

法^[1]计算相对校正因子;并进一步重点考察了不同色谱仪、不同色谱柱的相对校正因子,结果显示RSD均小于2%,表明该方法的系统适应性较好。最后,通过比较外标法和QAMS的测定结果,两种方法无明显差异,说明各待测成分的相对校正因子可靠,该QAMS准确度较高。

综上,本实验建立了以黄芩苷为对照品,同时测定保肝丸中芍药苷、黄芩苷、五味子醇甲、大黄素4种指标性成分的方法,与常规的一测一评法比较大降低了质控的成本,缩短了检测周期,经验证该方法专属性强、重复性好,准确度高,为保肝丸的全面质量控制提供了更为便捷经济的途径。

参考文献

- [1] 王智民,钱忠直,张启伟,等.一测多评法建立的技术指南[J].中国中药杂志,2011,36(6):657-658.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015.
- [3] 靳瑞婷,杨素德,付娟,等.一测多评法测定芪白平肺颗粒中8种皂苷类成分[J].中草药,2015,46(24):3682-3686.
- [4] 游正琴,罗奕,吴琳琳,等.一测多评法测定咽立爽口含滴丸中的4种成分[J].中成药,2016,38(5):1180-1183.
- [5] 何兵,刘艳,杨世艳,等.HPLC一测多评法同时测定双青咽喉片中10种成分[J].中草药,2013,44(8):974-981.
- [6] 董秋菊,周园,冯薇,等.指纹图谱结合一测多评法在五子衍宗丸质量评价中的应用[J].中药材,2019,42(3):579-583.
- [7] 陈晶晶,周媛,黄晓蕾,等.基于一测多评的舒血宁注射液定量测定方法研究[J].中草药,2016,47(11):1890-1896.
- [8] 秦昆明,杨冰,胡静,等.一测多评法在中药多组分质量控制中

的应用现状与思考[J].中草药,2018,49(3):725-731.

- [9] 何兵,杨世艳,张燕.一测多评中待测成分校正和定位的新方法研究[J].药学报,2012,47(12):1653-1659.
- [10] KONG M, LIU HH, XU J, et al. Quantitative evaluation of Radix Paeoniae Alba sulfur-fumigated with different durations and purchased from herbal markets: simultaneous determination of twelve components belonging to three chemical types by improved high performance liquid chromatography - diode array detector [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 98: 424-433.
- [11] 刘艳,吁海超,章军,等.以质量为核心的优质中成药评价标准研究[J].中国中药杂志,2018,43(21):4356-4360.
- [12] 陈振华,刘苏珍,周斌,等.浅谈中药质量标准现状与几种质量评价方法[J].时珍国医国药,2016,27(3):694-696.
- [13] 孙庆宇,朱晟,胡玉霆,等.黄芩苷对急性胆道感染大鼠血清炎症指标及肝细胞损伤的影响[J].中华医院感染学杂志,2019,29(18):2726-2730.
- [14] 吴雄健.黄芩苷通过上调miR-3595靶向ACSL4表达抑制大鼠肝纤维化的机制研究[D].广州:南方医科大学,2018.
- [15] ZHAO Y, HE X, MA X, et al. Paeoniflorin ameliorates cholestasis via regulating hepatic transporters and suppressing inflammation in ANIT-fed rats[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 61-68.
- [16] 郭心怡,尹昕茹,袁红梅,等.芍药苷减轻四氯化碳诱导的急性肝损伤[J].基因组学与应用生物学,2018,37(8):3693-3698.
- [17] 王陈萍,宣东平,陈霞,等.五味子醇甲和五味子甲素对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的保护作用及机制[J].中国临床药理学杂志,2019,35(8):791-794.
- [18] 寇小妮,解新科,郝明霞,等.基于SIRT3/FXO1信号通路探讨大黄素对NASH大鼠肝细胞损伤和肝组织炎症的影响[J].肝脏,2019,24(5):510-514.
- [19] 陈志霖.大黄素通过FXR/BSEP信号通路干预胆汁淤积的机制研究[D].武汉:华中科技大学,2019.

(收稿日期:2019-09-22,修回日期:2019-10-27)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.12.007

◇ 临床医学 ◇

卵圆细胞恶性转化相关差异性甲基化基因的筛选及验证

汪鑫^a, 闫亮亮^b, 安然^a, 程亚^a, 王恒毅^a

作者单位:安徽医科大学第一附属医院,^a急诊外科,^b风湿免疫科,安徽 合肥 230032

通信作者:王恒毅,男,副主任医师,硕士生导师,研究方向为肝癌的发育生物学机制,E-mail:why00606@sina.com

基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(1608085QH182)

