

病毒白细胞介素 6 对甲基转移酶 1 表达的影响

徐 建,许雨乔,潘世扬*,彭姗姗,黄 蕾,孙瑞红

(南京医科大学第一附属医院检验学部,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:观察病毒白细胞介素 6(viral interleukin-6, vIL-6)对甲基转移酶 1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)表达的影响。方法:vIL-6 真核表达质粒转染 293T 细胞,荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 法检测 DNMT1 表达的变化,比色法检测 DNMT1 的活性。结果:荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 均表明 vIL-6 可显著促进 DNMT1 的表达,且 vIL-6 能上调 DNMT1 的活性。结论:vIL-6 能诱导 DNMT1 的表达,可能是卡波济肉瘤相关疱疹病毒(KSHV)致 DNA 甲基化异常,促进肿瘤发生发展的分子机制之一。

[关键词] vIL-6; 甲基转移酶 1; 卡波济肉瘤相关疱疹病毒

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)02-160-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20130203

Effects of interleukin-6 on the expression of DNA methyltransferase1

Xu Jian, Xu Yu-qiao, Pan Shiyang*, Peng Shanshan, Huang Lei, Sun Ruihong

(Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of viral interleukin-6 (vIL-6) on the expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1). **Methods:** The eukaryotic expression plasmid carrying vIL-6 gene was transferred into 293T cells. The expression of DNMT1 was examined by quantitative RT-PCR and Western blot. DNMT1 activity was analyzed by colorimetry. **Results:** Quantitative RT-PCR and Western blot demonstrated that vIL-6 increased the expression of DNMT1. Furthermore, vIL-6 upregulated the activity of DNMT1. **Conclusion:** vIL-6 can induce the expression of DNMT1. It may be one of the molecular mechanisms of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus(KSHV)-induced DNA methylation abnormalities and oncogenesis.

[Key words] vIL-6; DNMT1; KSHV

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(2): 160-163]

卡波济肉瘤相关疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma associated herpesvirus, KSHV), 又称人类疱疹病毒 8 型 (human herpesvirus 8, HHV-8), 与卡波济肉瘤 (Kaposi's sarcoma, KS)、原发性渗出性淋巴瘤 (primary effusion lymphoma, PEL) 和多中心卡斯特莱曼病 (multicentric Castleman's disease, MCD) 等肿瘤密切相关^[1]。

病毒白细胞介素 6(viral interleukin-6, vIL-6) 由

KSHV 裂解基因 K2 编码, 是 KSHV 重要的致癌因子。vIL-6 是 IL-6 的类似物, 氨基酸序列同源性达 24.8%, 二者具有相似的生物学功能^[2]。IL-6 是一种多功能细胞因子, 在体内对多种细胞有调节作用, 它是骨髓瘤、浆细胞瘤和 B 细胞的生长因子, 且与许多肿瘤的发生密切相关^[3]。Hodge 等^[4]发现 IL-6 能通过促进 DNA 甲基转移酶 1 (DNA methyltransferase 1, DNMT1) 的高表达, 导致基因组甲基化异常, 促进肿瘤的形成。本研究旨在通过观察 vIL-6 对细胞中 DNMT1 表达的影响, 初步探索其促进 KSHV 相关肿瘤发生发展的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚肾 293T 细胞(HEK 293T 细胞, 简称 293T)

[基金项目] 国家自然科学基金资助(30901262); 江苏省自然科学基金(BK2009440); 江苏省实验诊断学重点实验室基金(XK201114); 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划项目(ky102j201205)及江苏高校优势学科建设工程基金

*通信作者(Corresponding author), E-mail: sypan@njmu.edu.cn

及质粒 pcDNA3.1 为本室保存;含 vIL-6 基因的重组真核表达质粒 pvIL-6-Flag^[5]由南京医科大学微生物免疫学系卢春教授惠赠。

逆转录试剂盒和 PCR 扩增试剂(TaKaRa 公司,日本);抗 vIL-6 抗体(Abbiotec 公司,美国),抗 DNMT1、抗 GAPDH 抗体 (Cell Signaling 公司,美国);HRP 标记的羊抗兔 IgG 和 ECL 化学发光检测试剂盒(Millipore 公司,美国);蛋白抽提试剂盒(Bipec Biopharma 公司,美国);DNMT1 活性检测试剂盒(Epigentek 公司,美国);RPMI-1640 培养基、胎牛血清及胰蛋白酶(Gibco 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 转染

转染前 24 h,以每孔 5×10^5 个 293T 细胞接种 6 孔板,选用脂质体 Lipofectamine 2000,按制造商提供的方法及用量,将质粒 pvIL-6-Flag 以 2.5 μg /孔加入 293T 细胞中;并设转染空载体及未转染细胞的对照孔。

