

乙型肝炎病毒 X 蛋白对 DNA 甲基转移酶 3A/3B 表达的影响

宋晓玲 李艳艳 谭德明 刘国珍

【摘要】 目的 观察乙型肝炎病毒 X 蛋白(HBx)对 QSG7701 细胞中 DNA 甲基转移酶(DNMT)3A/3B 表达的影响。**方法** 本研究室前期构建好的重组表达质粒 pcDNA-X 及空载体 pcDNA3.0 分别转染 QSG7701 细胞,经含 G418 的选择性培养基筛选获得稳定转染 HBV-X 基因的细胞克隆(pcDNA-X/QSG7701)及稳定转染空载体 pcDNA3.0 的细胞克隆(pcDNA3.0/QSG7701)。采用 RT-PCR、Western blot 分别检测转染细胞中 HBx mRNA 和 HBx 蛋白的表达。Real-time PCR 检测 3 种细胞 DNMT3A/3B mRNA 的表达情况。免疫组织化学法检测 3 种细胞 DNMT3A/3B 蛋白的表达情况。**结果** RT-PCR、Western blot 检测结果显示 pcDNA-X/QSG7701 细胞中有 HBx mRNA 及 HBx 蛋白的表达。Real-time PCR 结果显示 pcDNA-X/QSG7701 中 DNMT3A/3B mRNA 表达水平显著高于 pcDNA3.0/QSG7701 及未转染的细胞 QSG7701 ($P < 0.05$)。免疫组织化学检测结果显示 pcDNA-X/QSG7701 细胞中 DNMT3A/3B 蛋白表达水平显著高于 pcDNA3.0/QSG7701 及 QSG7701 细胞($P < 0.05$)。**结论** 稳定转染 HBV-X 基因的人源性永生非瘤性肝细胞 QSG7701 中 DNMT3A/3B mRNA 和蛋白的表达水平均显著升高,提示 HBV-X 基因在 mRNA 及蛋白水平能上调转染细胞中 DNMT3A/3B 的表达,而细胞中 DNMT3A/3B 表达的增加是否能进一步影响癌基因、抑癌基因的表达水平,从而导致细胞癌变,尚有待进一步研究。

【关键词】 乙型肝炎病毒 X 蛋白;乙型肝炎病毒;癌,肝细胞;DNA 甲基化转移酶 3A/3B

Effect of X protein of hepatitis B virus on expression of DNA methyltransferase 3A and 3B SONG Xiao-ling, LI Yan-yan, TAN De-ming, LIU Guo-zhen. Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China

Corresponding author: LIU Guo-zhen, Email: guozhenliu.2008@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective Immortalized human derived non-tumor liver cell line QSG7701 was used as target cell and recombinant expression plasmid encoding HBV-X

was stably transfected into QSG7701 cells, in which the expression of DNMT3A/3B were observed. **Methods** QSG7701 cells were transfected with the recombinant plasmid pcDNA-X or control plasmid pcDNA3.0. Medium containing G418 were used to screen stably transfected cell clones. Expression of HBx mRNA in HBV-X stably transfected QSG7701 cells was detected by semi-quantitative reverse-transcribe polymerase chain reaction (RT-PCR), and expression of HBx protein was confirmed by Western blot. Expression of DNMT3A/3B mRNA was detected by real-time quantitative PCR in recombinant plasmid transfected cells (pcDNA-X/QSG7701), empty vector transfected cells (pcDNA3.0/QSG7701) and untransfected QSG7701 cells, respectively. Expression of DNMT3A/3B in pcDNA-X/QSG7701 cells, pcDNA3.0/QSG7701 cells and QSG7701 cells were detected through immunocytochemistry. **Results** RT-PCR and Western blot analysis showed that HBV-X mRNA and HBx protein were expressed stably in pcDNA-X/QSG7701 cell line. Real-time quantitative PCR analysis showed that mRNA expression of DNMT3A and DNMT3B in pcDNA-X/QSG7701 cells were higher than that in pcDNA 3.0/QSG7701 cells and untransfected QSG7701 cells. Immunocytochemistry analysis showed that expression of DNMT3A and DNMT3B in pcDNA-X/QSG7701 cells were higher than that in pcDNA3.0/QSG7701 cells and untransfected QSG7701 cells. **Conclusions** HBx could up-regulate the expression of DNMT3A/3B mRNA and protein in transfected QSG7701 cells, which might affect the expression of some oncogene and anti-oncogene and result in malignant transformation in cells.