摘要:目的 通过对卵圆细胞恶性转化相关差异性甲基化基因的筛选及验证,初步探索卵圆细胞发生恶性转化的表观遗传学调控机制。方法 利用简化甲基化测序(Reduced representation bisulfite sequencing, RRBS)对转染肝细胞癌基因HBV X(HBX)发生恶性转化的卵圆细胞(HBX-LE6)与正常大鼠肝卵圆细胞(LE6)进行甲基化测序,获得差异性甲基化区域(Differentially methylated region, DMR)与相关差异性甲基化基因(Differentially methylated gene, DMG),通过实时定量聚合酶链反应(Real-time qPCR)、蛋白质印迹法(Western Blot)、甲基化特异性聚合酶链反应(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)进行检测,验证甲基化对DMG表达的调控作用。结果 共筛选相关DMR 1 434个,其中高甲基化DMR 623个(位于启动子128个);低甲基化DMR 811个(位于启动子216个),DMG共1 987个。挑选启动子均存在高甲基化DMR的相关基因如泛素特异性蛋白酶18基因(USP18)、有丝分裂原活化蛋白激酶激酶6(MAP3K6)、SWI/SNF染色质重塑复合物(SMARCB1)、表

皮生长因子受体(EGFR)、肿瘤抑制因子(CYLD)、环指蛋白39(RNF39)、含16的锌指和BTB结构域蛋白(ZBTB16)、同源异型盒基因D8(HOXD8)进行验证。USP18、SMRCB1、CYLD、ZBTB16在LE6和HBX-LE6中的mRNA相对表达量分别为 $[(4.50 \pm 0.43), (2.09 \pm 0.18)]$ 、 $[(7.34 \pm 0.11), (2.57 \pm 0.29)]$ 、 $[(7.30 \pm 0.27), (3.44 \pm 0.13)]$ 、 $[(7.01 \pm 0.06), (1.29 \pm 0.32)]$,与LE6相比,其在HBX-LE6中表达显著下调($P < 0.05$)。与LE6相比,SMRCB1在HBX-LE6中的蛋白表达明显下降 $[(6.26 \pm 0.25)$ 比 (1.53 ± 0.34) , $P < 0.05$]。USP18、ZBTB1、CYLD的蛋白表达在三组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。5-Aza-CdR对HBX-LE6细胞干预后,MSP证实SMRCB1在HBX-LE6中的高甲基化被5-Aza-CdR抑制,其mRNA与蛋白表达水平均显著上调($P < 0.05$)。结论 DNA甲基化参与卵圆细胞恶性转化的表观遗传学调控机制,DNA高甲基化下调卵圆细胞中抑癌基因SMRCB1可能参与了癌变的过程,但机制仍需要进一步研究明确。

关键词: DNA甲基化; 卵圆细胞; 癌,肝细胞; 基因表达调控,肿瘤; 泛素特异性蛋白酶类; 肿瘤抑制蛋白质类; 受体,表皮生长因子; 癌基因; 差异性甲基化区域(DMR); 差异性甲基化基因(DMG)

Bioinformatics-based screening and verification of differentially methylated genes in malignant transformation of oval cells in vitro

WANG Xin^a, YAN Liangliang^b, AN Ran^a, CHENG Ya^a, WANG Hengyi^a

Author Affiliation: ^aDepartment of Emergency Surgery, ^bDepartment of Rheumatology and Immunology,

The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230032, China

Abstract: Objective To explore the epigenetic regulation mechanisms in malignant transformation of oval cells by screening and verifying differentially methylated genes (DMGs) related to malignant transformation of oval cells. **Methods** Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) was applied to detect methylation sequencing on the malignant transformation of hepatocellular carcinoma gene HBV X (HBX)-LE6 oval cells and normal rat liver LE6 oval cells. Different methylated regions (DMR) and related Differentially methylated genes (DMG) were obtained. The regulatory effect of methylation on DMG expression was detected and identified by the real-time qPCR, Western Blot and methylation specific polymerase chain reaction (MSP). **Results** A total of 1 434 DMR were identified in methylation level in tumor compared with non-tumor tissues, of which 623 were hypermethylated DMRs (at 128 promoters), 811 were hypomethylated DMRs (at 216 promoters), and 1 987 were DMGs. The genes related to hypermethylated DMR were found and verified in all selected promoters, such as ubiquitin-specific protease 18 gene (USP18), mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MAP3K6), SWI/SNF chromatin remodeling complex (SMRCB1), epidermal growth factor receptor (EGFR), tumor suppressor (CYLD), ring finger protein 39 (RNF39), 16-containing zinc finger and BTB domain protein (ZBTB16), and homeobox gene D8 (HOXD8). Real-time quantitative PCR indicated mRNA levels in USP18, SMRCB1, CYLD and ZBTB16 were remarkably decreased in HBX-LE6 oval cells compared with controls in LE6 oval cells ($P < 0.05$). The mRNA expression of USP18, SMRCB1, CYLD and ZBTB16 in LE6 and HBX-LE6 were (4.50 ± 0.43) vs. (2.09 ± 0.18) , (7.34 ± 0.11) vs. (2.57 ± 0.29) , (7.30 ± 0.27) vs. (3.44 ± 0.13) , (7.01 ± 0.06) vs. (1.29 ± 0.32) , respectively. Western Blot indicated that SMRCB1 protein expression was decreased in HBX-LE6 oval cells ($P < 0.05$). SMRCB1 protein expression in LE6 and HBX-LE6 were $[(6.26 \pm 0.25)$ vs. (1.53 ± 0.34) , $P < 0.05$]. USP18, CYLD and ZBTB16 protein levels were not statistically different among the three groups ($P > 0.05$). After 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-CdR) intervention on HBX-LE6 cells, MSP confirmed that the hypermethylation of SMRCB1 in HBX-LE6 was inhibited by 5-Aza-CdR, and its mRNA and protein expression levels were significantly up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusions** These results demonstrate the significance of aberrant DNA methylation in the epigenetic regulation mechanism of oval cells. DNA hypermethylation down-regulates the tumor suppressor gene SMRCB1 in oval cells may be involved in the process of tumorigenesis, and the mechanism needs to be further studied.