1.2.2 荧光定量 RT-PCR 检测 DNMT1 mRNA

转染后 48 h,TRIzol 法提取细胞总 RNA,逆转录成 cDNA,并行 SYBR Green 荧光定量 RT-PCR 检测。DNMT1 扩增的上游引物:5'-GGCTGAGAT-GAGGCAAAAAG-3';下游引物:5'-ACCAACTCG-CTACAGGATGC-3'。同时以 β -actin 为内参,上游引物:5'-TGGCACCCAGCACAATGAA-3';下游引物:5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,35 个循环,随后进行熔解曲线分析。每个样本设 3 个复管,同时设无模板阴性对照。通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行 DNMT1 表达的相对定量。

1.2.3 Western blot 分析

转染后 48 h,裂解细胞,提取总蛋白并进行蛋白定量。处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,电转移至 PVDF 膜后,用 5%脱脂奶粉封闭。所用一抗分别为抗 vIL-6 和 DNMT1 抗体,稀释度均为 1:1 000;二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG,稀释度均为 1:2 000。最后用 ECL 化学发光底物检测膜上的抗原-抗体复合物,通过 X 线片显示结果。

1.2.4 DNMT1 活性的检测

提取细胞核蛋白,并用 BCA 法定量。按 DNMT1 活性检测试剂盒说明书所示方法,加入包被有富含胞嘧啶核苷酸的 96 孔板,再相继加入抗 5mC 抗体、酶标二抗和底物,用酶标仪检测各孔 450 nm 处光密度值。每份样本均设 3 个复孔。

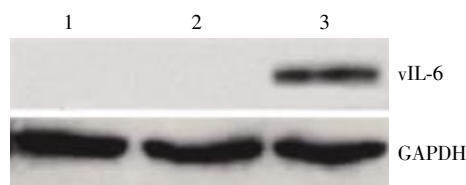
1.3 统计学方法

使用 SPSS13.0 统计软件,先进行方差齐性分析,然后用方差分析比较组间差异,LSD 法进行组间两两比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 vIL-6 在 293T 细胞中表达的鉴定

以抗 vIL-6 单抗为一抗,行 Western blot 鉴定。结果显示,vIL-6 抗体可特异性识别 pvIL-6-Flag 质粒转染的 293T 细胞中的蛋白,表现为在约 25 000 处见一特异性条带,与预期蛋白大小相似;而空载体转染细胞和未转染的细胞在相应位置均无特异性条带出现(图 1),表明 vIL-6 基因转染入 293T 细胞,并在其中表达。



1: 未转染的 293T 细胞;2:pcDNA3.1 空载体转染的 293T 细胞;3:pvIL-6-Flag 转染的 293T 细胞。

图 1 Western blot 检测 vIL-6 在 293T 细胞中的表达

Figure 1 Western blot analysis of expression of vIL-6 in 293T cells

2.2 DNMT1 mRNA 和蛋白质水平的检测

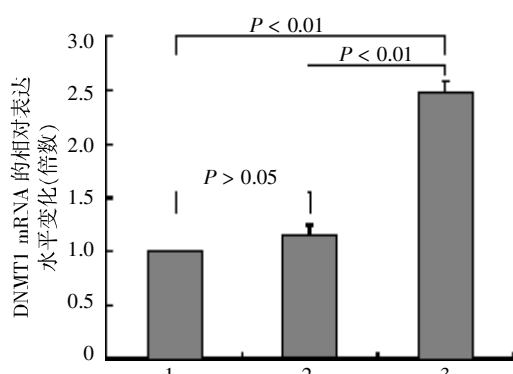
转染后 48 h,荧光定量 RT-PCR 检测结果表明,vIL-6 转染组的 DNMT1 mRNA 表达量明显高于空载体转染组和未转染的对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01, n = 3$),后两者之间 DNMT1 mRNA 的表达差异无统计学意义($P = 0.467, n = 3$,图 2)。Western blot 结果也显示,转染 vIL-6 基因后,293T 细胞中 DNMT1 蛋白的表达量较空载体转染组和未转染的对照组明显升高(图 3),提示 vIL-6 能上调 DNMT1 的表达。

2.3 DNMT1 活性的检测

vIL-6 转染组的 DNMT1 活性较空载体转染组和未转染的对照组均明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.01, n = 3$);后两者之间 DNMT1 活性无统计学差异($P = 0.391, n = 3$,图 4)。

