

学校代码: 10246  
学 号: 11211010070

復旦大學

硕 士 学 位 论 文

羟甲基化酶 TET1 介导乙肝病毒 X 蛋白上调癌基因  
URG11 的分子机制

**Molecular Mechanism of TET1-Mediated Up-regulation of Oncogene URG11  
Induced by Hepatitis B virus X protein**

院 系: 生物医学研究院  
专 业: 生物化学与分子生物学  
姓 名: 王 睿  
指 导 教 师: 刘 杰 教授  
完 成 日 期: 2014 年 4 月 15 日

羟甲基化酶 TET1 介导乙肝病毒 X 蛋白上调癌基因  
URG11 的分子机制

**Molecular Mechanism of TET1-Mediated Up-regulation of Oncogene  
URG11 Induced by Hepatitis B virus X protein**

王 睿

**Rui Wang**

指导教师： 刘 杰 教授

指导小组： 王久存 教授

复旦大学消化疾病研究所

目录

摘要 ..... 1

Abstract ..... 3

前言 ..... 6

    0.1 乙型病毒 X 蛋白 ..... 6

    0.2 URG11 ..... 7

    0.3 DNA 甲基化 ..... 8

    0.4 5-hmC 和 TET1 ..... 9

    0.5 本文研究思路 ..... 11

第 1 章 ..... 13

    URG11 在正常肝细胞和肝癌细胞系中的差异表达 ..... 13

        1.1 材料 ..... 13

        1.2 方法 ..... 15

        1.3 结果 ..... 23

        1.4 讨论 ..... 25

        1.5 小结 ..... 26

第 2 章 ..... 27

    TET1 介导 HBx 上调 URG11 ..... 27

        2.1 材料 ..... 27

        2.2 方法 ..... 29

        2.3 结果 ..... 32

        2.4 讨论 ..... 38

        2.5 小结 ..... 39

第 3 章 ..... 41

    HBx 调控 TET1 的分子机制 ..... 41

        3.1 材料 ..... 41

        3.2 方法 ..... 43

        3.3 结果 ..... 50

        3.4 讨论 ..... 56

        3.5 小结 ..... 57

第 4 章 总结与展望 ..... 58

参考文献 ..... 60

综述 ..... 65

1. 概述 .....	65
2. MiRNA SNP 的调节机制 .....	67
3. 与肝癌相关的 microRNA SNP .....	67
4. 结论与展望 .....	69
参考文献.....	70
致谢 .....	73
攻读学位期间发表论文.....	75

## 摘要

**目的:** 乙型肝炎病毒 (HBV) 感染是全球范围内尤其是中国肝癌最常见的诱因。乙肝病毒 X 蛋白 (HBx) 具有转录激活功能, 可广泛激活病毒和宿主细胞基因转录, 促进病毒复制和宿主细胞转化, 与 HBV 复制和致癌密切相关。URG11 是一个可被 HBx 蛋白上调表达的癌基因, 可通过激活  $\beta$ -catenin 和 Wnt 信号通路, 在乙肝病毒诱导肝癌发生发展中发挥重要作用。尽管 URG11 的致癌功能已经明确, 但 URG11 如何受 HBx 上调表达尚不清楚。启动子区甲基化是 HBx 调节机体癌基因或抑癌基因表达水平的重要机制, 本论文利用表观遗传学和细胞生物学技术探讨 HBx 调控 URG11 的分子机制。

**方法:** 实时荧光定量 PCR 检测正常肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞中 TET1、HBx 和 URG11 的表达。羟甲基化 DNA 免疫共沉淀技术检测 URG11 启动子区 5-羟甲基胞嘧啶 (5-hmC) 水平。硫化测序 PCR 用于检测肝、肝癌细胞和 5-Aza 处理后 HepG2 细胞中 TET1/URG11 启动子 CpG 岛的甲基化状态。通过构建 TET1 启动子荧光载体, 与 HBx-pcDNA3/pcDNA3 质粒共转 HEK293T 细胞, 检测 HBx 是否激活 TET1 启动子。

