

乙肝病毒 X 蛋白对肝癌细胞组蛋白 H3K4 甲基化修饰的影响及机制

叶 华¹, 孙 健¹, 徐鋈耀¹, 张建龙¹, 肖治宇¹, 何传超¹, 何 波², 王 捷^{1*}
(中山大学孙逸仙纪念医院, 1.肝胆外科; 2.麻醉科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨乙肝病毒 X 蛋白(HBx)与肝癌细胞组蛋白 H3K4 位点甲基化修饰的关系及其可能的机制。【方法】构建稳定表达 HBx 基因的 HepG2-hbx 及载体对照细胞系 HepG2-vc, 同时培养用于阳性对照的肝癌细胞系 HepG2.2.15 及阴性对照细胞系 HepG2; 用酶标法检测各组细胞组蛋白 H3K4 位点甲基转移酶活性, 比较 HBx 对 H3K4 位点甲基转移酶活性的影响; qRT-PCR 检测各组细胞中 H3K4 位点特异性甲基转移酶 SMYD3 (SET and MYND domain containing3) 基因转录水平变化; Western-blot 检测 SMYD3 蛋白表达水平变化; 免疫组化方法检测 84 例肝癌组织(包含: HbsAg(+))58 例, HbsAg(-)26 例)中 SMYD3 与组蛋白 H3K4me3 表达情况并对结果进行统计分析。【结果】稳定表达 HBx 基因的肝癌细胞系其组蛋白 H3K4 位点甲基化活性显著高于对照组细胞($P < 0.05$), 且 SMYD3 表达上调($P < 0.05$); 肝癌组织组蛋白 SMYD3 表达与患者是否存在 HBV 感染有关, 并且促进 H3K4 甲基化修饰。【结论】HBx 上调肝癌细胞组蛋白 H3K4 位点甲基转移酶活性, 这可能与介导的 SMYD3 表达上调有关, 并且在肝癌组织中由 HBx 介导的 SMYD3 上调也增强了组蛋白 H3K4 甲基化修饰。

关键词: HBx; 肝细胞癌; 组蛋白甲基转移酶; 甲基化

中图分类号: R73.7 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2013)02-0182-06

Effect of Hepatitis B Virus X Protein on Histone H3K4 Methylation in Hepatocellular Carcinoma and Its Potential Mechanism

YE Hua¹, SUN Jian¹, XU Jun-yao¹, ZHANG Jian-long¹, XIAO Zhi-yu¹, HE Chuan-chao¹, HE Bo², WANG Jie^{1*}
(1.Department of Hepatobiliary Surgery; 2.Department of Anesthesiology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the relation between HBx protein expression and H3K4 methylation in hepatocellular carcinoma and its potential mechanism. 【Methods】 Cell line HepG2-HBx that is able to stably express HBx and control cell line HepG2-vc was constructed and cultured, as well as positive control HepG2.2.15 and negative control HepG2. Histone H3K4 methyltransferase activity was detected by using ultraviolet spectrophotometer, and we explored the effect of HBx on Histone H3K4 methyltransferase activity. Using qRT-PCR and Western-blot to evaluate the change of expression level of SMYD3 (SET and MYND domain containing3) in each cell groups. Detecting the expression level of SMYD3 and H3K4me3 with immunohistochemical staining (HbsAg+ 58 cases, HbsAg- 26 cases) and finally statistically analyzing the results. 【Results】 Histone H3K4 methyltransferase activity and the expression level of SMYD3 in cell line that express HBx are stably significantly higher than that of negative control groups ($P < 0.05$). Moreover, the expression of SMYD3 is directly relevant to the HBV infection in HCC tissue sample, and promoting the methylation of histone H3K4. 【Conclusion】 HBx enhance the activity of histone H3K4 methyltransferase in hepatoma cells, and the potential mechanism may be related to HBx-regulated expression of SMYD3, which also promote the methylation of histone H3K4 in HCC tissue.