3 讨论

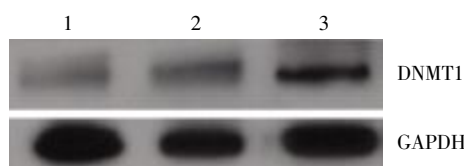
体外实验表明,vIL-6 能促进鼠杂交瘤细胞 B9 和人骨髓瘤细胞 INA-6 的生长^[6-7]。稳定表达 vIL-6 的 NIH3T3 细胞接种裸鼠的实验显示,vIL-6 能促进



1: 未转染的 293T 细胞; 2: pcDNA3.1 空载体转染的 293T 细胞; 3: pvIL-6-Flag 转染的 293T 细胞。

图 2 DNMT1 mRNA 的相对表达水平的变化

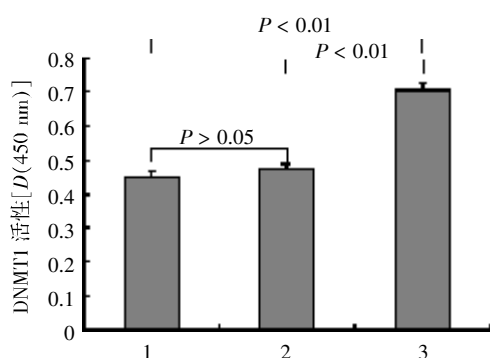
Figure 2 Comparison of relative expression of DNMT1 mRNA



1: 未转染的 293T 细胞; 2: pcDNA3.1 空载体转染的 293T 细胞; 3: pvIL-6-Flag 转染的 293T 细胞。

图 3 Western blot 检测 DNMT1 的表达

Figure 3 Western blot analysis of expression of DNMT1



1: 未转染的 293T 细胞; 2: pcDNA3.1 空载体转染的 293T 细胞; 3: pvIL-6-Flag 转染的 293T 细胞。

图 4 DNMT1 活性的检测

Figure 4 Analysis of DNMT1 activity

肿瘤的生长和荷瘤鼠恶病质的形成,且 vIL-6 的表达水平与肿瘤的生长呈正相关^[8]。Chen 等^[9]发现阻断 vIL-6 的表达能抑制 PEL 细胞的增殖。这些研究都提示 vIL-6 参与了 KSHV 致癌的过程,但其分子机制目前尚不清楚。Vart 等^[10]发现 vIL-6 能上调血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 和促血管生成素 2 (angiopoietin-2, Ang2) 等的表达,促进血管生成,可能是其致癌机制之一。

DNA 甲基化是基因表达调控的重要方式。DNA

甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMTs)是介导甲基化修饰的关键酶,主要包括 DNMT1、DNMT3a 和 DNMT3b。DNMT1 在 DNA 复制过程中发挥维持 DNA 甲基化的作用^[11]。肿瘤细胞内普遍存在高水平的 DNMTs, DNA 甲基化异常与肿瘤的形成密切相关^[12]。Hodge^[13]和 Wehbe^[14]分别发现 IL-6 能诱导骨髓瘤细胞和胆管癌细胞的 DNA 甲基化异常,促进肿瘤细胞的增殖和侵袭。Foran^[15]和 Li^[16]发现 IL-6 可通过上调 DNMT1 的表达,促进结直肠癌细胞的 DNA 甲基化状态的异常改变。而 Hodge^[4]的研究证实,IL-6 通过上调转录因子 Fli-1 的水平,促进 DNMT1 的表达。

由于 vIL-6 是 IL-6 的类似物,具有相似的生物学功能,本文推测 vIL-6 是引起 KSHV 相关肿瘤 DNA 甲基化异常的重要因素。本研究将 vIL-6 基因转染 293T 细胞,发现 DNMT1 在转录水平和表达水平均显著升高,而且 DNMT1 的活性明显上调。

近来,许多研究发现病毒蛋白通过各种信号通路影响 DNMT1,导致细胞 DNA 甲基化异常,参与肿瘤的形成。乙型肝炎病毒(HBV)的 HBx 蛋白、腺病毒的 E1a 蛋白和 BK 病毒的 T 抗原均可通过 Rb-E2F 通路,上调 DNMT1 的表达^[17-19]。EB 病毒的 LMP1 蛋白通过 C-Jun 氨基末端激酶通路,诱导 DNMT1 表达和活化,导致抑癌基因 E-cadherin 的甲基化^[20]。有关 KSHV 对细胞 DNA 甲基化的调控,目前国内外研究仅局限于潜伏期相关核抗原 (latency associated nuclear antigen, LANA)。LANA 能活化 DNMT3a,诱导转化生长因子 β 受体 2 (transforming growth factor-beta type II receptor, T β R II) 基因甲基化,抑制 TGF- β 信号通路,促进肿瘤的形成^[21-22]。结合本研究的结果,推测 vIL-6 和 LANA 可能分别作用于 DNMT1 和 DNMT3a,共同参与了 KSHV 对宿主细胞 DNA 甲基化的调控。