**结果:** (1) 与 HepG2 细胞和 HL-7702 细胞相比, URG11 在 HepG2.2.15 细胞中表达较高 ( $P < 0.001$  和  $P < 0.001$ ), 甲基化率较低 (37.5%), 而另两种细胞间表达 ( $P = 0.758$ ) 和甲基化率无差异 ( $P = 0.359$ ), 表明 URG11 的表达水平与启动子 CpG 岛的甲基化水平相关; (2) 在 HepG2.2.15 细胞中, TET1 表达下调 47.3% 可使 URG11 表达下调 30.3%, 5-hmC 水平下降 22.1%; 当 HBx 过表达时, TET1 和 URG11 分别升高至原来的  $2 \pm 0.3$  倍 ( $P = 0.019$ ) 和  $1.7 \pm 0.3$  倍 ( $P = 0.011$ ), URG11 5-hmC 水平升高 23.6% ( $P = 0.021$ ); 当 HBx 表达被干扰时, TET1、URG11 的表达和 URG11 5-hmC 分别下调 31.3%, 23.3% 和 26.0%, 说明 HBx 通过上调 TET1 表达促进 URG11 的转录; (3) 与对照株 SMMC-7721PB 相比, SMMC-7721PBX 中 TET1 启动子甲基化率发生明显下降 ( $P = 0.009$ ), 暗示 HBx 可以影响 TET1 启动子 CpG 岛的甲基化水平; (4) HBx-pcDNA3 质粒促使 TET1-pGL4.17 质粒的荧光活性上升至原来的  $1.6 \pm 0.1$  倍 ( $P = 0.01$ ), 提示 HBx 可以增强 TET1 的启动活性。

**结论:** URG11 的表达水平与启动子 CpG 岛的甲基化水平呈正相关关系。HBx 可增强 TET1 启动子活性, 促进 TET1 启动子发生去甲基化并上调表达; 随后, TET1 表达的升高进一步诱导下游靶基因 URG11 启动子发生羟甲基化并促进其转录, 从而介导了 HBx 诱导 URG11 高表达及细胞恶性转化的分子过程。因此, TET1 有望成为防治肿瘤的药物新靶点。

关键词：肝癌；羟甲基化；TET1； HBx； URG11； 5-hmC；

中图分类号：Q291、R73

## Abstract

**Aim:** Hepatitis B virus (HBV) is the most common cause of liver cancer in the worldwide, especially in China. Hepatitis B virus X protein (HBx) with functions of transcriptional activation, could activate virus and host oncogenes transcription, and promote virus replication and host cell transformation, which is associated with tumorigenesis. Up-regulated gene 11 (URG11), one oncogene regulated by HBx protein, may promote  $\beta$ -catenin and Wnt signaling and play an important role in HBV-induced hepatocellular carcinoma (HCC). However, although it was clear about oncogene role of URG11, how HBx regulates URG11 expression remains largely unknown. Promoter methylation is a significant mechanism of oncogene and tumor suppressor gene expression regulated by HBx. We aimed to explore the molecular mechanism of URG11 modulated by HBx using epigenetics and cell biology technology.

**Method:** QPCR was applied to test TET1/HBx/URG11 expression level in liver cell and liver cancer cells. 5-hydroxymethylcytosine immunoprecipitation was used to assess 5-hmC level in URG11 promoter. Methylation level of TET1 and URG11 promoter were conducted in liver-related cells and 5-Aza treated HepG2 cell through BSP technology. TET1 promoter plasmid constructed was transfected into HEK293T cell, together with HBx-pcDNA3/pcDNA3 plasmid, in order to determine whether HBx could activate TET1 promoter.

**Results:** (1) Compared to HepG2 and HL-7702 cell, URG11 expression in HepG2.2.15 cell was the highest ( $P < 0.001$  and  $P < 0.001$ , respectively), with the least methylation rate (37.5%), while there was no difference on mRNA and methylation level between the other two types of cell ( $P = 0.758$  and  $P = 0.359$ ), implicating that URG11 expression was associated with methylation status of its promoter. (2) When TET1 was down-regulated by 47.3% in HepG2.2.15 cell, mRNA and 5-hmC level of URG11 reduced by 30.3% and 22.1%, respectively. With overexpression of HBx, TET1 and URG11 expression increased by  $2 \pm 0.3$  fold and  $1.7 \pm 0.3$  fold, and URG11 5-hmC level went up by 23.6% ( $P = 0.021$ ). After HBx down-regulation, decreased expression was found in TET1 (31.3%), URG11 (23.3%) and URG11 5-hmC level (26.0%), indicating that HBx promoted URG11 transcription through activating TET1 expression. (3) In contrast to SMMC-7721PB cell, CpG islands methylation level of TET1 promoter decreased significantly ( $P = 0.009$ ), showing that HBx could affect methylation status of TET1 promoter. (4)

HBx-pcDNA3 plasmid stimulated  $1.6 \pm 0.1$  fold increase in fluorescence activity ( $P = 0.01$ ), determining that HBx could enhance activity of TET1 promoter.

**Conclusions:** URG11 expression is positively associated with CpG methylation of its promoter. Firstly, HBx enhances TET1 promoter activity, resulting in demethylation and up-regulation of TET1; subsequently, increased expression of TET1 stimulates URG11 promoter hydroxymethylation and transcription, mediating in HBV-induced high expression of URG11 and malignant transformation. These findings propose that TET1 could be a promising drug target for therapy in liver cancer.