Key words: HBx; hepatocellular carcinoma; histone methyltransferase; methylation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(2): 182-187]

收稿日期: 2012-10-29

基金项目: 国家自然科学基金(30700803)

作者简介: 叶华, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 肝胆胰肿瘤防治, E-mail: heb@mail.sysu.edu.cn; * 通信作者: 王捷, 教授, 博士, 博士生导师, E-mail: sumsujw@yahoo.com.cn

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)是临床常见的恶性肿瘤,HBV感染被认为是肝癌发生的主要危险因素^[1-3],但HBV诱导肝癌发生分子机制仍未清楚。目前研究认为,乙肝病毒X蛋白(hepatitis B virus X protein, HBx)是HBV致肝癌发生的核心分子因素^[4-5]。尽管现阶段研究部分揭示了HBx致肝癌发生的作用途径,如:激活JAK/STAT、PI-3K/AKT信号转导通路^[6-7];与转录因子AP1、AP2、NF- κ B等结合反式激活癌基因转录^[8];影响肝细胞基因组稳定性、促进细胞恶性转化等功能^[9],但其确切的分子生物学机制尚未完全阐明。近年来有研究认为HBx参与细胞表观遗传修饰^[10-11],但对肝癌细胞表观遗传修饰的影响及其机制尚不清楚。本实验以稳定表达HBx蛋白的肝癌细胞模型为研究平台,应用酶活性检测、qRT-PCR及免疫组化等实验方法观察HBx蛋白对肝癌细胞组蛋白H3K4位点甲基化修饰的影响,并探讨其可能机制,从表观遗传学角度阐述HBx致肝癌发生作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 HBx真核表达质粒PCDNA3.1+HBx 体外化学合成HBx完整DNA序列(supplement 1),将该片段插入pcDNA3.1+载体酶切位点Hind III及EcoR I之间,质粒经酶切及测序鉴定,成功构建出PCDNA3.1+HBx质粒,该工作由上海生工协助完成。

1.1.2 细胞系和肝癌组织微阵列(TMAs) 肝癌细胞系HepG2、HepG2.2.15购自中科院典型培养物保藏委员会细胞库。肝癌组织标本为中山大学孙逸仙纪念医院病理中心保存的2000年6月至2005年12月原发性肝癌术后石蜡组织,加工成84例组织微阵列,取样大小为直径1 mm,每例患者样本取2点,共168点,患者资料见表1。

1.1.3 主要试剂和仪器 主要试剂包括anti-HBx鼠抗人单克隆抗体(Santa Cruz USA);anti-SMYD3兔抗人多克隆抗体(Santa Cruz USA);anti-H3K4me3抗体(cell signaling technology);组蛋白H3K4甲基转移酶活性检测试剂盒(Epigentek Group Inc. catalog No. P-3002);两步法免疫组化试剂盒(PV-6001/6002,中杉金桥);SYBR Green PCR buffer (TAKARA Japan)。主要仪器包括

Wellsan Mk3酶标仪(Labsystems Dragon);LC480荧光定量PCR仪(Roche USA);SDS-PAGE蛋白电泳及转膜系统(Bio-Rad, USA)。

1.2 实验方法

1.2.1 稳定表达细胞系构建及细胞培养 按lipofectamin 2000质粒转染操作步骤分别将PCDNA3.1+HBx质粒及PCDNA3.1+空载体转染至HepG2细胞,转染后细胞使用含800 ng/mL G418、100 mL/L胎牛血清DMEM高糖培养基培养14 d,挑选G418抗性单克隆并扩增,细胞稳定生长后进行western-blot鉴定HBx表达(supplement 2),载体对照细胞系HepG2-vc采用相同方法培养;阳性对照细胞HepG2.2.15及阴性对照细胞HepG2方法使用含100 mL/L胎牛血清DMEM高糖培养基培养。

1.2.2 组蛋白H3K4位点甲基转移酶活性检测

操作步骤按照Epigentek检测试剂盒说明进行,各组细胞核蛋白定量后取10 μ g/孔与底物共培养90 min,显色并终止后进行酶标仪450 nm读数各组吸光度值。根据试剂盒说明,甲基转移酶活性计算公式为:

$$A/(h^{-1} \cdot mg^{-1}) = \frac{D_x - D_{空白}}{m_{NP}/g \cdot t/h} \times 1000$$
 其中, D_x 为未加抑制剂的吸光度, m_{NP} 为所加核蛋白量, t 为核蛋白与底物孵育时间)。每次实验每样品3复孔,实验重复2次。