【Key words】 HBx; Hepatitis B virus; DNA methyltransferase 3A and 3B

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是我国常见的恶性肿瘤之一, 每年约 11 万人死于肝癌, 占全球肝癌死亡人数的 45%。大量流行病学调查表明, 长期慢性乙型肝炎病毒感染是导致原发性肝癌的主要原因, 有报道在乙型肝炎流行地区, 超过 80% 的肝癌患者存在 HBV 感染^[1], 提示 HBV 感染与 HCC 的发生密切相关。其中 HBx 在 HCC 发病中的作用逐渐受到重视, HBx 诱发人肝细胞癌变的机制尚不十分清楚, 但其作为一种致癌剂已得到广泛认同, 其对宿主细胞基因存在广泛影响, HBV DNA 整合入宿主基因组、抑癌基因失活和癌基因激活等与 HCC 的发生密切相关。除基因突变和染色体物质缺失外, 抑癌基因启动子异常甲基化是抑癌基因失活的第三种机制, 某些情况下是抑癌基因失活的唯一机制^[2]。目前已有大量研究显示肺癌、血液系统肿瘤等存在抑癌基因异常甲基化现象。DNA 甲基化是真核生物基因表达调控的一种方式, 是一种酶介导的化学修饰过程, 在 DNA 的某些碱基上增加 1 个甲基, 癌基因的低甲基化和抑癌基因超甲基化是肿瘤发生的重要机制。DNA 甲基化是由 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase) 催化并维持和调控的。在甲基转移酶的催化下, DNA 的 CpG 二核苷

酸的胞嘧啶被选择性地添加甲基,形成5-甲基胞嘧啶。DNA 甲基转移酶家族包括 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B。DNMT1 负责保持甲基化,主要作用于半甲基化的底物,存在于几乎所有体细胞中,在增殖细胞中高表达。DNMT3A 和 DNMT3B 则被认为是参与催化 DNA 的从头甲基化,在胚胎干细胞和早期胚胎中高度表达,在正常体细胞表达低,而在各种癌细胞中高表达^[3]。本研究旨在通过观察 HBx 对细胞中 DNA 甲基转移酶 3A/3B 表达的影响,进一步探索 HBV-X 致肝细胞癌变的分子机制。

材料与方法

一、实验材料与试剂

1. 表达质粒及细胞株:人源性肝细胞株 QSG7701 及空质粒 pcDNA3.0 为本研究室保存;含 HBV-X 基因的重组表达质粒 pcDNA-X/QSG7701 为本室构建并保存。

2. 主要试剂:逆转录试剂盒为 Fermentas 公司产品;蛋白质抽提试剂盒、ECL 化学发光试剂盒为 Invitrogen 公司产品;鼠抗人 HBx 单克隆抗体购自德国 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术公司;兔抗人 DNMT3A/3B 抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 为 Santa Cruz 公司产品;免疫组织化学 PV-6002 试剂盒、DAB 显色试剂盒为北京中杉金桥生物技术公司产品。

3. 引物:引物根据 GenBank,用 Primer premier 5 软件辅助设计,由 Invitrogen 公司合成。针对人 HBV-X 引物:正义:5'-AAGGTACCATGCTGCTAGGCTGTGCT-3';反义:5'-CTGGGCCCTTAGGCAGAGGTGGAAAAAGTTG-3',目的片段为 481 bp。针对人 DNMT3A 引物:正义:5'-CACAGAAGCATATCCAGGA-3';反义:5'-CACATTCTCAAAGAGCCAGA-3',目的片段为 181 bp;针对人 DNMT3B 引物:正义:5'-AGTATCAGGATGGGAAGGAG-3';反义:5'-CGATAGGAGACGAGCTTAT-TG-3',目的片段为 210 bp。

二、方法

1. 细胞培养及稳定转染:QSG7701 细胞、pcDNA-X/QSG7701 细胞、pcDNA3.0/QSG7701 细胞置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,适时换液、消化传代,培养基为高糖 DMEM 培养基中加入 10% 胎牛血清配成的完全培养基。细胞转染用 LIP02000 转染试剂,按产品说明书操作,分别将重组表达质粒 pcDNA3.0 及含 HBV-X 基因的重组表达质粒 pcDNA-X 转入 QSG7701 稳定转染,并给于含 G418 的培养基筛选 2 周左右。