**Key Words:** liver cancer; hydroxymethylation; TET1; HBx; URG11; 5-hmC

**Chinese Library Classification:** Q291, R73



## 英文缩略语注释

英文缩写	英文全称	中文全称
<b>TET1</b>	tet methylcytosine dioxygenase 1	羟甲基化酶 1
<b>HBV</b>	hepatitis B virus	乙型肝炎病毒
<b>HBx</b>	hepatitis B virus X protein	乙肝病毒 X 蛋白
<b>URG11</b>	up-regulated gene, clone 11	上调表达基因 11
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxide	二甲基亚砷
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
<b>EDTA</b>	ethylenediamine tetraacetic acid	乙二胺甲乙酸
<b>mRNA</b>	message RNA	信使 RNA
<b>5-Aza</b>	5'-azadeocytidine	5-氮脱氧胞苷
<b>5-mC</b>	5-methylcytosine	5-甲基胞嘧啶
<b>5-hmC</b>	5-hydroxymethyl cytosine	5-羟甲基胞嘧啶
<b>TSA</b>	Trichostatin A	曲古抑制素 A
<b>BSP</b>	bisulfite sequencing PCR	硫化测序多聚酶链式反应
<b>QPCR</b>	real-time quantitative PCR	实时定量多聚酶链式反应
<b>RT-PCR</b>	reversed transcript PCR	反转录多聚酶链式反应
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液

## 前言

肝癌是我国最为常见的恶性肿瘤之一。根据我国《2012 中国肿瘤登记年报》报道,肝癌的发病率和死亡率各占全国恶性肿瘤的第四位和第二位。除遗传因素外,乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、酗酒、肥胖、高血压和糖尿病等因素均会诱导肝癌的发生发展<sup>[1]</sup>。

我国是 HBV 感染高流行区,并且 HBV 慢性感染者比非感染者患肝癌的概率高 120 倍,故乙型病毒性肝炎是我国最为常见的肝癌诱发因素<sup>[2]</sup>。然而,HBV 诱发肝炎向肝癌恶性转化的具体机制尚不明确。因此,本研究基于此现状,以表观遗传学和细胞生物学技术为手段,研究乙型肝炎病毒 X 蛋白诱导癌基因 URG11 上调表达的分子机制,有助于揭示非可控性炎症恶性转化的调控网络及其分子机制,为发现预测和诊断肿瘤的新标志或防治肿瘤的药物靶点奠定基础。

### 0.1 乙型病毒 X 蛋白

乙型病毒性肝炎(viral hepatitis type B)是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)引起的,主要通过血液传播途径传播的肝脏疾病,简称乙型肝炎。HBV 共编码 4 种蛋白,其中乙型病毒 X 蛋白(HBx)是由 HBx 基因编码的一种多功能调节型蛋白<sup>[3]</sup>,共 154 个氨基酸组成,蛋白大小为 17KD,为 HBV cccDNA 转录和病毒复制所必需,在 HBV 致癌性中起到关键作用<sup>[4]</sup>。

目前为止,HBx 蛋白的功能并没有完全研究清楚。清楚的是,HBx 蛋白在 HBV 复制和病毒感染等过程中起着重要的调节作用。HBx 蛋白是一种反式激活因子,以蛋白-蛋白相互作用的方式,激活病毒或宿主细胞基因的启动子和增强子,包括 HBV 增强子、c-jun、c-fos 和 c-myc 等原癌基因。它并不直接结合到 DNA 序列上,而是通过调控与之相互作用的核转录因子,如激活蛋白 1(AP1)、核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、特异性蛋白 1(Sp-1)、cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)等<sup>[5]</sup>,或促进靶基因的表观遗传修饰发生改变,进一步影响靶基因的转录活性,改变细胞质中的多种信号转导途径,如 Ras, Raf, c-jun, MAPK, NF- $\kappa$ B<sup>[6, 7]</sup>,进而诱发肝癌的发生。上述信号通路的激活也可通过反式激活细胞信号级联和癌基因刺激肝细胞增殖,促进 HBx 蛋白介导的肝癌发生<sup>[8]</sup>。另外,HBx 蛋白促进细胞周期进程,使负自分泌生长调控因子失活,还能结合并下调 p53 肿瘤抑制基因<sup>[5]</sup>、其他肿瘤抑制基因和衰老相关因子,或使其失活。此外,HBx 蛋白可通过多种其他途径促进肝癌的发生发展。1) HBx 蛋白通过诱导血管再生促进肝癌的发生。它的表达可导致血管生成因子——血管内皮生长因子、金属蛋白酶(MMPs)等,进一步促进肿瘤的侵袭和迁移;2) HBx 蛋白能够通过调控 Rab-18 诱导脂肪生成紊乱促进肝癌的恶性转化等。