Key words: DNA methylation; Oval cells; Carcinoma, hepatocellular; Gene expression regulation, neoplastic; Ubiquitin-specific proteases; Tumor suppressor proteins; Receptor, epidermal growth factor; Oncogenes; DMR; DMG

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国最常见且恶性程度最高的肿瘤之一,占我国癌症死亡率的第2位^[1]。肝癌的发病机制仍不清楚。卵圆细胞(oval cell)是一类定植于胆管的核圆少浆的上皮细胞,在特定的疾病或病理生理条件下,可被激活并增殖^[2-3]。其被认为是肝脏前体干细

胞,具有肿瘤干细胞的特征。在致癌因素作用下,卵圆细胞高速增殖,基因组结构不稳,分化失控,继而发育停滞,恶性转化为肝癌细胞^[4-5]。但卵圆细胞恶性转化的调控机制仍未阐释清楚。

我们将肝细胞癌基因HBV X(HBX)转染大鼠肝卵圆细胞(LE6细胞系)后发现:转染HBX卵圆

细胞(HBX-LE6)发生了恶性转化,在动物模型中,HBX-LE6细胞在肝内形成间质瘤细胞和肝癌细胞组成的肝癌肉瘤^[6-7],但致癌因素诱导卵圆细胞恶性转化的表观遗传学机制尚未阐明。根据表观遗传致癌假说,致癌因素的暴露能改变细胞的表观遗传学模式,进而引起基因活性和细胞表型的改变,引发原癌基因的活化和肿瘤抑制基因灭活,最终导致肿瘤的发生。DNA甲基化(DNA methylation)是目前研究最为广泛的表观遗传现象。低甲基化造成肿瘤细胞基因组的不稳定,并促使致癌基因活化。抑癌基因的高甲基化可以直接抑制其表达或基因沉默,引起细胞恶变,最终导致肿瘤的发生。

本研究于2017年1月至2018年5月首先利用简化甲基化测序(Reduced representation bisulfite sequencing, RRBS)对发生恶性转化的卵圆细胞HBX-LE6与正常LE6细胞进行甲基化测序,获得差异性甲基化区域(Differentially methylated region, DMR),通过基因注释获得相关差异性甲基化基因(Differentially methylated gene, DMG),并进行验证,探索DNA甲基化参与卵圆细胞恶性转化的表观遗传学机制。

1 材料与与方法

1.1 材料 卵圆细胞购于美国标准菌库(马纳萨斯,弗吉尼亚州),TRIzol试剂盒购于美国Invitrogen公司,SYBR Green和HiScript IIQ RT SuperMix购于南京诺唯赞生物技术有限公司,qPCR引物核酸序列由上海生物工程有限公司合成,多克隆抗体和二级抗体均购于北京博奥森生物公司,甲基化试剂盒和甲基化抑制剂5-Aza-CdR购于Zymo Research公司。

1.2 方法

1.2.1 分组 HBX+LE6组:稳定表达HBX的恶性转化后卵圆细胞;LE6组:正常大鼠卵圆细胞LE6;5-Aza-CdR+HBX-LE6组:培养基中加入5-Aza-CdR处理72 h后的HBX-LE6卵圆细胞。

1.2.2 高通量甲基化测序 通过Illumina HiSeqTMPE125/PE150系统获得原始图像,数据文件经CASAVA碱基识别(Base Calling)分析转化为测序读段(Sequenced Reads)。使用BiSeq软件(1.6版)识别DMR。使用MethylKit软件(1.0.0版)计算差值甲基化的P值。DMR标准阈值为 $P < 0.05$,甲基化率差异大于10%。对DMR进行区域、基因注释,获得差异性甲基化相关基因及DMR在基因功能区域的定位。