本研究结果表明 vIL-6 能上调 DNMT1 的表达,可能是 KSHV 致 DNA 甲基化异常,促进肿瘤发生发展的分子机制之一。有关 DNMT1 表达上调对细胞 DNA 甲基化状态的影响,特别是抑癌基因甲基化的改变,尚有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus [J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10 (10): 707-719
- [2] Nicholas J, Ruvolo VR, Burns WH, et al. Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues

- of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6 [J]. *Nat Med*, 1997, 3(3): 287-292
- [3] Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(16): 2502-2512
- [4] Hodge DR, Xiao W, Clausen PA, et al. Interleukin-6 regulation of the human DNA methyltransferase (HDNMT) gene in human erythroleukemia cells [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(43): 39508-39511
- [5] 陈秀英, 卢春, 程林, 等. 卡波济肉瘤相关疱疹病毒编码 IL-6 基因的分离克隆及在 NIH3T3 细胞中的表达研究 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2006, 26(10): 881-886
- [6] Moore PS, Boshoff C, Weiss, et al. Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV [J]. *Science*, 1996, 274(12): 1739-1744
- [7] Burger R, Neipel F, Fleckenstein B, et al. Human herpesvirus 8 interleukin-6 homologue is functionally active on human myeloma cells [J]. *Blood*, 1998, 91(6): 1858-1863
- [8] Aoki Y, Jaffe ES, Chang Y, et al. Angiogenesis and hematopoiesis induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded interleukin-6 [J]. *Blood*, 1999, 93(12): 4034-4043
- [9] Chen D, Sandford G, Nicholas J. Intracellular signaling mechanisms and activities of human herpesvirus 8 interleukin-6 [J]. *J Virol*, 2009, 83(2): 722-733
- [10] Vart RJ, Nikitenko LL, Lagos D, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encoded interleukin-6 and G-protein-coupled receptor regulate angiopoietin-2 expression in lymphatic endothelial cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(9): 4042-4051
- [11] Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(19-20): 2571-2587
- [12] Oh BK, Kim H, Park HJ, et al. DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation [J]. *Int J Mol Med*, 2007, 20(1): 65-73
- [13] Hodge DR, Peng B, Cherry JC, et al. Interleukin 6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(11): 4673-4682
- [14] Wehbe H, Henson R, Meng F, et al. Interleukin-6 contributes to growth in cholangiocarcinoma cells by aberrant promoter methylation and gene expression [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(21): 10517-10524
- [15] Foran E, Garrity-Park MM, Mureau C, et al. Upregulation of DNA methyltransferase mediated gene silencing, anchorage-independent growth, and migration of colon cancer cells by interleukin-6 [J]. *Mol Cancer Res*, 2010, 8(4): 471-481
- [16] Li Y, Deuring J, Peppelenbosch MP, et al. IL-6-induced DNMT1 activity mediates SOCS3 promoter hypermethylation in ulcerative colitis-related colorectal cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(10): 1889-1896
- [17] Jung JK, Arora P, Pagano JS, et al. Expression of DNA methyltransferase 1 is activated by hepatitis B virus X protein via a regulatory circuit involving the p16INK4a-cyclin D1-CDK 4/6-pRb-E2F1 pathway [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(12): 5771-5778
- [18] Burgers WA, Blanchon L, Pradhan S, et al. Viral oncoproteins target the DNA methyltransferases [J]. *Oncogene*, 2007, 26(11): 1650-1655
- [19] McCabe MT, Low JA, Imperiale MJ, et al. Human polyomavirus BKV transcriptionally activates DNA methyltransferase 1 through the pRb/E2F pathway [J]. *Oncogene*, 2006, 25(19): 2727-2735
- [20] Tsai CL, Li HP, Lu YJ, et al. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV LMP1 involves c-Jun NH(2)-terminal kinase signaling [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(24): 11668-11676
- [21] Shamay M, Krithivas A, Zhang J, et al. Recruitment of the de novo DNA methyltransferase Dnmt3a by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(39): 14554-14559
- [22] Di Bartolo DL, Cannon M, Liu YF, et al. KSHV LANA inhibits TGF-beta signaling through epigenetic silencing of the TGF-beta type II receptor [J]. *Blood*, 2008, 111(9): 4731-4740

[收稿日期] 2012-05-29