HBx 蛋白诱发肝癌的机制可归纳为六种方式<sup>[4, 9]</sup>：（1）表观遗传修饰 HBx 蛋白通过影响甲基转移酶转录或与之相互作用导致肿瘤抑癌基因沉默或肿瘤癌基因表达上调促进癌变；（2）细胞凋亡 HBx 蛋白高表达时激活死亡受体促进细胞凋亡，而低表达时抑制 p53 介导的凋亡从而抑制凋亡<sup>[10]</sup>；（3）端粒酶活性 HBx 能够增加端粒酶逆转录酶表达以及端粒酶活性，延长肝细胞的寿命并促进其恶性转化<sup>[11, 12]</sup>；（4）核苷酸切除修复（NER）HBx 蛋白抑制细胞周期检查点机制结合到损伤的 DNA 序列上，干扰 NER 并促进宿主细胞 DNA 突变的积累<sup>[13]</sup>；（5）HBx 蛋白羧基端截断 HBx 蛋白羧基端对于蛋白的反式转录催化活性以及控制细胞增殖和变异具有关键作用，为 HBx 蛋白促凋亡功能所必需，因此其羧基端截断能增强其致癌性<sup>[14, 15]</sup>；（6）胰岛素样生长因子 II（IGF-II）IGF 通路参与癌细胞的增殖和抗凋亡途径，因此，HBx 通过正向调节 IGF-II 转录，刺激转录因子 Sp-1 的结合，增加内源性 IGF-II 的表达水平，诱发肝癌<sup>[16]</sup>。

综上所述，HBx 蛋白在肝癌的发生发展过程中起到关键作用，因此研究 HBx 的致癌性机制对于肝癌的预防和诊断具有重要的临床价值。

## 0.2 URG11

URG11 是利用抑制消减杂交及全长 PCR 扩增技术（RACE-PCR）克隆的新基因，定位在人类 11 号染色体（图 0.1），基因全长 3074 bp，编码区为 202 个碱基对，含有 13 个外显子编码 673 个氨基酸，编码 70KD 的蛋白<sup>[17]</sup>。该蛋白具有 5 个表皮生长因子重复结构域和一个 C 型植物凝集素结构域<sup>[18]</sup>。这些结构域在细胞黏附、迁移、细胞/基质相互作用以及免疫反应中具有重要作用<sup>[19-22]</sup>。

URG11 是一个可以被 HBx 上调表达的基因，但是涉及的具体分子机制尚不清楚。URG11 与肿瘤恶性生物学行为密切相关，可激活  $\beta$ -catenin 和 Wnt 信号通路，在乙肝病毒诱导肝癌发生过程中具有重要的作用。目前研究表明， $\beta$ -catenin 是 URG11 的下游靶基因，因此 URG11 可能是  $\beta$ -catenin 信号通路的一个调节元件<sup>[23]</sup>。在肝癌细胞中，URG11 能激活  $\beta$ -catenin 启动子活性并能增强  $\beta$ -catenin 的稳定性，促进肝癌细胞增殖、分化和存活<sup>[23]</sup>，促进 HepG2 细胞的周期由 G1 期向 S 期进展，并具有促进肝癌细胞裸鼠体内的成瘤能力<sup>[17]</sup>。

同样，URG11 也能通过激活  $\beta$ -catenin 信号通路促进胃癌细胞的生长和迁移<sup>[18]</sup>。与癌旁组织相比，胃癌组织中 URG11 高表达，且与  $\beta$ -catenin 表达呈正相关关系。在胃癌细胞中 URG11 可激活  $\beta$ -catenin 启动子的活性从而促进  $\beta$ -catenin 的表达以及其在细胞核中的积聚。并且细胞核中  $\beta$ -catenin 可与 TCF 家族的转录因子结合，从而导致  $\beta$ -catenin/TCF 以及其下游效应基因 cyclin D1 和 MT1-MMP 的激活，从而可促进胃癌细胞增殖和迁移<sup>[19]</sup>。