1.2.3 实时定量聚合酶链反应(Real-time qPCR)检测 (1)反应体系:SybrGreen Mixture 12.5 μL ,互补DNA(cDNA)模板2.5 μL ,正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL ,反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL ,双蒸馏水(ddH₂O)

9 μL ,总体积为25 μL 。(2)反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性25 s,退火时间25 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s,共45个循环。Real-time qPCR引物序列见表1。

1.2.4 蛋白质印迹法(Western Blot)检测 以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参对照,细胞用细胞裂解液处理,在冰浴中匀浆。用BCA法蛋白定量。采用凝胶成像分析系统计算目的条带的积分光密度,根据目的条带的灰度值与内参照 β -actin的灰度值之比进行定量分析。

表1 实时定量聚合酶链反应(Real-time qPCR)引物核酸序列

基因名称	引物	序列(5'->3')	长度/bp	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$
USP18	正向	CCTGAGGCAAATCTGTCACTC	21	60.4
	反向	CGAACACCTGAATCAAGGAGTTA	23	60
MAP3K6	正向	GATGCCTTCTACAACGCGGAT	21	62.5
	反向	CACGCACACCAAGTGGTA	19	62.2
SMARCB1	正向	GCGAGTTCTACATGATCGGCT	21	62
	反向	CACAGTGGCTAGTCGCCTC	19	62.1
EGFR	正向	GCCTTCCCAGTTCAGTTCCG	20	62.8
	反向	GTGATCTGGTTGCTAGACAGC	21	60.4
HOXD8	正向	CTTCGTGAACCCGCTGTACTC	21	62.7
	反向	GACAGTCGTAGTAAAGTGGGATTG	23	60.1
CYLD	正向	TCAGGCTTATGGAGCCAAGAA	21	60.9
	反向	ACTTCCCTTCGGTACTTTAAGGA	23	60.4
RNF39	正向	AGATTTGACGAGACTGAGACTCT	23	60.2
	反向	CTCCCGCATTAACTTTTGCCG	21	62.2
ZBTB16	正向	GAGATCCTCTTCCACCGCCAAT	21	61.6
	反向	CCGCATACAGCAGGTCAATC	19	60.3

注:USP18为泛素特异性蛋白酶18基因,MAP3K6为有丝分裂原活化蛋白激酶激酶激酶6,SMARCB1为SWI/SNF染色质重塑复合物,EGFR为表皮生长因子受体,HOXD8为同源异型盒基因D8,CYLD为肿瘤抑制因子,RNF39为环指蛋白39,ZBTB16为含16的锌指和BTB结构域蛋白

1.2.5 甲基化特异性聚合酶链反应(methylation specific polymerase chain reaction, MSP)检测 (1)引物序列:甲基化特异性引物M-forward 5'-GTTTCGTC-GTTCGT TTTTITAGGC-3',和M-reverse 5'-AAAAAC-CAACG ACCCCCGCG-3',非甲基特异性引物为U-forward, U-forward 5'-AGT TTGTTGTTGTTTTTITAG-GTGG-3',和U-reverse 5'-AAAAAACCAACAA CCCCACA-3',扩增片段均为108 bp。(2)反应体系:10 \times PCR Buffer 2 μL , dNTP mix (2.5 mmol/L dNTP) 1.6 μL ,正向引物(10 $\mu\text{mol/L}$)0.4 μL ,反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 0.4 μL ,修饰后的DNA 2 μL ,DNA聚合酶0.1 μL ,去离子水13.5 μL ,总体积20 μL 。(3)反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,甲基化特异性引物58 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,非甲基化特异性引物54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,然后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,共35个循环,最后

72 °C延伸6 min反应完成。

1.3 统计学方法 数据分析采用SPSS 17.0软件,正态分布资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。对于DMR的鉴定,采用软件 BiSeq (1.6.0)、methylKit (1.0.0) 进行检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高通量甲基化测序结果 HBX 和 HBX-LE6 细胞共筛选出 1 434 个 DMR。其中高甲基化 623 个(位于启动子 128 个),低甲基化 811 个(位于启动子 216 个)。通过 DMR 基因注释,共筛选 DMG 1 987 个。并按统计显著性排序,列出了前 20 位明显高甲基化 DMR 和 DMG,见表 2。

2.2 Real-time qPCR 检测结果 SMARCB1、CYLD、ZBTB16、USP18 在 HBX-LE6 组中的 mRNA 表达量相对值较 LE6 组均显著下调。SMARCB1 高

甲基化被 5-Aza-CdR 抑制后,5-Aza-CdR+HBX-LE6 组中的 mRNA 表达较抑制前 HBX-LE6 组显著上调 ($P < 0.05$)。见表 3,4。

