

组蛋白三甲基化转移酶 SETD2 对肺腺癌上皮—间充质转化的影响

陈睿, 杨欣, 赵伟庆, 方成, 季枚
(苏州大学附属第三医院 常州市第一人民医院, 江苏 常州 213003)

摘要: [目的] 研究组蛋白三甲基化转移酶 SETD2 与肺腺癌的临床相关性及其在肺腺癌组织中的表达, 探讨 SETD2 对肺腺癌细胞株 A549 和 H1975 增殖、迁移、侵袭能力及上皮—间充质转化(EMT)过程的影响。[方法] 结合癌症基因组图谱数据库(TCGA), 分析 SETD2 的表达水平与肺腺癌患者总生存期(OS)的相关性。分别应用 Real-time PCR 和 Western blot 方法检测 SETD2mRNA 和蛋白在人肺腺癌组织芯片(包含 12 对肺腺癌组织标本)中的表达情况。构建慢病毒载体过表达 Lv-SETD2-A549、Lv-SETD2-H1975 稳转细胞株, 沉默 Si-SETD2-A549、Si-SETD2-H1975 稳转细胞株及阴性对照组 Lv-NC、Si-NC 稳转细胞株。通过细胞计数试剂盒(CCK-8)法、细胞划痕和 Transwell 小室实验, 分别检测过表达和沉默 SETD2 对细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。采用 Western blot 方法比较 4 组细胞株中 EMT 相关蛋白上皮型钙黏附蛋白(E-cadherin)、神经性钙黏附蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)及正常对照组(GADPH)的表达水平差异; 应用免疫荧光法检测 4 组间 E-cadherin、Vimentin 的表达水平。[结果] (1) SETD2 表达与肺腺癌患者 OS 成正相关($P=0.014$)。 (2) SETD2mRNA 和蛋白在肺腺癌组织中表达明显下降, 且与临床分期明显相关($P=0.001$)。 (3) 与 Lv-NC 组相比, A549 和 H1975 在 SETD2 过表达组中 SETD2mRNA 和蛋白显著升高, 细胞相对增殖活性(A549-0h: 0.18 ± 0.02 , A549-24h: 0.22 ± 0.04 , A549-48h: 0.35 ± 0.06 , A549-72h: 0.55 ± 0.05 ; H1975-0h: 0.21 ± 0.02 , H1975-24h: 0.31 ± 0.04 , H1975-48h: 0.43 ± 0.03 , H1975-72h: 0.71 ± 0.09), 细胞穿膜数(A549: 54.00 ± 11.23 ; H1975: 57.13 ± 10.28)均显著下降, 迁移间距(A549: 0.65 ± 0.09 ; H1975: 0.51 ± 0.10)降低; 这些指标, 在 SETD2 沉默组中恰恰相反。 (4) 与阴性对照组相比, 过表达 SETD2 可上调 A549、H1975 细胞株中 E-cadherin 的蛋白表达水平, 而下调 N-cadherin、Vimentin 的蛋白表达水平; 这些指标在 SETD2 沉默组中则相反; 免疫荧光实验结果显示过表达 SETD2 的 A549 和 H1975 组 E-cadherin 的红色荧光强度较 Lv-NC 组增强, 而 Vimentin 的绿色荧光较 Lv-NC 组明显减弱。 [结论] SETD2 在肺腺癌组织中表达下降, SETD2 低表达组患者 OS 较高表达明显下降。上调 SETD2 表达水平能够有效抑制肺腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 且逆转其发生 EMT, 抑制 SETD2 的表达则可诱导上述过程; SETD2 可能发挥抑癌作用。

关键词: 组蛋白三甲基化转移酶 SETD2; 肺腺癌; 增殖; 迁移; 侵袭; 上皮—间充质转化

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2020)02-0140-08

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2020.02.A010

Effect of Histone Methyltransferase SETD2 on the Epithelial-Mesenchymal Transition of Lung Adenocarcinoma

CHEN Rui, YANG Xin, ZHAO Wei-qing, FANG Cheng, JI Mei

(The Third Affiliated Hospital of Soochow University, The First People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213003, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effects of histone methyltransferase SETD2 expression on prognosis of patients with lung adenocarcinoma, and to investigate the effects of SETD2 on proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition(EMT) in lung adenocarcinoma cell line A549 and H1975. [Methods] The association of SETD2 expression with overall survival(OS) of patients was analyzed upon The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. The expression of SETD2mRNA and protein in lung adenocarcinoma tissue microarray (including 12 pairs of lung adenocarcinoma tissue samples) were detected by Real-time PCR and Western Blot respectively. Lentivirus-mediated SETD2 over-expression or silence in lung adenocarcinoma cell line A549 (Lv-SETD2-A549 or Si-SETD2-A549) and H1975(Lv-SETD2-H1975 or Si-SETD2-H1975) were constructed. The *in vitro* functional analysis, including proliferation, migration and invasion assays were performed by CCK-8, wound healing and transwell assays. The expression of EMT related proteins including E-cadherin, N-cadherin and Vimentin were compared with GADPH in 4 groups by Western Blot. The immunofluorescent assay was performed to detect the expres-

收稿日期: 2019-09-09; 修回日期: 2019-11-11

基金项目: 国家自然科学基金(81501971); 中国博士后科学基金(2018M630603); 江苏省自然科学基金(BK20150252);

江苏省“六大人才高峰”基金(WSW-142); 江苏省青年医学人才基金(QNRC2016279)