2. RT-PCR 检测 pcDNA-X/QSG7701 细胞中 HBV-X mRNA 的表达:取对数生长期细胞,采用 Trizol 试剂盒提取细胞中的总 RNA,操作按逆转录试剂盒操作手册进行。PCR 扩增条件:94℃ 预变性 3 min,94℃ 30 s,68℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,扩增 35 个循环;最后,72℃ 再延伸 5 min。取扩增产物 6 μl,2% 琼脂糖凝胶,80 V 电泳 30 min,紫外分析仪观察结果。

3. Western blot 检测 pcDNA-X/QSG7701 细胞中 HBx 的表达:在冰上按蛋白提取试剂盒操作步骤提取细胞蛋白质。加入适量 $2 \times$ SDS 凝胶加样缓冲液(50 mmol/L Tris HCl, pH 6.8; 100 mmol/L DTT; 2% SDS; 0.1% 溴酚蓝; 10% 甘油), 100°C 煮沸 3 min, 使蛋白质变性, 经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转移至硝酸纤维素膜上, 硝酸纤维素膜在 5% 脱脂牛奶(5 g 脱脂牛奶 + 100 ml PBS) 中室温封闭 1 h, 分别加入特异性抗-HBx(1:50) 和抗-GAPDH(1:2 000), 37°C 水平摇床孵育 1 h, 4°C 过夜, PBS 充分洗涤后分别加入辣根过氧化物酶标记的相应二抗, 即猴抗羊 IgG(1:1 000) 和羊抗鼠 IgG(1:1 000), 37°C 水平摇床孵育 2 h, 充分洗涤后, 化学发光试剂(ECL) A 液和 B 液混合后加至硝酸纤维素膜上, 曝光 3~5 min, X 光片显影并定影观察结果。

4. Real-time PCR 检测细胞中 DNMT3A/3B mRNA 表达:取对数生长期细胞, 采用 Trizol 试剂盒提取细胞中的总 RNA, 操作按逆转录试剂盒操作手册进行, 置于 Real-time PCR 仪上, PCR 扩增标准程序: 95°C 30 s, 95°C 10 s, 62°C 30 s, 扩增 40 个循环; 每个 DNA 模板设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

5. 免疫细胞化学法检测细胞中 DNMT3A/3B 蛋白表达:按免疫组织化学试剂盒说明书进行操作。评分标准:用 IPP 分析免疫组织化学图片:(1)选取图片上具有染料色调的区域(AOI, area of interesting);(2)测量该区域的 IOD;(3)选择并测量有效统计区域的面积;(4)计算光密度平均值 IOD/area(mean density) 计算同一实验组切片各照片的平均及标准差;(5)用统计学方法分析各实验组的平均光密度(mean density)之间是否存在显著性差异。

三、统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 所有数据以均数 \pm 标准差表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、转染细胞中 HBX mRNA 的表达

pcDNA-X/QSG7701 细胞组总 RNA 经 PCR 扩增后在 500 bp 附近出现清晰的条带, 与预期的 481 bp 吻合, 而 pcDNA3.0/QSG7701 细胞和 QSG7701 细胞组无目的条带出现, 表明 pcDNA-X/QSG7701 细胞中存在 HBV-x 基因 mRNA 的表达, 图 1。