表 4 LE6、HBX-LE6 和 5-Aza-CdR+HBX-LE6 三组中 SMARCB1、CYLD、ZBTB16、USP18 的相对表达量比较 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	SMARCB1	CYLD	ZBTB16	USP18
LE6	3	7.34±0.11	7.30±0.27	7.01±0.06	4.50±0.43
HBX-LE6	3	2.57±0.29	3.44±0.13	1.29±0.32	2.09±0.18
5-Aza-CdR+ HBX-LE6	3	7.31±0.12 ^a	3.5±0.08	1.33±0.09	2.09±0.13
<i>F</i> 值		4 018.000	0.138	0.600	0.300
<i>P</i> 值		< 0.001	0.874	0.586	0.724

注:HBX-LE6 为转染肝细胞癌基因 HBV X (HBX) 发生恶性转化的大鼠肝卵圆细胞,LE6 为正常大鼠肝卵圆细胞,5-Aza-CdR+HBX-LE6 为培养基中加入 5-Aza-CdR 处理 72h 后的 HBX-LE6 卵圆细胞,SMARCB1 为 SWI/SNF 染色质重塑复合物,CYLD 为肿瘤抑制因子,ZBTB16 为含 16 的锌指和 BTB 结构域蛋白,USP18 为泛素特异性蛋白酶 18 基因。与 HBX-LE6 组比较,^a $P < 0.05$

表 2 转染肝细胞癌基因 HBV X (HBX) 发生恶性转化的大鼠肝卵圆细胞 HBX-LE6 与正常大鼠肝卵圆细胞 LE6 间位于启动子差异性高甲基化区域列表(前 20 位)

Chromosome	no.CG	meth.H	meth.L	meth.diff	meth.p	Direction	Genomic name
chr1	8	0.711 672	0.497 960	0.213 712	1.20×10 ⁻⁴¹	hyper	RP11-63G10.3
chr22	6	0.837 569	0.539 437	0.296 242	1.45×10 ⁻⁴¹	hyper	USP18
chr1	2	0.572 219	0.447 216	0.125 002	1.58×10 ⁻⁴⁰	hyper	MAP3K6
chr2	9	0.466 496	0.244 208	0.222 288	1.32×10 ⁻²²	hyper	SMARCB1
chr19	23	0.528 270	0.325 755	0.197 429	1.19×10 ⁻¹⁶	hyper	TIMM13
chr17	3	0.603 273	0.374 736	0.227 773	8.27×10 ⁻¹⁵	hyper	MIR196A1
chr7	4	0.525 299	0.297 714	0.227 586	3.14×10 ⁻¹⁴	hyper	EGFR
chr22	5	0.573 371	0.407 585	0.165 786	5.39×10 ⁻¹⁴	hyper	DUSP18
chr2	10	0.181 040	0.040 347	0.143 699	3.06×10 ⁻¹³	hyper	HOXD8
chr19	13	0.212 419	0.102 314	0.110 105	3.02×10 ⁻¹¹	hyper	CYLD
chr6	7	0.894 848	0.766 184	0.133 853	4.40×10 ⁻¹¹	hyper	RP3-400B16.2
chr6	7	0.894 848	0.766 184	0.133 853	4.40×10 ⁻¹¹	hyper	RP3-400B16.3
chr22	15	0.844 333	0.460 982	0.326 126	6.53×10 ⁻¹⁰	hyper	MIR4761
chr9	11	0.269 595	0.032 675	0.236 921	9.83×10 ⁻¹⁰	hyper	ZBTB16
chr1	17	0.407 891	0.216 575	0.209 415	1.34×10 ⁻⁹	hyper	RNVU1-8
chr15	4	0.847 302	0.736 121	0.111 182	1.53×10 ⁻⁹	hyper	RP11-182J1.1
chr6	10	0.580 918	0.402 857	0.178 413	2.70×10 ⁻⁹	hyper	snoU13
chr6	7	0.456 532	0.291 219	0.161 149	7.01×10 ⁻⁹	hyper	RNF39
chr9	6	0.589 842	0.431 193	0.159 820	8.55×10 ⁻⁹	hyper	KIAA1984AS1
chr10	13	0.591 545	0.386 338	0.235 988	1.06×10 ⁻⁸	hyper	C10orf71-AS1