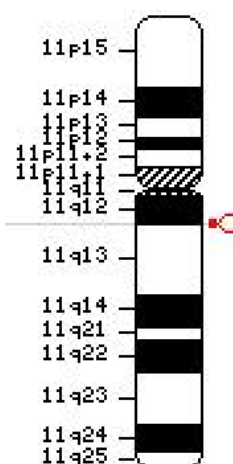


图 0.1 URG11 染色体定位

另外, URG11 能够通过调节 E-cadherin 和  $\beta$ -catenin 表达介导缺氧诱导的上皮细胞向间充质细胞转化 (EMT)<sup>[24]</sup>。研究表明, URG11 在 HK2 细胞中过表达会促进间质表型的出现, 并伴随着上皮细胞标记 E-cadherin 表达降低、间充质细胞标记 vimentin 和  $\alpha$ -SMA 表达上调; 当 URG11 沉默后能够逆转上述变化。因此, 在缺氧条件下, URG11 能反式激活  $\beta$ -catenin 启动子, 进而促进  $\beta$ -catenin 的表达和细胞核积聚, 上调  $\beta$ -catenin/T-cell factor (TCF) 以及其下游效应基因——vimentin 和  $\alpha$ -SMA, 从而介导了缺氧诱导的 EMT 并参与肾纤维化过程<sup>[24]</sup>。

由此可见, URG11 在肝炎向肝癌恶性转化的过程中起到重要作用。研究 HBx 诱导 URG11 上调表达在慢性乙型肝炎恶性转化中的价值及其分子机制, 从而为寻找有效的肝癌治疗方法提供新的依据。

### 0.3 DNA 甲基化

DNA 甲基化是指 DNA 在 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 的催化下, 以 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 为甲基供体, 将甲基转移到特定的碱基上的过程<sup>[25]</sup> (图 2)。甲基化是 DNA 分子的主要化学修饰方式之一, 也是表观遗传修饰的常见方式, 主要通过影响染色质的结构阻止转录因子与启动子或增强子的结合调控基因的表达。

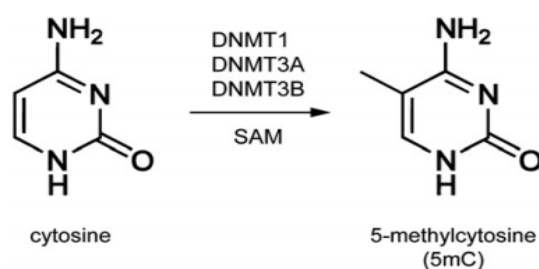


图 0.2 DNA 甲基化过程

和其他肿瘤一样，肝癌的发生是一个调节型基因发生遗传和表观遗传改变进而导致癌基因激活以及肿瘤抑制基因沉默或丢失的多步骤过程<sup>[26]</sup>。与非肝癌组织相比，肝癌组织中 DNA 甲基化状态发生异常改变。在肝癌发生的过程中，肿瘤相关基因的甲基化异常不仅发生在肿瘤晚期还发生在癌症早期甚至更早的炎症阶段<sup>[26, 27]</sup>。肿瘤抑制基因或肿瘤相关基因的沉默与启动子区 CpG 岛的高甲基化有关，并伴随着基因 mRNA 转录表达水平下降<sup>[28]</sup>。这种因表观遗传修饰而沉默的基因通常参与肿瘤发生的重要分子通路，如细胞周期调控、细胞凋亡、DNA 修复和细胞黏附。全基因组 DNA 的低甲基化则会导致基因阻的不稳定性，影响 DNA 重复序列、组织特异性基因和原癌基因的正常表达，或者引起等位基因表达印记的丢失。另外，DNA 低甲基化水平可随着肿瘤的发展而增加<sup>[26]</sup>。

在肝癌发生过程中，HBx 可诱导异常的甲基化状态，表现为两种方式。一种方式是 HBx 诱导宿主肿瘤抑制基因或相关基因发生高甲基化<sup>[29]</sup>。HBx 通过上调 DNMT 的活性，或者直接与 DNMTs 相互作用，促使 DNMTs 募集到宿主细胞具有肿瘤抑制或相关基因的启动子区 CpG 岛区域<sup>[4, 30, 31]</sup>，诱导基因高甲基化的发生并下调其表达<sup>[32, 33]</sup>。这些被高甲基化的基因功能发生异常将会进一步影响细胞周期调控、细胞生长、增殖、侵袭、凋亡、免疫逃逸以及异生物质代谢等生物过程<sup>[34]</sup>，最终促进 HBV 诱导肝癌的发生发展。另一种方式是 HBx 能够诱导促癌相关基因发生特异性 DNA 发生去甲基化，呈现低甲基化状态，这会影响基因组或染色体的稳定性并上调它们的表达<sup>[29]</sup>，如 ALDH1，CRBP1 和 CDH6 等。这些与肿瘤发生相关的基因转录活性的改变可影响细胞交流、黏附、信号转导和代谢等重要的生物活动，促进肿瘤发生发展<sup>[34]</sup>。然而，HBx 诱导的基因启动子发生去甲基化的具体机制尚未清楚。