通信作者: 季枚, E-mail: zlkjime@163.com

sion of E-cadherin and Vimentin in 4 groups. [Results] (1)The expression level of SETD2 was positively related to the long-term prognosis of lung adenocarcinoma patients($P=0.014$). (2)The expression of SETD2 mRNA and protein in lung adenocarcinoma were significantly lower and correlated with the clinical stage ($P=0.001$). (3)Compared to the negative control Lv-NC,the expression level of SETD2mRNA and protein in Lv-SETD2 A549 and H1975 cells significantly increased,the relative cell proliferation activity(A549-0h: 0.18 ± 0.02 ,A549-24h: 0.22 ± 0.04 ,A549-48h: 0.35 ± 0.06 ,A549-72h: 0.55 ± 0.05 ;H1975-0h: 0.21 ± 0.02 ,H1975-24h: 0.31 ± 0.04 ,H1975-48h: 0.43 ± 0.03 ,H1975-72h: 0.71 ± 0.09) and the number of membrane penetration (A549: 54.00 ± 11.23 ;H1975: 57.13 ± 10.28) decreased,the length of cell migration spacing (A549: 0.65 ± 0.09 ;H1975: 0.51 ± 0.10) was shortened after SETD2 over-expression,the results were reversed when SETD2 silence. (4)The expression level of E-cadherin in A549 and H1975 cell lines was up-regulated by SETD2 over-expression,and the expression level of N-cadherin and Vimentin were down-regulated,the results were on the contrary after SETD2 silence. The immunofluorescent assay indicated that the E-cadherin red fluorescence intensity in Lv-SETD2-A549 and Lv-SETD2-H1975 groups were stronger than that in NC groups,whereas the Vimentin green fluorescence intensity in both 2 groups was significantly weaker than that in NC groups. [Conclusion] The expression of SETD2 in lung adenocarcinoma decreased and the low expression of SETD2 had an adverse influence on the prognosis of patients. The up-regulation of SETD2 can inhibit the cell proliferation,migration,invasion,and EMT of lung adenocarcinoma. SETD2 may act as a tumor suppressor.

Key words: histone methyltransferase SETD2;lung adenocarcinoma;cell proliferation;cell migration;cell invasion;epithelial-mesenchymal transition

肺癌为全球癌症死亡的主要原因^[1-2],靶向治疗、免疫治疗的快速发展,给肺癌治疗带来了新的曙光。近年来,表观遗传学逐渐成为研究热点,研究表明组蛋白甲基化转移酶参与多种细胞进程,其编码的基因突变及下游信号通路失活可导致肿瘤发生^[3]。组蛋白三甲基化转移酶 SETD2 是哺乳动物体内唯一的特异性催化组蛋白三甲基化的酶^[4-5],最早由人造血干细胞分离出^[6],与白血病^[3,7]、透明细胞肾癌^[8-11]、胃癌^[12-13]、中枢神经系统肿瘤^[14]、骨肉瘤^[15]等多种肿瘤的发生、发展密切相关。已有研究证实 SETD2 在肿瘤组织中呈低表达,并与不良预后相关^[8,16],揭示 SETD2 可能发挥抑癌作用^[17],但其具体机制尚不清楚。SETD2 在肺腺癌中研究较少,本研究探讨 SETD2 对肺腺癌细胞增殖、迁移、侵袭能力及上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)影响,以期对肺腺癌的治疗提供新的、可能的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料

利用癌症基因组图谱数据库(The Cancer Genome Alta,TCGA) 简易下载工具包从 TCGA 数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov>) 下载肺腺癌数据集的临床资料。RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公

司,逆转录试剂盒和实时定量 PCR 试剂盒均购自 Qiagen 公司。相关引物由苏州泓迅生物科技有限公司合成;SETD2 引物序列上游:5'-ATCGAGAGAG-GACGCGCTATT-3',下游:5'-AGGTACGCCTTGAG-TATGTCTT-3';E-cadherin 上游引物:5'-GAGTGC-CAACTGGACCATTTCAGTA-3',下游引物:5'-AGT-CACCCACCTCTAAGGCCATC-3';N-cadherin 上游引物:5'-AACCCCTATTTTGCCCCCAAT-3',下游引物:5'-TCAACATGGTACCGGCATGA-3';Vimentin 上游引物:5'-GACCTCTACGAGGAGGAGAT-3',下游引物:5'-TTGTCAACATCCTGTCTGAA-3';GAPDH 上游引物:5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游引物:5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。人肺腺癌组织芯片购于上海芯超生物科技有限公司;RPMI 1640 培养基购自美国 HyClone 公司;胎牛血清(FBS)购于美国 Gibco 公司;慢病毒载体及稳转细胞株(Lv-SETD2、Si-SETD2 和 Lv-NC)的构建由上海吉凯生物公司完成;细胞计数试剂盒(CCK-8)购自于上海碧云天生物技术有限公司,Transwell 小室购自于美国 Corning 公司,Metrigel 胶购自于美国 BD 公司;上皮型钙黏附蛋白(E-cadherin)、神经性钙黏附蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)及内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体均购于美国 Abcam 公司。倒置显微镜为德国莱卡公司产品(LeicaD-

MI3000B 型); 实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)仪为美国 ABI 公司产品(7300 型)。

1.2 实验方法

1.2.1 实时定量聚合酶链反应(Real-time PCR)

将肺腺癌组织及正常肺组织剪碎,TRIZOL 一步法提取癌组织及正常肺组织总 RNA,逆转录 PCR 反应严格按照试剂说明书操作。实时荧光定量 PCR 反应体系:cDNA 2 μ l,水 6.8 μ l,SYBR 10 μ l,上、下游引物各 0.4 μ l,ROX 0.4 μ l。扩增参数:预变性 95 $^{\circ}$ C 30s(1 个循环);PCR 反应 95 $^{\circ}$ C 5s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C 31s(40 个循环);溶解曲线分析。每份样本均重复 3 次,取其 CT 值的均值。数据结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析肺腺癌组织较正常肺组织 SETD2mRNA 改变的倍数, $\Delta\Delta CT=(CT_{\text{靶基因}}-CT_{\text{内参}})_{\text{正常肺组织}}-(CT_{\text{靶基因}}-CT_{\text{内参}})_{\text{腺癌组}}$ 。