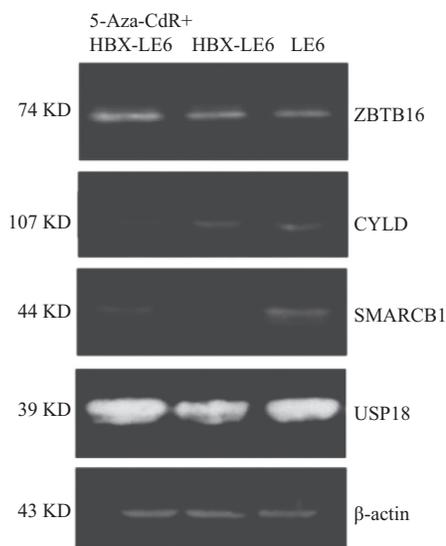
注:Chromosome 为染色体编号;no.CG 为该区域上的 CpG 位点数目;meth.H 为 HBX-LE6 组在该区域的平均甲基化水平;meth.L 为 LE6 组在该区域的平均甲基化水平;meth.diff 为两组间在该差异性甲基化区域(DMR)的平均甲基化水平差值;meth.p:两组间在该 DMR 区域差异的显著性 *P* 值;Direction 为 HBX-LE6 组相对于 LE6 组在该 DMR 区域的平均甲基化水平高低,hyper(高),hypo(低);Genomic name 为 DMR 相关基因名称(DMG)

表 3 实时定量聚合酶链反应(Real-time qPCR)分别检测 HBX-LE6 与 LE6 两组中 USP18、MAP3K6、SMARCB1、EGFR、CYLD、RNF39、ZBTB16、HOXD8 的 mRNA 相对表达量 $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	RNF39	SMARCB1	MAP3K6	EGFR	HOXD8	CYLD	ZBTB16	USP18
LE6	3	5.00±0.02	7.34±0.11	7.30±0.12	7.44±0.01	8.56±0.08	7.30±0.27	7.01±0.06	4.50±0.43
HBX-LE6	3	4.95±0.03	2.57±0.29	7.31±0.07	7.41±0.02	8.46±0.02	3.44±0.13	1.29±0.32	2.09±0.18
<i>t</i> 值		2.186	34.860	0.230	2.219	2.249	32.180	33.620	6.848
<i>P</i> 值		0.094	0.001	0.829	0.091	0.088	0.001	0.001	0.021

注:HBX-LE6 为转染肝细胞癌基因 HBV X (HBX) 发生恶性转化的大鼠肝卵圆细胞,LE6 为正常大鼠肝卵圆细胞,RNF39 为环指蛋白 39,SMARCB1 为 SWI/SNF 染色质重塑复合物,MAP3K6 为有丝分裂原活化蛋白激酶激酶 6,EGFR 为表皮生长因子受体,HOXD8 同源异型盒基因 D8,CYLD 为肿瘤抑制因子,ZBTB16 为含 16 的锌指和 BTB 结构域蛋白,USP18 为泛素特异性蛋白酶 18 基因

2.3 蛋白质印迹法检测结果 USP18、ZBTB1、CYLD的蛋白表达在三组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。与LE6相比,SMARCB1在HBX-LE6中的蛋白表达下调,SMARCB1高甲基化被5-Aza-CdR抑制后,其蛋白表达显著上调($P < 0.001$)。见图1、表5。



注:5-Aza-CdR+HBX-LE6为培养基中加入5-Aza-CdR处理72 h后的HBX-LE6卵圆细胞,HBX-LE6为转染肝细胞癌基因HBV X(HBX)发生恶性转化的大鼠肝卵圆细胞,LE6为正常大鼠肝卵圆细胞,ZBTB16为含16的锌指和BTB结构域蛋白,CYLD为肿瘤抑制因子,SMARCB1为SWI/SNF染色质重塑复合物,USP18为泛素特异性蛋白酶18基因

图1 蛋白质印迹法检测5-Aza-CdR+HBX-LE6、HBX-LE6、LE6三组中ZBTB16、CYLD、SMARCB1、USP18的蛋白表达

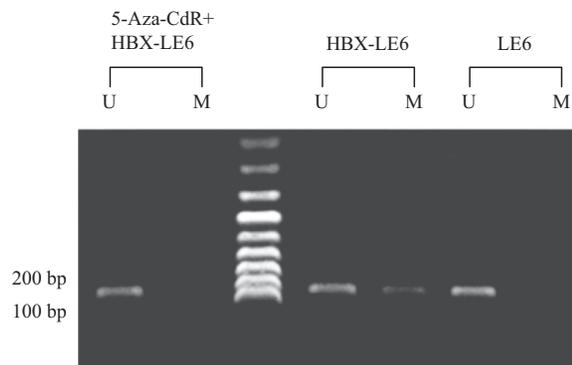
表5 LE6、HBX-LE6、5-Aza-CdR+HBX-LE6三组中SMARCB1、CYLD、ZBTB16、USP18的蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	重复次数	SMARCB1	CYLD	ZBTB16	USP18
LE6	3	6.26±0.25	1.62±0.22	4.33±0.03	8.45±0.21
HBX-LE6	3	1.53±0.34 ^a	1.58±0.17	4.31±0.15	8.32±0.14
5-Aza-CdR+ HBX-LE6	3	7.55±0.32 ^b	1.72±0.23	4.29±0.09	8.29±0.19
F值		34 309.000	10.331	2.400	11.734
P值		<0.001	0.082	0.172	0.075