#### 0.4 5-hmC 和 TET1

最近研究发现，由 TET 家族催化的羟甲基化参与 DNA 去甲基化过程。TET 家族蛋白是一种依赖  $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -keto-glutarate,  $\alpha$ -KG)和 Fe<sup>2+</sup>而发挥催化活性的双加氧酶<sup>[35]</sup>，共有三个成员，即 TET1、TET2 和 TET3。所有 TET 蛋白都含有一个具催化活性的羧基末端 CD 域(含 Cys-rich 结构域和 DSBH 结构域)。

TET 家族(羟甲基化酶家族)成员之一的 TET1 能够催化 5-mC 转变为 5-羟甲基胞嘧啶(5-hmC)，干扰 DNMT1 的活性进而导致在后续的复制过程中甲基化丢失，随后 5-hmC 进一步氧化为 5-胞嘧啶甲酰(5-formylcytosine, 5-fC) 和 5-胞嘧啶羧基(5-carboxylcytosine, 5-aC)<sup>[36, 37]</sup>，或者在胞苷脱氨酶(AID)等的作用下转化为 5-hmU<sup>[38]</sup>最终导致 DNA 发生去甲基化(图 3)并上调表达因甲基化沉默的基因。

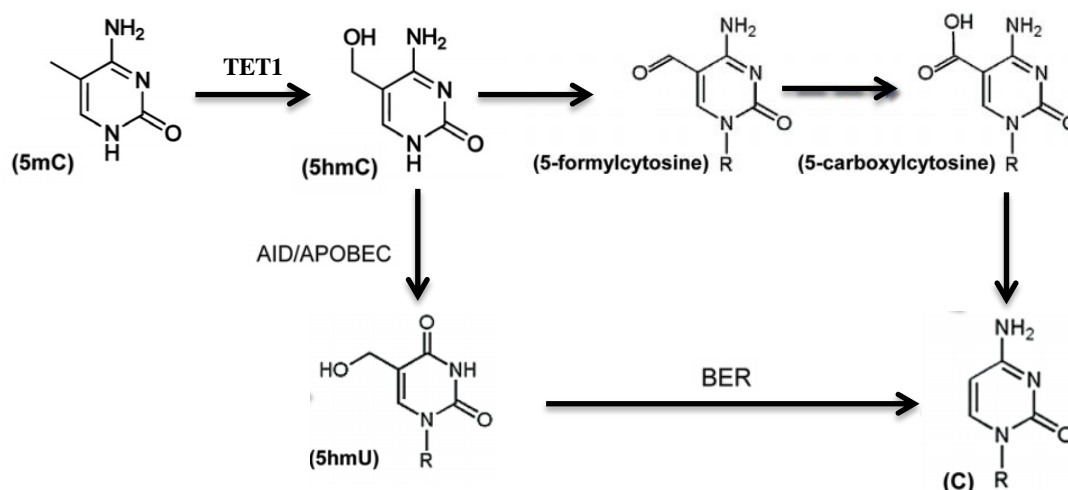


图 0.3 TET1 参与的 DNA 去甲基化过程

AID: 胞嘧啶脱氨酶 APOBEC: 载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽

BER: base excision repair pathway 碱基切除修复

如 5-mC 一样，5hmC 也是一种重要的胞嘧啶修饰形式，现在被看作为“第六碱基”，是 DNA 去甲基化中的一种中间物。5-hmC 在大脑和胚胎干细胞含量高，也存在于人体其他组织。现有研究表明，5-hmC 和 TET 家族在很多生物过程，如表观遗传重编程、基因调控、DNA 甲基化调控和癌症等疾病中发挥独特的生物学作用。5-hmC 与基因的转录活化密切相关。除了能引发 DNA 去甲基化，5-hmC 还能改变染色体结构，或通过抑制 DNA 甲基化结合蛋白的结合或募集 5-hmC 结合蛋白和转录因子调控基因转录，如 5-hmC 能阻碍 DNMT1 介导的胞嘧啶甲基化<sup>[39]</sup>。由于不同类型的癌症中 5-hmC 水平发生显著降低，因此 5-hmC 在肿瘤发生发展中具有重要作用。作为一种新型表观遗传修饰分子标记，5-hmC 有望发展成为肿瘤早期诊断和预后的新靶标。

人类 TET1 基因定位于染色体 10q20，含有 134 kb 碱基，其转录本有 12 个外显子，大约 9.6 kb，其蛋白是由 2136 个氨基酸编码，分子大小为 236 KDa<sup>[40]</sup>。TET1 是一个多功能结构域蛋白，具有核定位序列 (NLS)、CXXC 结构域、半胱氨酸富含区域以及催化结构域 DSBH<sup>[41]</sup> (图 0.4)。TET1 的 CXXC 结构域能够结合到甲基化或者未甲基化 DNA 序列中的 CpG 富集区<sup>[42, 43]</sup>，故此结构域能决定和影响 TET1 与 DNA 序列的结合。