1.2.2 Western blot 检测蛋白表达

收集细胞加入 RIPA 细胞裂解液,离心取上清,测定蛋白浓度,加入 2 $\times$ 1 加样缓冲液煮沸 5min,后经 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,再转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,孵育相应一抗(1:5000)于 4 $^{\circ}$ C 过夜,加二抗孵育 2h,后置于显影仪下显影,用 Quantity One 图像分析软件对图片进行灰度值扫描,记录各组目的和内参蛋白的表达量,目的基因的蛋白相对表达量以目的/内参表示。

1.2.3 细胞培养

将肺腺癌细胞株 A549、H1975 在含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液中,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂,保持饱和湿度培养,2~3d 传代 1 次。

1.2.4 CCK-8 实验检测细胞增殖能力

按 4×10^7 个/孔的浓度将处于对数生长期的细胞接种至 96 孔板,每孔设 5 个复孔;在慢病毒感染细胞 0~72h 时,分别用 PBS 洗 3 次,加入 100 μ l 培养液和 10 μ l CCK-8 检测试剂,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 4h。用自动酶标仪在 450nm 波长处测定吸光度(A)值,参比波长为 600nm,测定各孔的 A 值。细胞相对增殖活力=处理组 A 值/空白对照组 A 值。

1.2.5 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

将对数生长期的细胞消化接种到 6 孔板中,待细胞融合度达 60%左右,用无菌枪头在 6 孔板中均匀划线;用磷酸盐缓冲液(PBS)洗去漂浮细胞,然后

更换新鲜培养基,置于细胞培养箱中继续培养;24h 后,取出细胞,在荧光倒置显微镜下拍照(放大倍数 $\times 100$),测量细胞迁移距离。

1.2.6 Transwell 小室侵袭实验检测细胞侵袭能力

将 30 μ l 液化的 Matrigel 基质胶均匀铺于 Transwell 小室的微孔膜上,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 120min,使 Matrigel 聚合成胶。使用不完全培养基调整细胞密度至 1×10^8 /L,取细胞悬液 100 μ l 加入 Matrigel 小室,下室加入 500 μ l 含 20% FBS 的培养基。将细胞培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24h。用棉签擦去基质胶和上室的细胞,移去小室,倒置,风干,后将小室置于 0.1%结晶紫中,37 $^{\circ}$ C 30min 后取出,PBS 清洗 2 次,在荧光倒置显微镜下随机选取 3 个视野,照相($\times 100$)并计数。

1.2.7 免疫荧光检测

晾干细胞图片样本,浸入 4%的多聚甲醛固定液中。将放有切片的耐高温塑料染色架放入盛有抗原修复缓冲液的烧杯中,高温煮沸后冷却,每张切片滴加 2 滴 3% H₂O₂-甲醇溶液,室温(15 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)封闭 10min。滴加即用型山羊血清 50~100 μ l,室温孵育 20min。滴加一抗(1:200 稀释)50~100 μ l,37 $^{\circ}$ C,湿盒孵育 2h。滴加 Alex488/Alex549 标记的荧光二抗 50~100 μ l,37 $^{\circ}$ C,避光孵育 1h。每张片子滴加配制 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染液 50~100 μ l,室温避光放置 5min。用防萃灭封片胶封片。荧光显微镜下观察细胞中蛋白的表达,取 3 个高表达区域拍照保存。

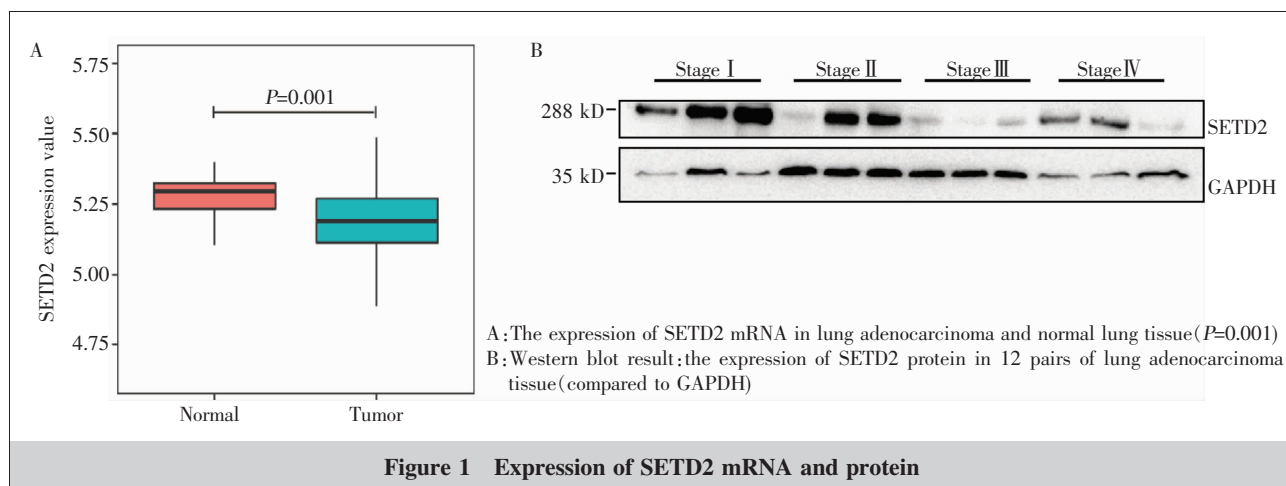
1.3 统计学处理

应用 GraphPad Prism 6.0 统计软件分析,生存分析采用 Kaplan-Meier 法及 Log-rank 检验。实验数据均经 SPSS18.0 统计软件处理,组间均数比较采用独立样本 *t* 检验, $P<0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 临床相关性分析

