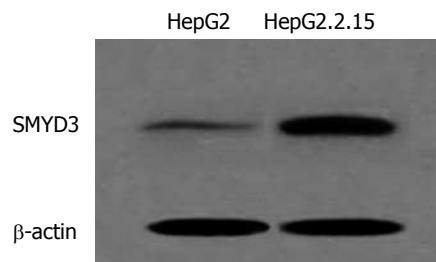


图3 肝癌细胞SMYD3蛋白的表达.

了肝癌细胞的侵袭和转移; 另一方面HBx促进肿瘤新生血管形成通过多环节促进了肝细胞HIF-1 α 的转录表达, 增加了肝细胞HIF-1 α 蛋白质的稳定性并增强了HIF-1 α 对VEGF的激活作用^[8]. (5)HBx激活DNA甲基化转移酶1活性使E-cadherin启动子区甲基化^[9], E-cadherin表达被抑制导致细胞间的黏附作用减弱, 从而促使肿瘤细胞的转移, 从而增强肿瘤的转移和侵袭能力. 有研究报道^[10], 在癌旁组织和慢性乙型肝炎中, 抑癌基因p16INK4A基因启动子甲基化与HBx蛋白高表达有关, HBx蛋白可能通过诱导p16INK4A基因启动子甲基化而使该抑癌基因失活, 这也反映了HBx在通过表观遗传方面影响抑癌基因的表达从而促进肝癌的发生. 而对HBV是否通过组蛋白甲基化参与肝癌恶性生物学行为的调控还未见报道.

组蛋白甲基化是基因表观遗传学调控的重要方式. SMYD3是具有组蛋白甲基转移酶活性的蛋白质, 通过将组蛋白H3上第4个赖氨酸甲基化改变染色质的构象, 激活相关的癌基因转录, 促进肿瘤细胞的增殖、集落形成, 抑制肿瘤细胞的凋亡^[2]. Hamamoto *et al*^[11]研究表明SMYD3在大部分的乳腺癌组中高表达, SMYD3可以调控原癌基因WNT10B的表达促进乳腺癌的发生. 我们研究曾发现, SMYD3在多个肝癌细胞株及肝癌组织中大量表达; 利用RNA干扰技术下调SMYD3表达后, HepG2细胞的增殖受到抑制并出现较为明显的凋亡^[12]. 动物实验也表明SMYD3 shRNA质粒注射到裸鼠的瘤体内可以减缓瘤体的增长速度. SMYD3不仅通过癌基因活化促进肝癌的恶性表型, 还可能通过使抑癌基因RIZ1启动子CpG岛去甲基化、下调RIZ1的抑癌活性来参与肝癌的调控^[13]. 但对SMYD3是否参与HBV致癌/促癌作用还需要进一步研究.

我们初步探讨了不同HBV表达水平肝癌细胞株中SMYD3表达的差异, 发现与HBV阴性的HepG2细胞相比, SMYD3mRNA和蛋白在HBV阳性的HepG2.2.15中的表达均显著增加, 提示

我们肝癌细胞中SMYD3的表达可能受到HBV调控, HBV也可能通过SMYD3途径发挥致癌/促癌作用. 我们的相关研究发现抑制SMYD3表达可以下调肝癌细胞中癌基因c-myc表达^[14], 而c-myc是HBV致癌的重要途径^[15], 提示我们SMYD3可能在HBV癌基因激活途径中发挥重要的桥梁作用.

HBV如何调控肝癌细胞中SMYD3表达还有待于进一步阐明. 已有的研究表明, HBV可以通过多种方式参与肝癌发生的调控, 其中细胞信号途径如RAS-RAF-p38MAPK、SAPK/JNK、ERK等, 以及蛋白酶途径等是HBV致癌作用的重要环节^[16]. 对肝癌细胞HBV检测表明HepG2.2.15细胞中HBV主要表达于细胞质, 我们通过基因转染发现HBX基因转染后SMYD3基因和HBX共同位于肝癌细胞质(另文发表), 提示我们肝癌细胞中HBV可能通过这些信号途径上调SMYD3的表达和活性. SMYD3启动子上含有E2F-1结合元件是影响SMYD3活性的重要原因^[17], 而在HepG2细胞中HBV增加E2F-1的活性^[18], 提示我们HBV通过增加E2F-1活性与SMYD3启动子上的E2F-1结合元件相作用, 从而调控肝癌细胞中SMYD3的表达, 是HBV阳性肝癌细胞中SMYD3表达、活性增加的重要原因.