1.2.3 qRT-PCR检测各组细胞HBx与SMYD3 mRNA表达水平 按照trizol试剂使用说明提取细胞总RNA,定量后使用SYBR Prime script™ RT-PCR逆转录为cDNA,逆转录条件为37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s。PCR扩增引物HBx的上游引物:5'-TCAACGACCCGACCTTGAG-3',下游引物:5'-GAA AAAGTTGCATGGTGCTG-3'。SMYD3的上游引物:5'-GGCAGAGAACACAGCCTGAT-3',下游引物:5'-ACACGCCGATTTCCCTCT-3'。beta-actin的上游引物:5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAA GCA-3',下游引物:5'-TGGCACCCAGCACAA TGAA-3'。扩增条件:93 $^{\circ}$ C 3 min, 93 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s,循环32次,4 $^{\circ}$ C 1 h。相似相对定量法计算样本比值,每次实验每样品3复孔,实验重复2次。

1.2.4 Western-blot检测各组细胞HBx与SMYD3蛋白表达水平 按照RIPA细胞裂解液使用说明提取各组细胞总蛋白,BCA法定量后加入蛋白上样缓冲液置于100 $^{\circ}$ C水浴变性5 min,取变

性后蛋白每泳道 25 μg 上样,12% SDS-PAGE 凝胶电泳,半干法转膜 60 min,以 50 g/L BSA 室温封闭 1 h,抗体稀释液稀释抗体 HBx (1:200),SMYD3(1:2 500),GAPDH(1:2 500),二抗稀释为 1:4 000,一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h,二抗室温孵育 1 h,ECL 发光液显影。

1.2.5 免疫组化检测肝癌组织 SMYD3 与 H3K4me3 表达情况 按照两步法免疫组化操作步骤,将 2 片组织芯片 2 片进行脱蜡、水化、封闭、抗原修复后分别孵育 anti-SMYD3 抗体(1:50)、anti-H3K4me3 抗体(1:100),置于湿盒中 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 h,二抗室温孵育 1 h,DAB 显色,苏木素复染后封片观察。结果判断:SMYD3 胞浆棕色或棕黄色为阳性,蓝色为阴性,H3K4me3 胞核棕色或棕黄色为阳性,蓝色为阴性,阳性细胞数 > 30%/视野判断为该样本阳性。

2 结 果

2.1 组蛋白 H3K4 甲基转移酶活性差异

转染 HBx 真核表达质粒后 HepG2 细胞内 H3K4 甲基转移酶活性明显增强,达到 $[523 \pm 39] \text{h}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$,与空载体对照组及阴性对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.001$),而与阳性对照组差异无统计学意义($P = 0.279$,图 1A)。

2.2 HBx 对 SMYD3 表达水平影响

HepG2 细胞转染 HBx 真核表达质粒后 HBx 表达上调,SMYD3 亦随之上调。HepG2-HBx 细胞 SMYD3 mRNA 表达水平较 HepG2-vc 细胞上调 4.57 倍,较 HepG2 细胞上调 5.60 倍,差异均有统计学意义($P < 0.001$),而与阳性对照 HepG2.2.15 细胞差异无统计学差异($P = 0.301$,图 1B、C)。