本研究从 TCGA 数据集下载、整理、分析了 522 例肺腺癌患者的临床数据和 SETD2 的表达信息,其中男性患者 242 例(46.4%,242/522),女性 280 例(53.6%,280/522);平均年龄(65.7 $\pm$ 10.5)岁。临床分期 I a~b 期 199 例(38.1%,199/522),II a~b 期 74 例



(14.2%, 74/522), III a~b 期 37 例 (7%, 37/522), IV 期 10 例 (2%, 10/522), 202 例分期情况缺失 (38.7%, 202/522)。分析 522 例肺腺癌患者 SETD2 的表达情况与临床预后的关系, 结果显示 SETD2 高表达肺腺癌患者 OS 较低表达患者显著延长 ($P=0.014$)。

2.2 SETD2 在肺腺癌组织标本中的表达

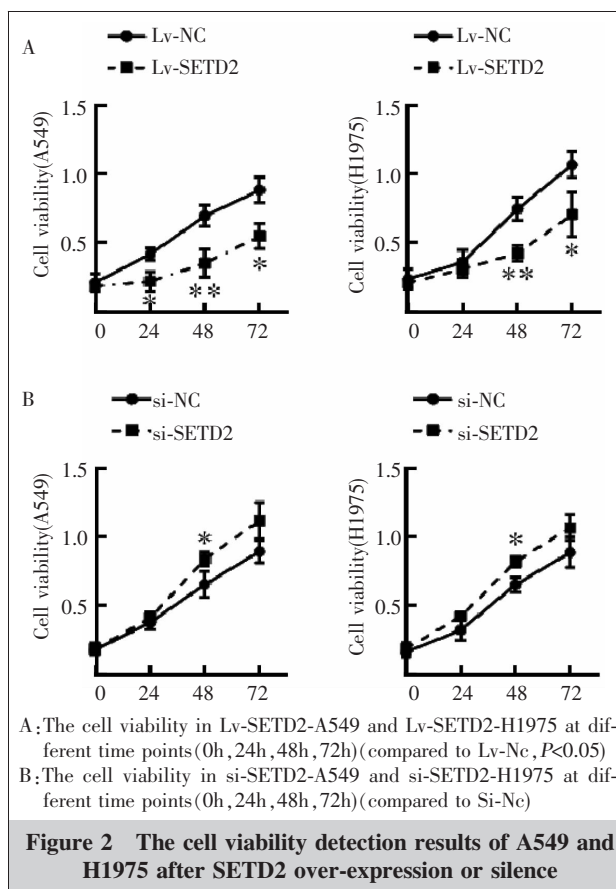
通过 Real-time PCR 检测人肺腺癌组织芯片 (包含 12 对肺腺癌组织标本及正常肺组织) 中 SETD2 mRNA 的表达, 利用 GAPDH 作为内参, 结果提示 SETD2 mRNA 在肺腺癌组织中表达较正常肺组织明显下降 ($P=0.001$) (Figure 1A); Western blot 检测 12 对肺腺癌组织中 (其中 I、II、III、IV 期各 3 例) SETD2 蛋白的表达, 利用 GAPDH 作为内参, 结果显示, SETD2 蛋白在肺腺癌组织中表达较低, 且与肺腺癌分期明显相关 (Figure 1B)。

2.3 细胞增殖能力检测

与阴性对照组相比, 在慢病毒转染后的第 0~72h 过表达 Lv-SETD2-A549 细胞的相对增殖活力显著降低, 第 24~72h 过表达 Lv-SETD2-H1975 细胞的相对增殖活力显著降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$) (Figure 2A); 相反, 沉默 si-SETD2-A549 和 si-SETD2-H1975 细胞的相对增殖活力均稍有增高 (Figure 2B)。表明过表达 SETD2 能明显抑制肺腺癌 A549、H1975 细胞的增殖能力。

2.4 细胞迁移能力检测

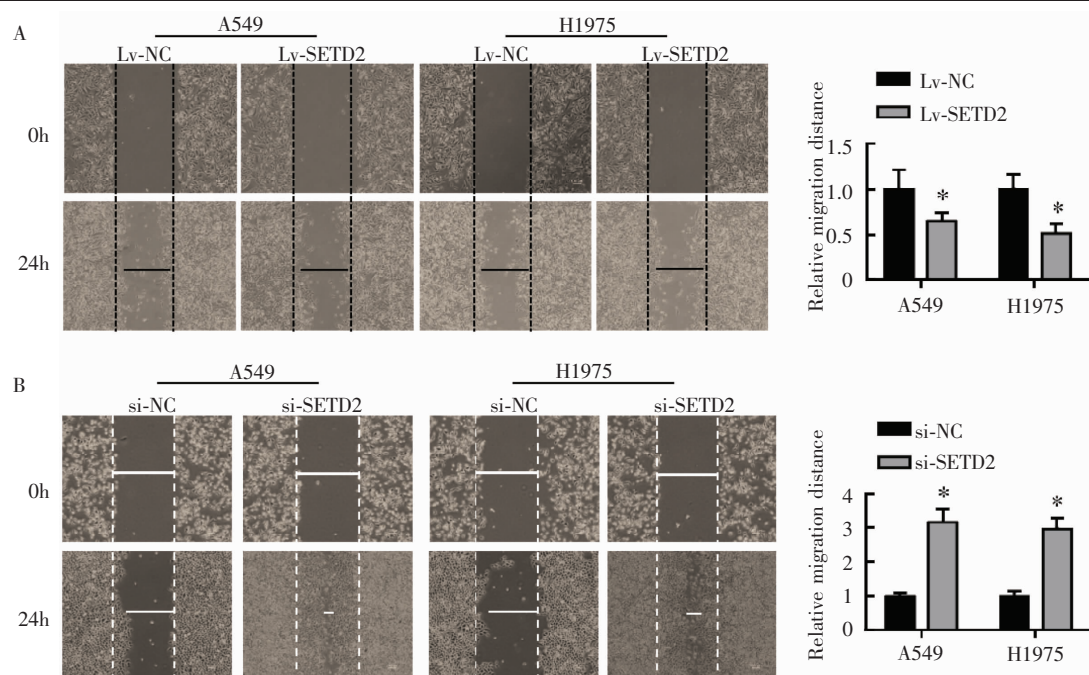
与阴性对照组相比, 过表达 Lv-SETD2-A549、Lv-SETD2-H1975 细胞的迁移能力均稍减弱 (Figure 3A); 相反, 沉默 si-SETD2-A549、si-SETD2-H1975 细胞的迁移能力均显著增加, 细胞大量迁入划痕区域, 差异均具有统计学意义 ($P<0.05$) (Figure 3B)。沉默