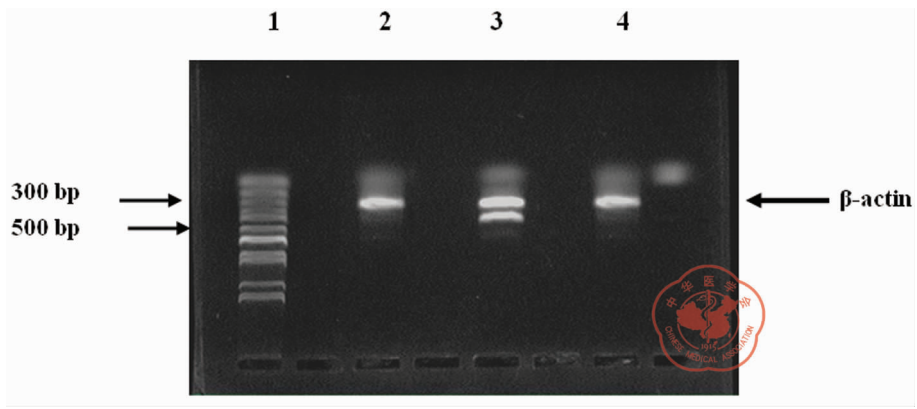


图 1 RT-PCR 检测转染细胞中 HBx mRNA 的表达

注: 1: DNA Marker; 2: QSG7701; 3: pcDNA-X/QSG7701; 4: pcDNA3.0/QSG7701

二、转染细胞中 HBx 的表达

pcDNA-X/QSG7701 细胞在分子量约 17 kD 处可检测到特异性蛋白条带, 与 HBx 的理论分子量一致, 而 pcDNA3.0/QSG7701 及未转染质粒的 QSG7701 细胞则未见 HBx 表达, 证实重组表达质粒 pcDNA-X 转染的 QSG7701 细胞能表达 HBx (图 2)。

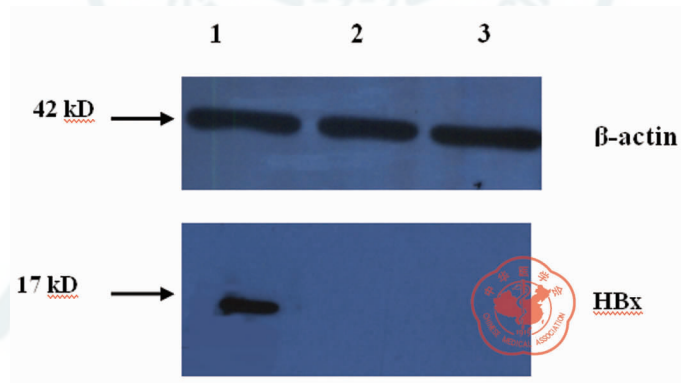


图 2 Western blot 检测转染细胞中 HBx 的表达

注: 1: pcDNA-X/QSG7701 细胞; 2: pcDNA3.0/QSG7701 细胞; 3: QSG7701 细胞

三、Real time-PCR 检测细胞中 DNMT3A 及 DNMT3B mRNA 的表达

pcDNA3.0-X/QSG7701 细胞、pcDNA3.0/QSG7701 细胞和 QSG7701 细胞中 DNMT3A mRNA 相对表达量平均值依次为 5.75 ± 0.91 、 1.21 ± 0.22 和 1.00。DNMT3B mRNA 相对表达量平均值依次为 3.79 ± 1.23 、 1.32 ± 0.57 和 1.00。pcDNA-X/QSG7701 细胞中 DNMT3A 及 DNMT3B mRNA 相对表达量显著高于

pcDNA3.0/QSG7701 细胞和 QSG7701 细胞 ($P < 0.05$); pcDNA3.0/QSG7701 细胞中 DNMT3A 及 DNMT3B mRNA 相对表达量较 QSG7701 细胞稍高, 但差异无统计学意义。

四、免疫组织化学检测细胞中 DNMT3A 及 DNMT3B 蛋白的表达

免疫组织化学法检测 pcDNA-X/QSG7701、pcDNA3.0/QSG7701 和 QSG7701 细胞中 DNMT3A、DNMT3B 蛋白表达, 以细胞内出现棕黄色颗粒为阳性。结果显示 3 组细胞均有 DNMT3A 及 DNMT3B 的表达, 阳性信号主要位于胞核, 胞浆亦有部分表达, 以 PBS 代替一抗的 QSG7701 细胞作为阴性对照未见阳性表达。计算 3 组细胞中 DNMT3A 及 DNMT3B 蛋白阳性表达区域的光密度平均值, 结果显示 pcDNA-X/QSG7701 细胞中 DNMT3A 及 DNMT3B 蛋白表达量显著高于 pcDNA3.0/QSG7701 细胞和 QSG7701 细胞 ($P < 0.05$), pcDNA3.0/QSG7701 细胞中两种蛋白表达较 QSG7701 细胞稍高, 但差异无统计学意义 (图 3~4)。