注:LE6为正常大鼠肝卵圆细胞,HBX-LE6为转染肝细胞癌基因HBV X(HBX)发生恶性转化的大鼠肝卵圆细胞,5-Aza-CdR+HBX-LE6为培养基中加入5-Aza-CdR处理72h后的HBX-LE6卵圆细胞,SMARCB1为SWI/SNF染色质重塑复合物,CYLD为肿瘤抑制因子,ZBTB16为含16的锌指和BTB结构域蛋白,USP18为泛素特异性蛋白酶18基因。与LE6组比较,^a $P < 0.01$;与HBX-LE6组比较,^b $P < 0.01$

2.4 MSP检测5-Aza-CdR+HBX-LE6、HBX-LE6和LE6三组中SAMRCB1基因的甲基化状态 分别用“M”(甲基化特异性引物)和“U”(非甲基化特异性引物)进行扩增。LE6、HBX-LE6用U引物扩增都

有特异性扩增产物,M引物仅在HBX-LE6有特异性扩增产物。在5-Aza-CdR干预后,5-Aza-CdR+HBX-LE6中U引物有特异性扩增产物,M引物无特异性扩增产物。见图2。



注:5-Aza-CdR+HBX-LE6为培养基中加入5-Aza-CdR处理72h后的HBX-LE6卵圆细胞,HBX-LE6为转染肝细胞癌基因HBV X(HBX)发生恶性转化的大鼠肝卵圆细胞,LE6为正常大鼠肝卵圆细胞,U示非甲基化特异性引物,M示甲基化特异性引物

图2 甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)检测LE6、HBX-LE6和5-Aza-CdR+HBX-LE6三组中SWI/SNF染色质重塑复合物(SMARCB1)基因的甲基化状态

3 讨论

DMR指在不同样本之间,甲基化修饰水平具有显著差异的基因组区域,这些区域在基因表达调控方面发挥重要作用。本研究结果共获得DMR 1 434个,其中高甲基化DMR 623个(位于启动子128个),低甲基化DMR 811个(位于启动子216个)。通过DMR基因注释获得DMG 1 987个。从中挑选出高甲基化相关基因USP18、MAP3K6、SMARCB1、EGFR、CYLD、RNF39、ZBTB16、HOXD8进行验证。结果表明:CYLD、ZBTB16、USP18在HBX-LE6中的mRNA表达水平显著降低($P < 0.05$)。已知USP18与肺癌关系密切,改变USP18水平会影响肺癌细胞cyclinD1蛋白的稳定性^[8]。ZBTB16蛋白含有一个锌指结构和一个BTB结构,被认为与调控细胞自噬有关^[9]。CYLD被认为是抑癌基因,其去泛素化活性调控NF- κ B及JNK等信号途径,在抑制肿瘤方面发挥重要作用^[10]。在5-Aza-CdR抑制其甲基化后,三种基因mRNA表达水平并未明显上调。表明启动子高甲基化并非其mRNA表达下调的单一因素。USP18、ZBTB1、CYLD的蛋白表达在两组间差异无统计学意义($P > 0.05$),可能与基因转录后水平、翻译水平等多重调控有关。

与LE6相比,SMARCB1在HBX-LE6中的蛋白表达显著下降($P < 0.05$),与其mRNA表达水平下调一致。进一步研究表明,5-Aza-CdR完全抑制了

SMARCB1 启动子的甲基化,且抑制后 HBX-LE6 细胞中 SMARCB1 的 mRNA 与蛋白表达均显著升高($P < 0.05$),表明启动子的高甲基化可能是下调抑癌基因 SMARCB1 表达的主要因素。SMARCB1 基因编码的蛋白是 ATP 依赖性染色质调节复合物 SWI/SNF 的核心亚基,参与基因的表达修饰和转录调控^[11]。SMARCB1 基因突变与多种肿瘤的发生相关,其作为抑癌基因可以诱导细胞 G1 停滞、抑制染色体非整倍性等发挥肿瘤抑制的作用^[12-13]。SMARCB1 与肝癌发生的关系密切。SMARCB1 在肝组织中的表达与肝癌发生的风险呈负相关。敲除 SNF5 (SMARCB1/INI1/BAF47) 的肝癌细胞系 Hep3B 和 HCCLM3 生长和迁移能力明显增强^[14-16]。

表观遗传学认为,表观遗传改变在肿瘤发生发展过程中起着主要作用,是细胞恶性转化早期的主要驱动力^[17]。在哺乳动物基因组中,DNA 甲基化的主要位点是 CpG 二核苷酸,常位于基因上游调控区的启动子区域。启动子区的 CpG 岛通常处于非甲基化状态,基因能正常表达;当其发生甲基化时,影响基因转录调控,使基因表达发生沉默。因此,抑癌基因 SMARCB1 启动子的高甲基化可能参与了 LE6 卵圆细胞发生恶性转化的分子机制。但其下游靶基因或效应分子为何,以及在体内如何影响卵圆细胞的生物学特征均需进一步深入研究。