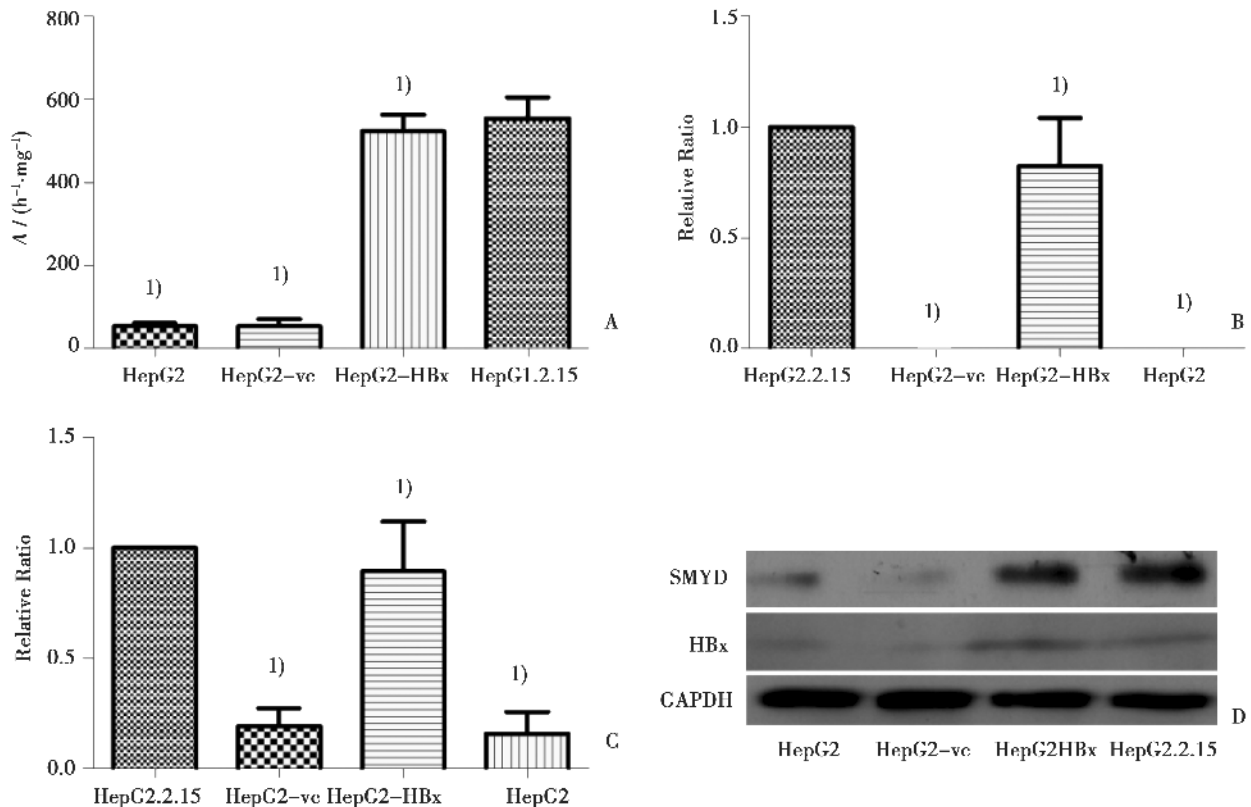


图 1 HBx 对肝癌细胞 H3K4 甲基转移酶活性及 SMYD3 表达水平影响

Fig.1 The effect of HBx on H3K4 methyltransferase activity and the expression level of SMYD3 in hepatocellular carcinoma

A: The activity of H3K4 methyltransferase in HBx protein positive expression cell line (HepG2-HBx) is significantly higher than that in HBx protein negative expression cell lines (HepG2 and HepG2-vc). B: qRT-PCR test shown that HBx protein expression in cell HepG2.2.15 and HepG2-HBx, no expression in cell HepG2-vc and HepG2. C: The expression level of SMYD3 mRNA in cell HepG2-HBx is significantly higher than that in negative control group during qRT-PCR analysis. D: The expression level of SMYD3 protein in cell HepG2-HBx is significantly higher than that in negative control group during Western-blot analysis. 1) statistically significant, $P < 0.001$, Independent-sample t Test.