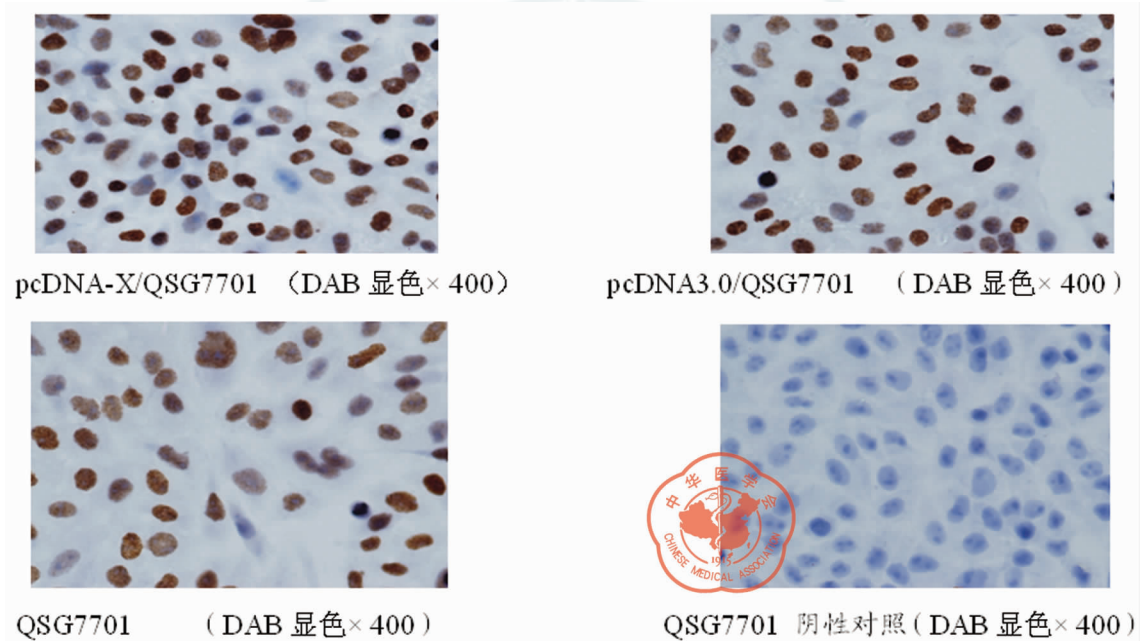


图3 各组细胞中 DNMT3A 的表达

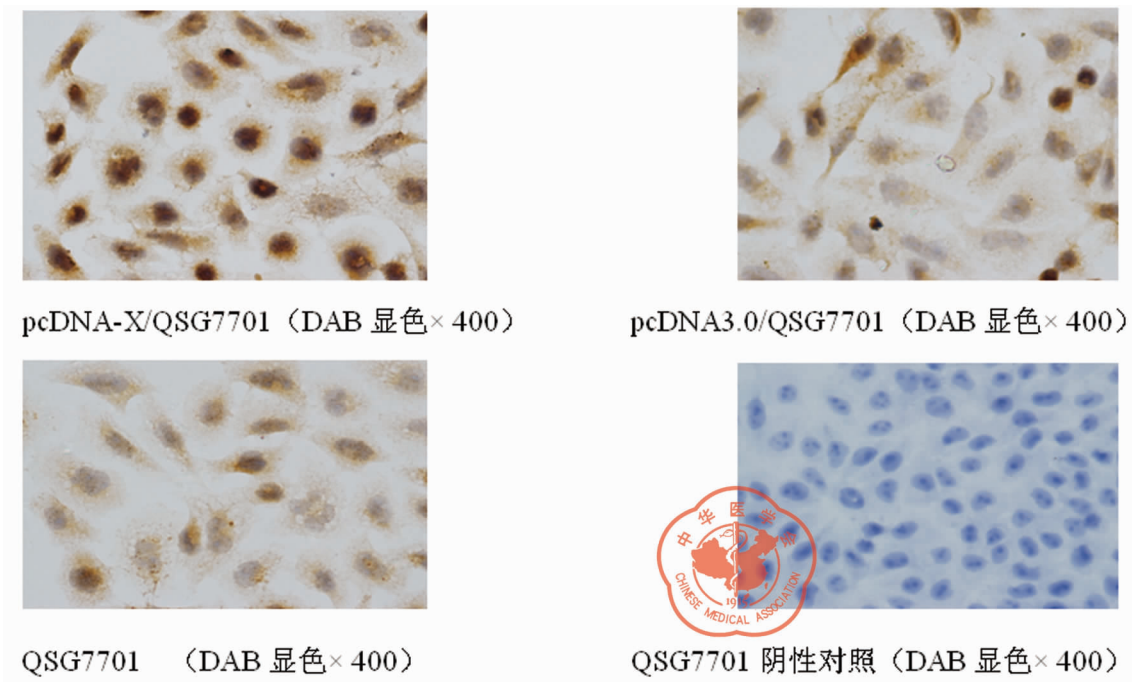


图 4 各组细胞中 DNMT3B 的表达

讨 论

HBx 作为一种致癌物,已被广泛认可。HBx 除对肝细胞的生长、转化、迁移和凋亡等重要过程产生影响外^[4],也可通过上调血管内皮生长因子(VEGF)的表达在 HBV 相关性肝癌组织的血管生成及转移中起作用^[5]。最近发现 HBx 也能通过上调热休克蛋白 90 α (HSP 90 α)的表达而增强肿瘤细胞的侵袭力^[6]。许多研究表明 HBV 感染所致的肝癌组织中,肝癌细胞存在严重的 DNA 甲基化紊乱,发现 DNA 出现广泛的低甲基化和局部区域(CpG 岛)的高甲基化,前者导致癌基因的正常表达,后者使众多的抑癌基因失活。DNA 的甲基化是在 DNA 甲基转移酶(DNMT)的催化下完成的,目前已知 DNA 甲基转移酶有 DNMT1、DNMT2、DNMT3A 和 DNMT3B 等几种,其在诸如结肠癌、胃癌、肝癌、膀胱癌等肿瘤组织中的表达和活性高于正常细胞,对肿瘤细胞某些基因的重新甲基化和维持其高甲基化状态起重要作用。DNMT3A/3B 是 DNA 甲基转移酶家族中重要的成员,主要作用于双链均未被甲基化的 DNA^[7]。DNMT3A 作用于非 CpG 岛的 DNA 甲基化反应, DNMT3B 催化特殊区域的 DNA 甲基化,如 CpG 岛^[8]。Park 等^[9]证明 HBV 的 X 蛋白不仅可以激活 DNMT1 和 DNMT3A 的表达,而且还可能招募 DNMT3A 和 CpG 岛甲基化连接蛋白 2(MECP2)到 IGF3 等基因的启动子区域,形成从头甲基化状态,进而抑制这些基因的表达。