综上所述,本研究应用 RRBS 技术,获得转化后大鼠卵圆细胞与未转化卵圆细胞的 DMR 与 DMG,并对相关基因进行验证,为研究卵圆细胞发生恶性转化的表观遗传学机制提供了重要线索与理论依据。

参考文献

- [1] KHOSLA R, HEMATI H, RASTOGI A, et al. miR-26b-5p helps in EpCAM+ cancer stem cells maintenance via HSC71/HSPA8 and augments malignant features in HCC [J]. *Liver International*, 2019, 39(9): 1692-1703.
- [2] RISAL P, SHRESTHA N, CHAND L, et al. Involvement of prolyl isomerase PIN1 in the cell cycle progression and proliferation of hepatic oval cells [J]. *Pathol Res Pract*, 2017, 213(4): 373-380.
- [3] ZHANG P, ZHU X, WU Y, et al. Histone deacetylase inhibitors reduce WB-F344 oval cell viability and migration capability by suppressing AKT/mTOR signaling in vitro [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2016, 590: 1-9.
- [4] ZHENG YW, TSUCHIDA T, SHIMAO T, et al. The CD133 + CD44+ precancerous subpopulation of oval cells is a therapeutic target for hepatocellular carcinoma [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(18): 2237-2249.
- [5] PUSTERLA T, NEMETH J, STEIN I, et al. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is a key regulator of oval cell activation and inflammation-associated liver carcinogenesis in mice [J]. *Hepatology*, 2013, 58(1): 363-373.
- [6] LI CH, WANG YJ, DONG W, et al. Hepatic oval cell lines generate hepatocellular carcinoma following transfection with HBx gene and treatment with aflatoxin B1 in vivo [J]. *Cancer Lett*, 2011, 311(1): 1-10.
- [7] MAEDA O, MATSUOKA A, FURUKAWA K, et al. Alterations in gene expression and DNA methylation profiles in gastric cancer cells obtained from ascitic fluids collected before and after chemotherapy [J]. *Mol Clin Oncol*, 2019, 11(1): 91-98.
- [8] GUO Y, CHINYENGETERE F, DOLINKO AV, et al. Evidence for the ubiquitin protease UBP43 as an antineoplastic target [J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(9): 1968-1977.
- [9] ZHANG T, DONG K, LIANG W, et al. G-protein-coupled receptors regulate autophagy by ZBTB16-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of Atg14L [J/OL]. *Elife*, 2015, 4: e06734. DOI: 10.7554/eLife.06734.
- [10] WEBER A, ELLIOTT PR, PINTO-FERNANDEZ A, et al. A linear diubiquitin-based probe for efficient and selective detection of the deubiquitinating enzyme otulin [J]. *Cell Chem Biol*, 2017, 24(10): 1299-1313.e7. DOI: 10.1016/j.chembiol.2017.08.006.
- [11] LANGER LF, WARD JM, ARCHER TK. Tumor suppressor SMARCB1 suppresses super-enhancers to govern hESC lineage determination [J/OL]. *Elife*, 2019, 8. DOI: 10.7554/eLife.45672.
- [12] VOISIN MR, OVENDEN C, TSANG DS, et al. Atypical teratoid/rhabdoid sellar tumor in an adult with a familial history of a germline SMARCB1 mutation: case report and review of the literature [J]. *World Neurosurgery*, 2019, 127: 336-345.
- [13] JIA L, CARLO MI, KHAN H, et al. Distinctive mechanisms underlie the loss of SMARCB1 protein expression in renal medullary carcinoma: morphologic and molecular analysis of 20 cases [J]. *Modern Pathology*, 2019, 32(9): 1329-1343.
- [14] SUN H, ZHONG X, WANG C, et al. SNF5 is involved in suppression of hepatocellular carcinoma progression via TGF- β 1 signaling [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2016, 299(7): 869-877.
- [15] MOCHIZUKI K, KAWAI M, ODATE T, et al. SMARCB1/INI1 is diagnostically useful in distinguishing α -fetoprotein-producing gastric carcinoma from hepatocellular carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(12): 6865-6868.
- [16] ZHONG R, LIU L, TIAN Y, et al. Genetic variant in SWI/SNF complexes influences hepatocellular carcinoma risk: a new clue for the contribution of chromatin remodeling in carcinogenesis [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 4147.
- [17] LIN YC, MURAYAMA Y, HASHIMOTO K, et al. Role of tumor suppressor genes in the cancer-associated reprogramming of human induced pluripotent stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(2): 58.

(收稿日期:2019-07-12,修回日期:2019-08-01)