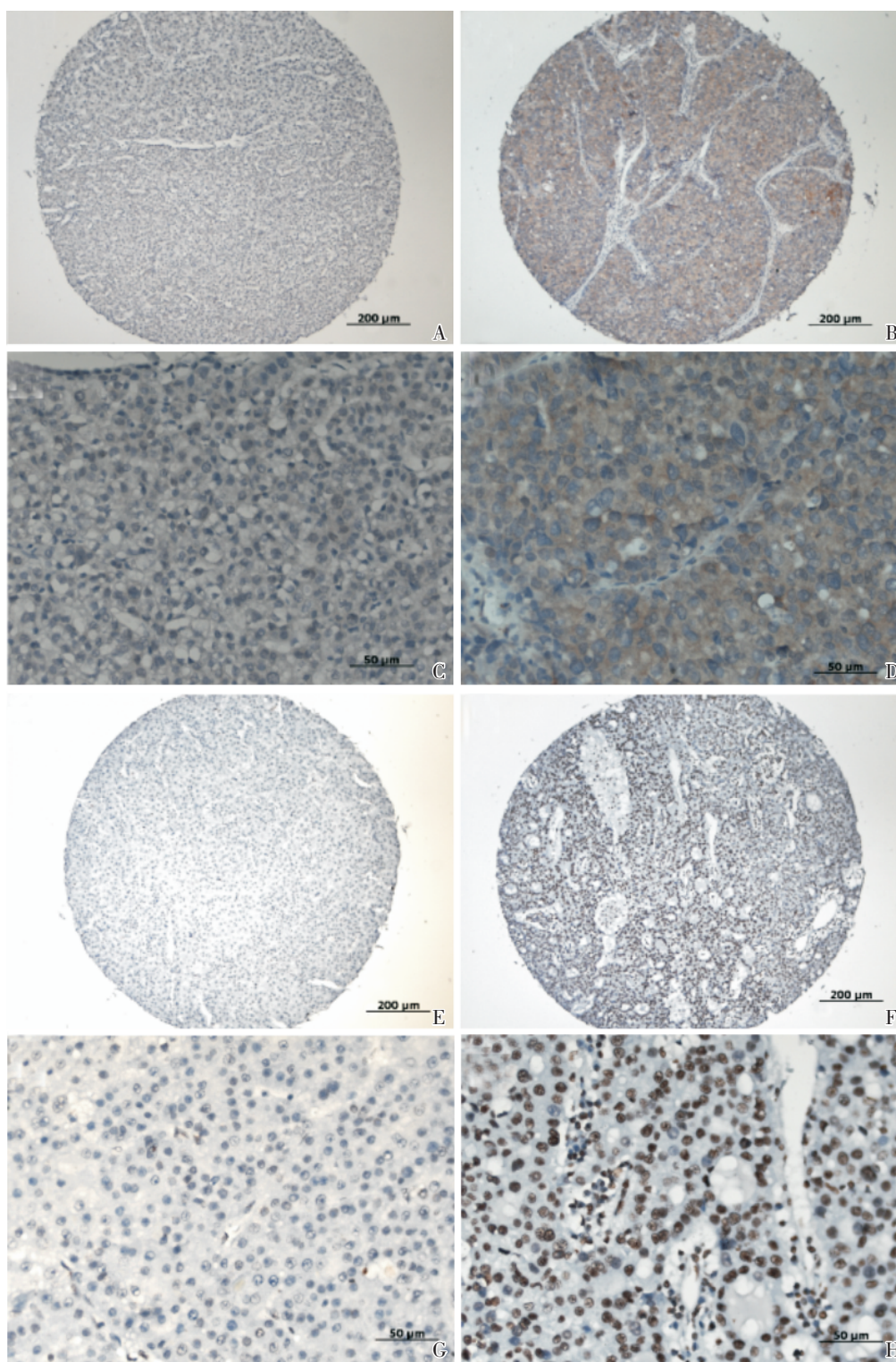


图 2 免疫组化检测肝癌组织中 SMYD3 与 H3K4me3 表达情况

Fig.2 The expression of SMYD3 and H3K4me3 in HCC tissue detected by IHC

A: Negative expression of SMYD3 in an HCC case (original magnification $\times 100$); B: High expression of SMYD3 was shown in an HCC patient tissue sample in which carcinoma cells exhibited SMYD3 staining in the cytoplasmic (original magnification $\times 100$); C, D: Higher magnification (original magnification $\times 400$) images of the partial areas in A, B, respectively; E: Negative expression of H3K4me3 in an HCC patient tissue sample which exhibited very few H3K4me3-positive nuclei (original magnification $\times 100$). F: High expression of H3K4me3 was shown in an HCC patient tissue sample in which more than 95% of carcinoma cells exhibited H3K4me3 staining in the nucleus (original magnification $\times 100$); G, H: Higher magnification (original magnification $\times 400$) images of the partial areas in E, F, respectively.