4 参考文献

- 1 Tarn C, Zou L, Hullinger RL, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in dedifferentiated hepatocytes. *J Virol* 2002; 76: 9763-9772
- 2 Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, Yagyu R, Nakamura Y. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 731-740
- 3 周卫平, 沈钦海, 古柏燕, 任红, 张定凤. 乙型肝炎病毒X基因对肝细胞系细胞凋亡及端粒酶活性的影响. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 212-214
- 4 Park US, Park SK, Lee YI, Park JG, Lee YI. Hepatitis B virus-X protein upregulates the expression of p21waf1/cip1 and prolongs G1-->S transition via a p53-independent pathway in human hepatoma cells. *Oncogene* 2000; 19: 3384-3394
- 5 Chung TW, Lee YC, Ko JH, Kim CH. Hepatitis B Virus X protein modulates the expression of PTEN by inhibiting the function of p53, a transcriptional activator in liver cells. *Cancer Res* 2003; 63: 3453-3458
- 6 Ou DP, Tao YM, Tang FQ, Yang LY. The hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinoma metastasis by upregulation of matrix metalloproteinases. *Int J Cancer* 2007; 120: 1208-1214
- 7 Lara-Pezzi E, Gómez-Gavero MV, Gálvez BG, Mira E, Iñiguez MA, Fresno M, Martínez-A C, Arroyo AG, López-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 2002; 110: 1831-1838
- 8 Yoo YG, Oh SH, Park ES, Cho H, Lee N, Park H, Kim DK, Yu DY, Seong JK, Lee MO. Hepatitis B virus X protein enhances transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1alpha through activation of mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2003; 278: 39076-39084
- 9 Liu J, Lian Z, Han S, Wayne MM, Wang H, Wu MC, Wu K, Ding J, Arbuthnot P, Kew M, Fan D, Feitelson MA. Downregulation of E-cadherin by hepatitis B virus X antigen in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 1008-1017
- 10 朱荣, 李百周, 凌玉琴, 张慧萍, 李华, 刘晔, 胡锡琪, 朱虹光. 慢性乙型肝炎病毒感染与p16INK4A基因启动子甲基化关系的研究. *中华肿瘤杂志* 2007; 29: 166-170
- 11 Hamamoto R, Silva FP, Tsuge M, Nishidate T, Katagiri T, Nakamura Y, Furukawa Y. Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. *Cancer Sci* 2006; 97: 113-118
- 12 徐黎耀, 陈立波, 徐黎阳, 杨镇, 魏海燕, 钱华. RNA干扰SMYD3基因表达对诱导肝癌细胞凋亡的影响. *癌症* 2006; 25: 526-532
- 13 Chen LB, Xu JY, Yang Z, Wang GB. Silencing SMYD3 in hepatoma demethylates RIZ1 promoter induces apoptosis and inhibits cell proliferation and migration. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5718-5724
- 14 刘鑫, 陈立波, 叶进, 江军, 何军, 徐黎耀, 钱伟. shRNA干扰SMYD3对肝癌细胞c-Myc表达及凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 13: 1373-1377
- 15 Balsano C, Avantaggiati ML, Natoli G, De Marzio E, Will H, Perricaudet M, Levrero M. Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) X protein (pX) transactivate the cmc protooncogene at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176: 985-992
- 16 Tarn C, Lee S, Hu Y, Ashendel C, Andrisani OM. Hepatitis B virus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 34671-34680
- 17 Tsuge M, Hamamoto R, Silva FP, Ohnishi Y, Chayama K, Kamatani N, Furukawa Y, Nakamura Y. A variable number of tandem repeats polymorphism in an E2F-1 binding element in the 5' flanking region of SMYD3 is a risk factor for human cancers. *Nat Genet* 2005; 37: 1104-1107
- 18 Choi BH, Choi M, Jeon HY, Rho HM. Hepatitis B viral X protein overcomes inhibition of E2F1 activity by pRb on the human Rb gene promoter. *DNA Cell Biol* 2001; 20: 75-80

■同行评价

本文选题符合该领域的研究热点, 设计科学合理, 统计处理恰当, 结论可靠, 具有一定的学术价值.

编辑 潘伯荣 电编 吴鹏朕