si-SETD2-A549、si-SETD2-H1975 细胞的迁移间距分别为 A549: 3.15 ± 0.38 ; H1975: 2.95 ± 0.33 , 较阴性对照组 si-NC (A549: 1.00 ± 0.15 ; H1975: 1.00 ± 0.18) 明显减少。表明沉默 SETD2 对肺腺癌 A549、H1975 的细胞迁移均有明显促进作用。

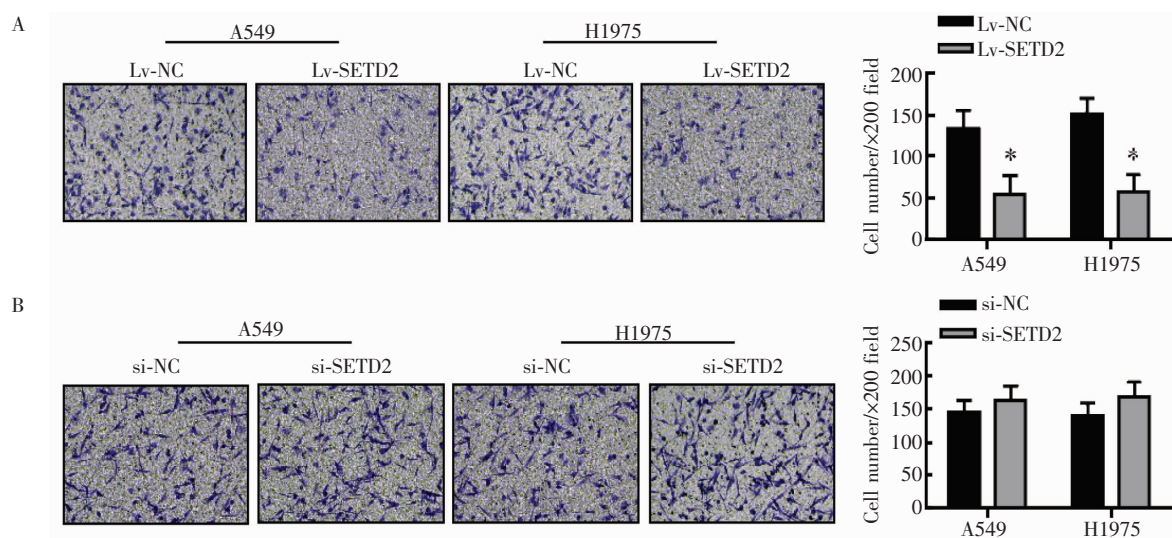
2.5 细胞侵袭能力检测

过表达 Lv-SETD2-A549、Lv-SETD2-H1975 细胞穿膜数分别为 54.00 ± 11.23 ; 57.13 ± 10.28 , 与阴性对



A: The cell migration ability in Lv-SETD2-A549 and Lv-SETD2-H1975 at different time points (0h, 24h) (compared to Lv-NC)
B: The cell migration ability in si-SETD2-A549 and si-SETD2-H1975 at different time points (0h, 24h) (compared to Si-NC, $P < 0.05$)

Figure 3 The cell migration ability detection results of A549 and H1975 after SETD2 over-expression or silence