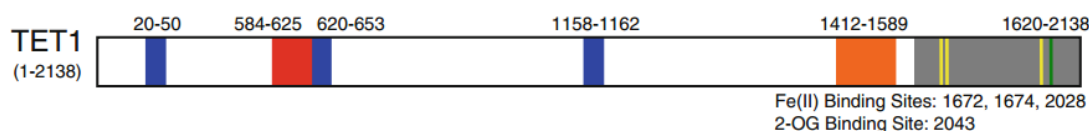


图 0.4 TET1 结构域

蓝色条带为核定位序列，红色条带为 CXXC 结构域，橘色条带为半胱氨酸富集区，灰色条带为 DSBH 结构域，黄色条带为 Fe(II)结合位点，绿色条带为 2-OG 结合位点。

TET1 在大脑和胚胎干细胞中高表达，但在分化过程中其表达迅速下降<sup>[37, 44]</sup>。TET1 主要结合在 CpG 富集的转录起始位点，其下游靶基因参与许多重要的细胞生物过程，尤其是在发育和分化过程<sup>[45]</sup>。另外，大多数 TET1 的靶基因的启动子区含有较高密度 CpG 岛的启动子；同样的，hmC 也富集在转录起始位点和基因体，与 TET1 共同定位在较高 CpG 密度的序列上<sup>[45]</sup>，因此 TET1 在 CpG 富集区的 mC 转化为 hmC 代谢过程中起到重要作用。

在人类细胞中，TET1 过表达可激活甲基化沉默的报告基因的活性和内源性基因组 DNA 去甲基化<sup>[46]</sup>。研究发现在肝癌组织中，TET 1 表达下调，5-hmC 水平也减少了，这说明 TET1 和 5-hmC 与肝癌的发生发展有关。此外，肝癌组织中 5-hmC 水平与总生存期相关联，而癌旁组织中 5-hmC 水平高低与肝癌复发的可能性有关，表明 5-hmC 可作为肝癌预后的一种分子标记<sup>[47]</sup>。然而，TET1 在实体肿瘤中表达受抑制以及 TET1 调控肿瘤生长和代谢的机制尚不清楚。

## 0.5 本文研究思路

URG11 是一个被 HBx 上调表达的基因，但是涉及的分子机制目前尚不清楚。为探究 HBx 上调 URG11 表达的具体机制，我们首先在不同细胞系中进行 URG11 转录水平和 DNA 甲基化水平差异检测，探究 URG11 的转录水平差异是否与其启动子甲基化程度相关。由于 TET1 介导 DNA 的去甲基化过程，因此我们猜测，若三者细胞株 URG11 启动子甲基化水平存在差异，则 TET1 很可能通过诱导羟甲基化介导 HBx 上调 URG11 的分子过程。为验证这一点，我们通过 HBx-pcDNA3 表达载体瞬转 HepG2 细胞、TET1 siRNA/HBx siRNA 干扰 HepG2.2.15 细胞中 HBx 蛋白和 TET1 的表达，结合实时荧光定量 PCR 和羟甲基化 DNA 免疫共沉淀技术检测 HBx/TET1/URG11 的 mRNA 水平以及 URG11 5-hmC 水平的变化，并在 HBx 稳转株 SMMC-7721PBx 和其对照株 SMMC7721PB 中进行重复验证。

文献提示 TET1 在乳腺癌里受甲基化调控，而 TET1 在肝癌里是否同样受甲基化调控尚不清楚。为此，我们对 HepG2 细胞进行 5-Aza 去甲基化处理，利用实时荧光定量 PCR 和硫化测序 PCR 技术检测 TET1 的 mRNA 水平和启动子区甲基化程度。为进一步探讨 HBx 如何调控 TET1 的表达，我们同样采用硫化测序

PCR 技术检测 SMMC-7721PBX 和 SMMC-7721PB 中对 TET1 启动子甲基化水平。此外，我们构建了 TET1 启动子荧光载体 TET1-pGL4.17，结合双荧光素酶报告基因检测技术，探究 TET1 是否是 HBx 的靶基因。