另外,其还在肝癌细胞株和肝癌组织中发现 HBx 可通过下调 DNMT3B 的表达,引起肝癌细胞的整体低甲基化,这提示 DNMTs 表达在肝癌的发生和发展中有着重要作用。目前研究较多的与肝癌关系较

大的抑癌基因是 p16^[10]、Ras 相关结构域家族蛋白 1A (RASSF1A)^[11]、细胞因子信号转导抑制因子 1 (SOCS1)^[12]、GSTP^[13] 等,这些基因均存在异常甲基化现象。有研究发现 HBx 能够在转录和翻译水平上调 DNMT1 和 DNMT3A,并且能诱导 p16INK4A 基因甲基化而抑制 p16 蛋白的表达,进而推测可能系 HBx 通过上调甲基化转移酶使抑癌基因启动子发生甲基化而失活^[14]。进一步研究显示靶向 HBx 的 siRNA 及甲基化抑制剂能够有效抑制肝细胞癌的生长,其机制可能是 HBx 的 siRNA 及甲基化抑制剂逆转了 HBx 诱导的 p16INK4A 基因甲基化而恢复了 p16 蛋白的表达及功能。另有研究发现肝细胞癌中 HBx 与甲硫氨酸腺苷转移酶 1A (MAT1A) 和甲硫氨酸腺苷转移酶 2A (MAT2A) 呈正相关,其能通过某些途径引起 MAT1A 启动子高甲基化、MAT2A 启动子低甲基化而改变 MATs 的表达状态^[15]。Jung 等^[16] 研究亦发现,HBx 能上调 DNA 甲基转移酶基因的表达,使细胞内某些重要的靶基因甲基化增加而功能下调。Zheng 等^[17] 研究表明,HBx 与 DNMT3A 蛋白作用导致部分基因调控元件高甲基化而使其转录表达沉默,另一些基因调控元件低甲基化而使其转录表达活化,这可能是 HBx 致肝细胞癌变的机制之一。