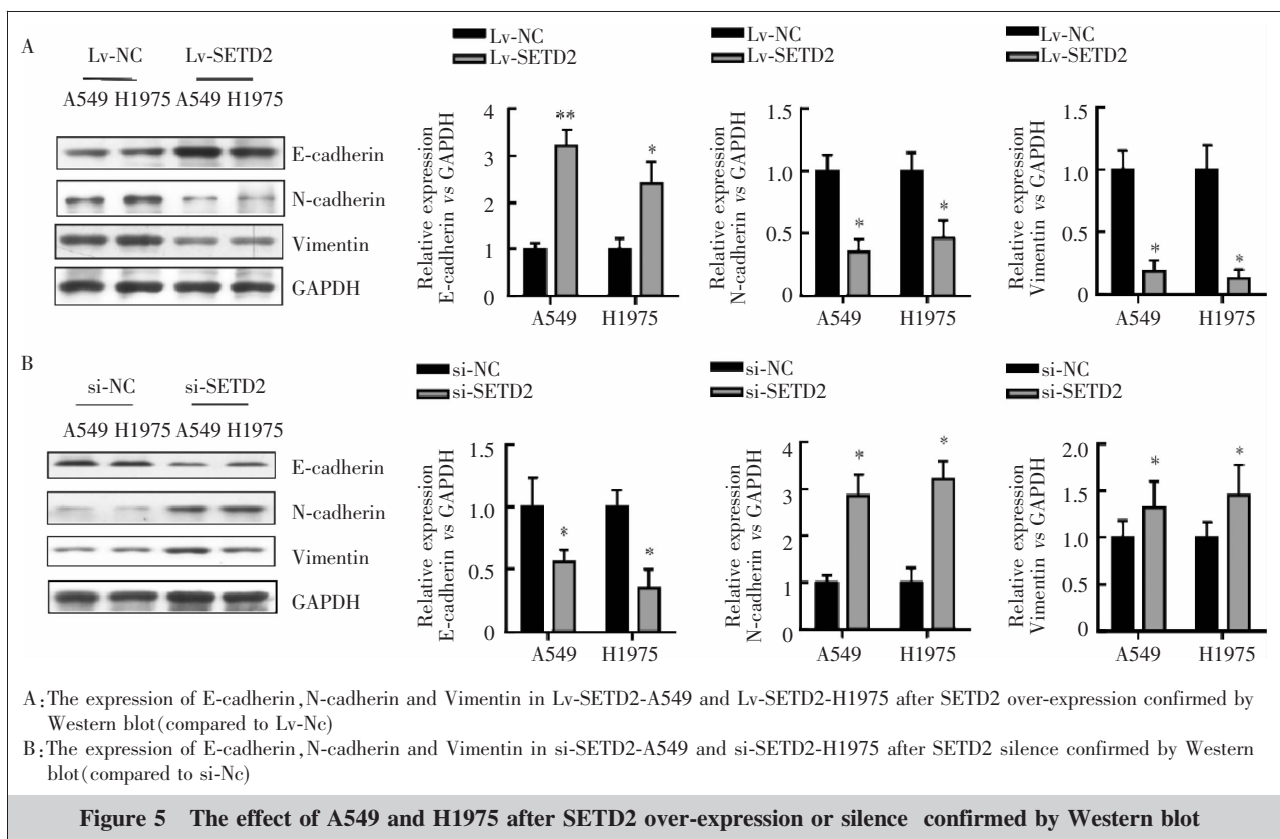
A: The cell invasion ability in Lv-SETD2-A549 and Lv-SETD2-H1975 (compared to Lv-NC, $P < 0.001$)
B: The cell invasion ability in si-SETD2-A549 and si-SETD2-H1975 (compared to Si-NC)

Figure 4 The cell invasion ability detection results of A549 and H1975 after SETD2 over-expression or silence ($\times 100$)

照组细胞穿膜数(A549: 135.25 ± 10.89 ; H1975: 151.75 ± 9.34)相比均显著减少, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.001$) (Figure 4A)。沉默 si-SETD2-A549、si-SETD2-H1975 细胞穿膜数稍有增加 (Figure 4B)。表明过表达 SETD2 能明显抑制肺腺癌 A549、H1975 的细胞侵袭能力。

2.6 Western blot 方法检测 SETD2 对 EMT 相关蛋白表达的影响

与阴性对照组相比, 以 GAPDH 为内参, 过表达 Lv-SETD2-A549、Lv-SETD2-H1975 后上皮细胞标志物 E-cadherin 的蛋白表达水平明显增加, 间质细胞标志物 N-cadherin、Vimentin 的蛋白表达水平明显



下降 (Figure 5A); 相反, 沉默 si-SETD2-A549、si-SETD2-H1975 后上皮细胞标志物 E-cadherin 的蛋白表达水平明显下降, 间质细胞标志物 N-cadherin、Vimentin 的蛋白表达水平明显增加 (Figure 5B)。

2.7 免疫荧光实验结果

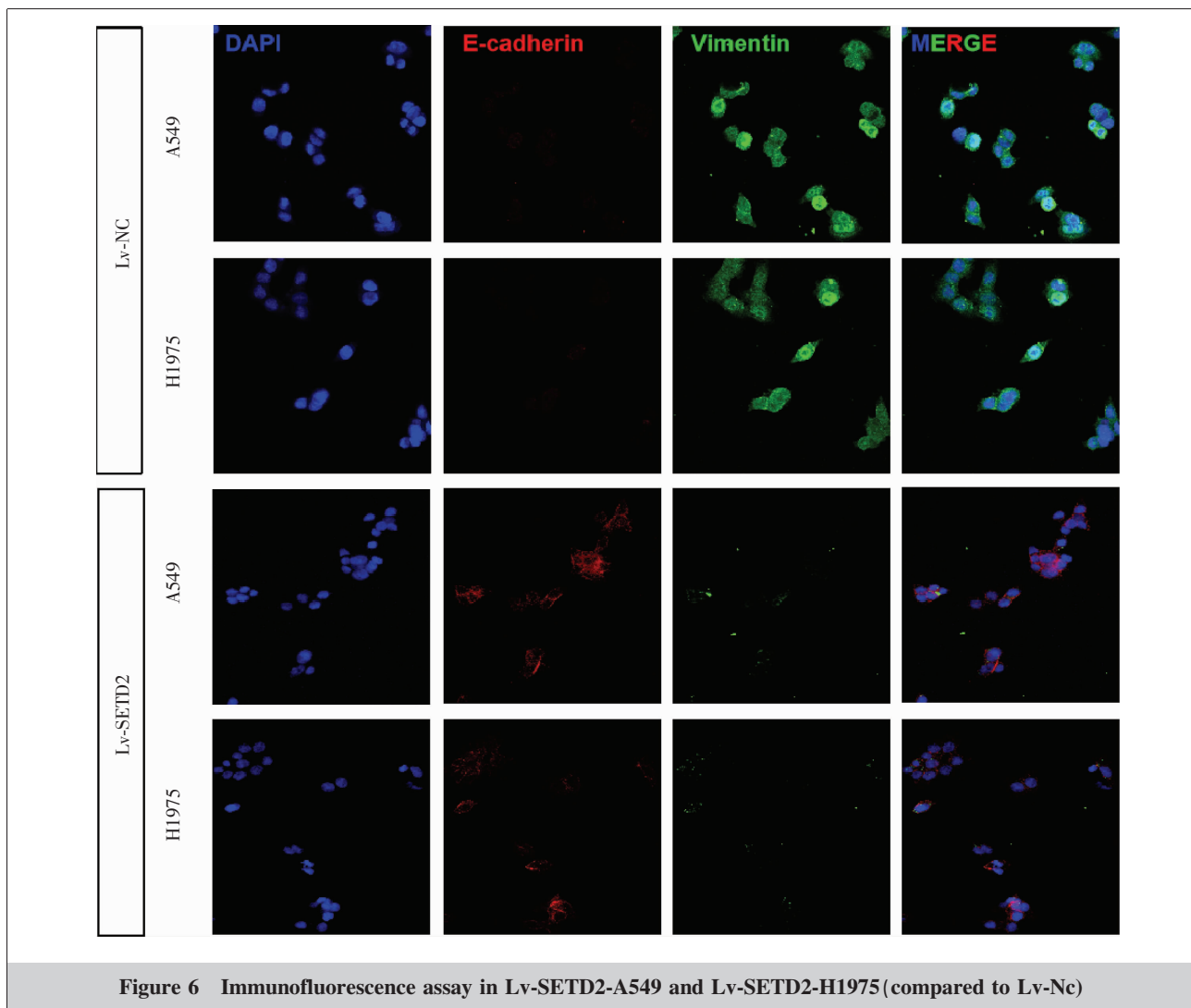
与阴性对照组 Lv-NC 相比, 过表达 Lv-SETD2-A549、Lv-SETD2-H1975 组的 E-cadherin 的红色荧光均增强, Lv-SETD2-A549 组显著增强; 而 Vimentin 的绿色荧光均明显减弱 (Figure 6)。表明过表达 SETD2 能够逆转肺腺癌 A549、H1975 细胞株由多边形上皮样形态转变为梭形间叶性细胞形态, 在形态学上逆转肺腺癌细胞的 EMT 过程。