HepG2-HBx 细胞 SMYD3 蛋白表达水平较载体对照及阴性对照组明显上调[图 1D]。

2.3 肝癌组织中 SMYD3 与 H3K4me3 蛋白表达情况

对 84 例肝癌患者(临床病理资料见表 1)组织标本进行免疫组化染色,图 2 显示 SMYD3 与 H3K4me3 染色代表性图像,对全部组织进行结果判断并统计出:58 例 HbsAg(+) 患者肝癌组织中 SMYD3(+) 42 例,阳性率 72.4%; 26 例 HbsAg(-) 患者肝癌组织中 SMYD3(+) 11 例,阳性率 42.31%, 两组间差异有统计学意义($P = 0.008$, χ^2 检验); 53 例 SMYD3(+) 组织标本中 H3K4me3(+) 50 例,阳性率 94.3%; 31 例 SMYD3(-) 组织标本中 H3K4me3(+) 9 例,阳性率 29.03%, 两组间差异有统计学意义($P < 0.001$, χ^2 检验,表 2)。

表 1 84 例肝癌患者临床病理资料

Table 1 Clinical pathological data of 84 HCC patients

Variables	No. of cases
Age / years	
≤ 50.7	35
> 50.7	49
Gender	
Male	73
Female	11
HbsAg	
+	58
-	26
Preoperative AFP / (ng/mL)	
≤ 20	5
> 20	79
Liver cirrhosis	
Yes	64
No	20
Tumor size / cm	
≤ 5	34
> 5	50
Tumor number	
Single	66
Multiple	18
Vascular invasion	
Yes	31
No	53

3 讨论

本实验通过构建稳定转染细胞系以及收集加

表 2 相关蛋白组间表达差异

Table 2 The diversity of protein expression between groups

	SMYD3+	SMYD3-	P value	χ^2
HBsAg+	42	16	0.008	6.988
HBsAg-	11	15		
H3K4me3+	50	9	0.000	39.907
H3K4me3-	3	22		

Pearson Chi-square (2-sided)

工肝癌组织阵列块,获得了体内、体外实验研究的平台,初步探讨了肝癌细胞中 HBx 蛋白对组蛋白甲基化修饰的影响。研究发现,肝癌细胞中的 HBx 能够显著提高组蛋白 H3K4 甲基转移酶活性。据研究报道,能够特异性催化该位点甲基化的组蛋白甲基转移酶中(HMTs),SMYD3 研究最为透彻,功能最为重要^[12-13],它能使染色体组蛋白 H3K4 发生 2 倍(di-)和 3 倍(tri-)甲基化,从而影响下游癌基因、细胞周期调控基因、信号转导相关基因等,能够抑制肿瘤细胞凋亡、促进细胞增殖^[14-15]。本实验进一步探讨 HBx 蛋白对 SMYD3 表达的影响,发现 HBx 能够显著上调 SMYD3 转录活性与蛋白表达,据此我们推测 HBx 提高 H3K4 甲基转移酶活性可能与其介导的 SMYD3 表达上调有关。尽管其他研究者在实验中也观察到类似的现象,但 HBx 调节 SMYD3 转录或翻译的确切机制尚未阐明,尚待进一步深入。

肝癌组织中 SMYD3 表达亦呈现出与 HBV 感染之间的密切关系,这提示我们 HBV 致癌作用机制可能与其病毒蛋白 HBx 介导的 SMYD3 上调有关。除前述作用机制外,SMYD3 所催化的组蛋白 H3 赖氨酸第 4 残基甲基化(H3K4me)修饰更是具有特殊意义^[16-17],H3K4 位点的高甲基化(H3K4me3)是基因转录激活的重要标志。组蛋白 H3 甲基化修饰现象最早发现于鲑鱼类生物^[18],以 3 种不同的状态存在,即 1 倍(mono-),2 倍(di-)和 3 倍(tri-)的甲基化修饰^[19]。H3K4me3 与多种基因表达异常密切相关^[20-22],并且在多种肿瘤中证实其具有预后提示价值,例如:多发性骨髓瘤、肺癌、前列腺癌等^[23-24],而 H3K4me3 在肝细胞癌中的意义目前还缺乏充分研究。本实验使用肝细胞癌组织芯片研究肝癌细胞 SMYD3 表达与其 H3K4 甲基化修饰的关系,发现表达 SMYD3 的肝癌细胞更易出现 H3K4 的

高甲基化状态即 H3K4me3 表达。但是肝癌细胞中组蛋白 H3K4 甲基化修饰是否还有其他 HMTs 参与、以及 H3K4 高甲基化修饰所调控的基因表达谱异常仍知之甚少。