本研究选用人源性非瘤性肝细胞 QSG7701 细胞系,建立了 HBx 稳定转染的肝细胞模型,旨在通过观察 HBx 转染后 QSG7701 细胞中 DNMT3A、3B 的表达情况,进一步探讨 HBx 致肝细胞癌变的分子机制。经 RT-PCR 和 Western blot 证实,目的基因 HBV-X 已成功导入 QSG7701 细胞,并有转录产物及蛋白的表达。采用 Real-time PCR 和免疫组织化学法检测 QSG7701 细胞中 DNMT3A/3B 的 mRNA 和蛋白表达,结果表明 QSG7701 细胞中 HBx 的表达可从 mRNA 及蛋白水平显著上调 DNMT3A、DNMT3B 的表达,与 Jung 等研究结果一致^[16],而细胞中 DNMT3A、DNMT3B 表达上调可能影响某些癌基因、抑癌基因的表达水平,并最终导致肝细胞癌变,尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Nguyen VT, Law MG, Dore GJ. Hepatitis B-related hepatocellular carcinoma: epidemiological characteristics and disease burden. *J Viral Hepat*, 2009, 16(7):453-463.
- 2 段鸿飞, 傅瑜, 李琦, 等. 抑癌基因启动子过甲基化对肺癌临床研究的意义. *国际呼吸病杂志*, 2009, 29(12):729-733.
- 3 王志刚, 吴建新. DNA 甲基转移酶分类、功能及其研究进展. *遗传*, 2009, 31(9):903-912.
- 4 龚倩, 何松. HBx 蛋白生物学作用的研究进展. *世界华人消化杂志*, 2010, 18(34):3656-3661.
- 5 赵慧, 刘凯歌, 尚红利, 等. HBx 和 VEGF 与 HB 相关性肝癌组织血管生成及转移的关系. *肝脏*, 2010, 15(1):15-18.
- 6 Li W, Miao X, Qi Z, et al. Hepatitis B virus x protein upregulates HSP90alpha expression via activation of c-Myc in human hepatocarcinoma cell line, HepG2. *Virol J*, 2010, 7(45):1-10.
- 7 刘亮明, 罗文, 刘晶美, 等. HBx 在原发性肝癌发病中的作用及其生物治疗策略. *世界胃肠病学杂志*, 2005, 13(4):432-439.
- 8 张勇敢, 刘保池. DNA 甲基转移酶的作用及甲基化在肿瘤发生中的作用. *国际外科学杂志*, 2008, 35(8):537-540.
- 9 Park IY, Sohn BH, Yu E, et al. Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus x protein. *Gastroenterology*, 2007, 132(4):1476-1494.
- 10 张吉才, 吕军, 李海平, 等. 血浆 p16 启动子甲基化在肝癌诊断中的应用价值. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(10):895-

898.

- 11 Schagdarsurengin U, Wilkens L, Steinemann D, et al. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2003, 22(10):1866-1871.
- 12 Chu PY, Yeh CM, Hsu NC, et al. Epigenetic alteration of the SOCS1 gene in hepatocellular carcinoma. *Swiss Med Wkly*, 2010, 140(10):w13065.
- 13 Yang B, Guo MZ, Herman JG, et al. Aberrant promoter methylation profiles of tumor suppressor genes in hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol*, 2003, 163(3):1101-1107.
- 14 Zhu YZ, Zhu R, Shi LG, et al. Hepatitis B virus x protein promotes hypermethylation of p16(INK4A) promoter through upregulation of DNA methyltransferases in hepatocarcinogenesis. *Exp Mol Pathol*, 2010, 89(3):268-275.
- 15 王栋锋, 刘志苏, 刘权焰, 等. 肝细胞癌中 HBx 和 MATs 基因启动子甲基化的关系. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(2):242-244.
- 16 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. *Cancer Res*, 2007, 67(12):5771-5778.
- 17 Zheng DL, Zhang L, Cheng N, et al. Epigenetic modification induced by hepatitis B virus x protein via interaction with de novo DNA methyltransferase DNMT3A. *J Hepatol*, 2009, 50(2):377-387.

(收稿日期:2011-05-10)

(本文编辑:孙荣华)

宋晓玲, 李艳艳, 谭德明, 等. 乙型肝炎病毒 x 蛋白对 DNA 甲基转移酶 3A/3B 表达的影响[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2011, 5(4):394-402.