3 讨论

肺癌是全世界发病率和死亡率均较高的恶性肿瘤^[1-2]; 在男性患者中, 发病率和死亡率均居第一位; 在女性患者中, 发病率居第三位, 死亡率居第一位。肺癌是目前全球发生率和死亡率增长最快的肿瘤, 其中非小细胞肺癌占 80%~85%, 而肺腺癌的比例非常高。手术、化疗、靶向治疗、免疫治疗及放疗

等使肺癌患者的 5 年生存率有所提高, 但仍未达到理想水平。因此, 研究肺腺癌发病的分子机制有助于发现新的治疗靶点。

SETD2 (也称为 Huntingtin interacting protein, HYPB) 是哺乳动物体内唯一的特异性三甲基化转移酶, 最早从造血干细胞中分离, 被认为与亨廷顿病相关。SETD2 编码基因位于人类染色体 3P21.31 区^[18]。SETD2 蛋白主要由以下部分组成: 酶活性区域 [包括 AWS 域 (associated with SET)、SET 域、PS 域 (post SET)], 蛋白结构域 [WW 域 (tryptophan-tryptophan)、CC 域 (Coiled-Coiled) 和 SRI 域 (Set2-Rpb1 interacting)], 还有一些区域尚待进一步研究。SETD2 与 RNA 聚合酶 II 的最大亚基结合, 形成转录延长复合物, 参与转录调控过程^[3,19]; SETD2 可参与人类 DNA 同源重组修复和错配修复^[20-21], 从而保持基因稳定性; SETD2 还参与非组蛋白相关过程, 如有丝分裂过程, SETD2 促进染色体分离从而保证基因组稳定^[22-23]。已有研究显示, SETD2 在多种实体肿瘤中均发生突变, 在胃癌中, SETD2 mRNA 和蛋白的表达较癌旁组织明显下降, 提示 SETD2 表达水平与胃癌的预后相关, 进一步研究显示过表达 SETD2



后能明显抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭,可能与p53的活性下调相关^[12];SETD2在透明细胞肾癌中频繁突变,SETD2突变和H3K36me3的表达下降,与肿瘤分期相关,且常常提示不良预后,SETD2突变和H3K36me3表达的缺失导致细胞无法完成DNA损伤修复、可变剪接,从而导致肿瘤发生^[24-25]。近期有研究显示,SETD2突变也发生在血液系统肿瘤中,SETD2的缺失与白血病相关,可能发挥抑癌基因作用^[3]。

本研究结合TCGA数据库中522例肺腺癌患者数据进行临床相关性分析,结果显示SETD2的表达水平与患者的OS成正相关,SETD2低表达对肺腺癌患者预后具有不良影响。通过Real-time PCR和Western blot检测显示,SETD2 mRNA和蛋白在肺腺癌中表达明显下降,且临床分期越晚,表达越低。我

们通过慢病毒感染的方法分别构建过表达SETD2的肺腺癌细胞Lv-SETD2-A549、Lv-SETD2-H1975,沉默SETD2的肺腺癌细胞Si-SETD2-A549、Si-SETD2-H1975,探讨SETD2对肺腺癌细胞表型的影响。通过CCK8、细胞划痕和Transwell小室实验分别证实了过表达SETD2的肺腺癌细胞A549、H1975较阴性对照组的增殖能力、侵袭能力显著增加,沉默SETD2的肺腺癌细胞A549、H1975较阴性对照组的迁移能力显著增加。另外,EMT过程是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程,我们的研究也显示,表达SETD2后上皮细胞标志物相关蛋白表达明显增加,间质细胞标志物相关蛋白表达下降,免疫荧光同样证实了该结果,表明过表达SETD2能够逆转肺腺癌A549、H1975细胞株由多边形上皮样形态转变为梭形间叶性细胞形