总之, 本实验虽未能详细阐明 HBx 调控 SMYD3 表达的确切机制及肝癌组蛋白甲基化修饰的具体意义, 但从表观遗传学角度初步证实了 HBx 在肝癌细胞中参与了组蛋白修饰的部分过程, 为乙肝相关肝癌研究提供了新的理论依据和思路。

参考文献:

- [1] Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(9):674-687.
- [2] Feitelson MA, Lee J. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis [J]. *Cancer Lett*, 2007, 252(2):157-170.
- [3] Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64(1):51-68.
- [4] Kim CM, Koike K, Saito I, et al. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice [J]. *Nature*, 1991, 351(6324):317-320.
- [5] Park EH, Koh SS, Srisuttee R, et al. Expression of HBX, an oncoprotein of hepatitis B virus, blocks reoviral oncolysis of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16(5):453-461.
- [6] Tang H, Oishi N, Kaneko S, et al. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(10):977-983.
- [7] Yoo YG, Oh SH, Park ES, et al. Hepatitis B virus X protein enhances transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1 alpha through activation of mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(40):39076-39084.
- [8] Bui-Nguyen TM, Pakala SB, Sirigiri RD, et al. NF-kappaB signaling mediates the induction of MTA1 by hepatitis B virus transactivator protein HBx [J]. *Oncogene*, 2010, 29(8):1179-1189.
- [9] Martin-Lluesma S, Schaeffer C, Robert EI, et al. Hepatitis B virus X protein affects S phase progression leading to chromosome segregation defects by binding to damaged DNA binding protein 1 [J]. *Hepatology*, 2008, 48(5):1467-1476.
- [10] 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]. *J Hepatol*, 2009, 50(2):377-387.
- [11] Shon JK, Shon BH, Park IY, et al. Hepatitis B virus-X protein recruits histone deacetylase 1 to repress insulin-like growth factor binding protein 3 transcription [J]. *Virus Res*, 2009, 139(1):14-21.
- [12] Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, et al. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(8):731-740.
- [13] Hamamoto R, Silva FP, Tsuge M, et al. Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells [J]. *Cancer Sci*, 2006, 97(2):113-118.
- [14] Chen LB, Xu JY, Yang Z, et al. Silencing SMYD3 in hepatoma demethylates RIZ1 promoter induces apoptosis and inhibits cell proliferation and migration [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(43):5718-5724.
- [15] Wang XQ, Miao X, Cai Q, et al. SMYD3 tandem repeats polymorphism is not associated with the occurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma in a Chinese population [J]. *Exp Oncol*, 2007, 29(1):71-73.
- [16] Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, et al. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3 [J]. *Nature*, 2002, 419(6905):407-411.
- [17] Zhao F, Chen Y, Zeng L, et al. Role of triptolide in cell proliferation, cell cycle arrest, apoptosis and histone methylation in multiple myeloma U266 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 646(1-3):1-11.
- [18] Honda BM, Dixon GH, Candido EP. Sites of in vivo histone methylation in developing trout testis [J]. *J Biol Chem*, 1975, 250(22):8681-8685.
- [19] Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, et al. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(1):73-77.
- [20] Seligson OB, Horvath S, Shi T, et al. Global histone modification patterns predict risk D of prostate cancer recurrence [J]. *Nature*, 2005, 435(7046):1262-1266.
- [21] Ke XS, Qu Y, Rostad K, et al. Genome-wide profiling of histone h3 lysine 4 and lysine 27 trimethylation reveals an epigenetic signature in prostate carcinogenesis [J]. *PLoS One*, 2009, 4(3):e4687.
- [22] Zhou X, Sun H, Chen H, et al. Hypoxia induces trimethylated H3 lysine 4 by inhibition of JARID1A demethylase [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(10):4214-4221.
- [23] Seligson DB, Horvath S, McBrien MA, et al. Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers [J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(5):1619-1628.
- [24] Manuyakorn A, Paulus R, Farrell J, et al. Cellular histone modification patterns predict prognosis and treatment response in resectable pancreatic adenocarcinoma: results from RTOG 9704 [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(8):1358-1365.