态,在形态学上逆转肺腺癌细胞的 EMT 过程。本研究结果提示,SETD2 在肺腺癌发生、发展中发挥抑癌作用,有望成为肺腺癌治疗的新靶点。

由于 SETD2 在肺腺癌中的研究较少,综合已往研究与本次实验结果,我们发现上调 SETD2 的表达水平能够有效抑制肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力,且逆转其发生 EMT,而抑制 SETD2 的表达则可诱导上述过程。因此,SETD2 可能发挥抑癌基因作用,但具体机制尚待进一步研究阐明。

参考文献:

- [1] Reck M,Heigener DF,Mok T,et al. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments[J]. *Lancet*, 2013,382(9893):709-719.
- [2] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016,66(2):115-132.
- [3] Skucha A,Ebner J,Grebien F. Roles of SETD2 in leukemia-transcription, DNA-damage, and beyond[J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(5). pii: E1029.
- [4] Medaniel SL,Strahl BD. Shaping the cellular landscape with Set2/SETD2 methylation[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(18):3317-3334.
- [5] Hacker KE,Fahey CC,Shinsky SA,et al. Structure/function analysis of recurrent mutations in SETD2 protein reveals a critical and conserved role for a SET domain residue in maintaining protein stability and histone H3 lys-36 trimethylation[J]. *J Biol Chem*, 2016,291(40):21283-21295.
- [6] Cui A,Cui L. The relationship between histone H3 lysine36-specific methyltransferase SETD2 and tumor progress [J]. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, 2016,23 (1):119-123.[崔昂,崔龙. 组蛋白三甲基转移酶 SETD2 与肿瘤发生发展的关系 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2016,23 (1):119-123.]
- [7] Wang XF,Dong F,Wang YJ,et al. Research progress of histone methyl-transferase SETD2[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2015,37(4):565-570.[王晓芳,董芳,王娅婕,等. 组蛋白甲基化转移酶 SETD2 研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2015,37(4):565-570.]
- [8] Liu J,Hanavan PD,Kras K,et al. Loss of SETD2 induces a metabolic switch in renal cell carcinoma cell lines toward enhanced oxidative phosphorylation[J]. *J Proteome Res*, 2019,18(1):331-340.
- [9] Liu W,Fu Q,An H,et al. Decreased expression of SETD2 predicts unfavorable prognosis in patients with non-metastatic clear-cell renal cell carcinoma[J]. *Medicine*, 2015, 94(45):e2004.
- [10] Elgendy M,Fusco JP,Segura V,et al. Identification of mutations associated with acquired resistance to sunitinib in renal cell cancer[J]. *Int J Cancer*, 2019,145(7):1991-2001.
- [11] Li L,Miao W,Huang M,et al. Integrated genomic and proteomic analyses reveal novel mechanisms of the methyltransferase SETD2 in renal cell carcinoma development[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2019,18(3):437-447.
- [12] Chen Z,Raghoonundun C,Chen W,et al. SETD2 indicates favourable prognosis in gastric cancer and suppresses cancer cell proliferation, migration, and invasion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018,498(3):579-585.
- [13] Huang KK,Mcpherson JR,Tay ST,et al. SETD2 histone modifier loss in aggressive GI stromal tumours[J]. *Gut*, 2016,65(12):1960-1972.
- [14] Viaene AN,Santi M,Rosenbaum J,et al. SETD2 mutations in primary central nervous system tumors[J]. *Acta Neuropathologica Communications*, 2018,6(1):123.
- [15] Jiang C,He C,Wu Z,et al. Histone methyltransferase SETD2 regulates osteosarcoma cell growth and chemosensitivity by suppressing Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018,502(3):382-388.
- [16] Ettel M,Zhao L,Schechter S,et al. Expression and prognostic value of NSD1 and SETD2 in pancreatic ductal adenocarcinoma and its precursor lesions [J]. *Pathology*, 2019,51(4):392-398.
- [17] Walter DM,Venancio OS,Buza EL,et al. Systematic inactivation of chromatin-regulating enzymes identifies Setd2 as a potent tumor suppressor in lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2017,77(7):1719-1729.
- [18] Xu Q,Xiang Y,Wang Q,et al. SETD2 regulates the maternal epigenome, genomic imprinting and embryonic development[J]. *Nat Genet*, 2019,51(5):844-856.
- [19] Wen H,Li Y,Xi Y,et al. ZMYND11 links histone H3.3K36me3 to transcription elongation and tumour suppression[J]. *Nature*, 2014,508(7495):263-268.
- [20] Pfister SX,Ahrabi S,Zalmas LP,et al. SETD2-dependent histone H3K36 trimethylation is required for homologous recombination repair and genome stability [J]. *Cell Rep*, 2014,7(6):2006-2018.
- [21] Fang J,Huang Y,Mao G,et al. Cancer-driving H3G34V/R/D mutations block H3K36 methylation and H3K36me3-MutS α interaction[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018,115 (38):9598-9603.
- [22] Park IY,Powell RT,Tripathi DN,et al. Dual chromatin and cytoskeletal remodeling by SETD2[J]. *Cell*, 2016,166 (4):950-962.
- [23] Carvalho S,Vitor AC,Sridhara SC,et al. SETD2 is required for DNA double-strand break repair and activation of the p53-mediated checkpoint[J]. *eLife*, 2014,3:e02482.
- [24] Ho TH,Park IY,Zhao H,et al. High-resolution profiling of histone h3 lysine 36 trimethylation in metastatic renal cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2016,35(12):1565-1574.
- [25] Duns G,van den Berg E,van Duivenbode I,et al. Histone methyltransferase gene SETD2 is a novel tumor suppressor gene in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2010,70(11):4287-4291.