## 第 1 章

### URG11 在正常肝细胞和肝癌细胞系中的差异表达

URG11 是一个可以被乙肝病毒 X 蛋白 (HBx) 上调的基因, 而 HBx 上调癌基因可通过甲基化修饰方式进行。因此, 我们对所培养的正常肝细胞 HL-7702, 整合 HBV 基因组的 HepG2.2.15 细胞和肝癌细胞 HepG2 分别从 mRNA 水平和 DNA 甲基化水平, 进行实时荧光定量 PCR 和硫化测序 PCR (BSP), 比较癌基因 URG11 在正常、HBV 感染及癌症不同发展阶段的表达差异以及启动子区的甲基化水平, 探究 URG11 的表达差异是否与甲基化修饰相关。

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 细胞株

HL-7702、HepG2.2.15 和 HepG2 细胞株均为本实验保存。

##### 1.1.2 试剂

DMEM basic (1×): Dulbecco's Modified Eagle Medium with high glucose (Gibco);

FBS: Fetal Bovine Serum (Gibco);

400mL 10×PBS (上海双螺旋科技有限公司);

0.25% Trypsin-EDTA (Gibco);

TRIzol (Invitrogen);

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems);

QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen);

QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen);

EpiTect® Fast Bisulfite Conversion (Qiagen);

Taq<sup>TM</sup> Hot Start Version (Takara);

pMD19-T vector (Takara);

Trans5 α Chemically Competent Cell (TransGen);

TaqMan® Gene Expression Master Mix (Life technology);

URG11 probe and GAPDH probe (Life technology);

D2000 DNA Marker (Tiangen);

Regular Agarose G10 (Biowest);

酵母提取物 (OXOID);

蛋白胨 (OXOID);

琼脂粉 (上海文旻生化科技有限公司);

氯化钠（上海大合化学品有限公司）；

无水乙醇（上海振兴化工一厂）；

Ampicillin（上海生工生物工程有限公司）；

胶回收试剂盒（天根）；

质粒抽提试剂盒（Axygen）；

50×TAE（上海生工生物工程有限公司）；

D2000 Marker（天根）；

6×Loading Buffer（Takara）；

1×PBS：量取 40 mL 10×PBS，使用超纯水定容至 400 mL，121℃ 高压灭菌 30 min，室温保存；

1×核酸电泳缓冲液：量取 20 mL 50×TAE，使用蒸馏水定容至 1 L，混匀后室温保存；

1.5 % 琼脂糖核酸电泳胶：称取 0.3 g 琼脂糖粉，加入 1×TAE 30 mL，放置于微波炉中加热溶解，待其温度降低至 40℃-50℃，吸取微量溴化乙锭，摇匀，倒入制胶槽，插入梳子，冷却凝固即可；

LB 液体培养基（100 mL）：称取 0.5 g 酵母提取物、1 g 蛋白胨和 1g NaCl，加入 100 mL 去离子水混匀，121℃ 高压灭菌 30 min，4℃ 保存；

LB 固体培养基（100 mL）：在液体配方的基础上加上 1.5 g 琼脂粉，121℃ 高压灭菌 30 min，4℃ 保存；

100 mg/mL 氨苄青霉素水溶液：称取 1 g Ampicillin 置于 15 mL 塑料离心管中，加入 9 mL 超纯水，充分混合溶解之后定容至 10 mL，分装至 1.5 mL 离心管，每管 1mL，冻存在-20℃ 冰箱。

### 1.1.3 URG11 RT-PCR 和硫化测序 PCR 引物序列

引物名称	正向序列（5' to 3'）	反向序列（5' to 3'）
<b>GAPDH</b>	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC
<b>URG 11</b>	GAGTACGGCTGTGACCTTACC	GAGGAGGTTACACATTCGTCAA T
<b>URG11bsp</b>	GGGGTAAAGATTAGGGATTTT	AAACCTTCTAACAAACTAAAAA CAA

### 1.1.4 仪器

SDJ-ZS 双人超净工作台（上海淀山湖净化设备厂）；

MCO-18AIC CO2 细胞培养箱（日本三洋公司）；

DM1L 倒置显微镜（德国 Leica 公司）；

HWS12 恒温水浴锅（上海一恒科技有限公司）；  
称量仪（Sartorius）；  
Centrifuge 5415 R（Eppendorf）；  
Centrifuge 5418（Eppendorf）；  
Thermomixer comfort（Eppendorf）；  
C723 ND-1000 UV/Vis 分光光度仪（美国 NanoDrop 公司）；  
Veriti 96 well thermo cycler（Applied Biosystems）；  
Prism 7900 Detector System（Applied Biosystems）；  
Bio-rad PowerPac 300 电泳仪；  
隔水式恒温培养箱（上海一恒科技有限公司）；  
Tocan 领成全自动凝胶成像系统（上海领成生物科技有限公司）；  
THZ - 052 型气热式恒温摇床（SHAKER 公司）；  
低温冰箱（海尔）；  
AF-100 制冰机（Scotsman）。

#### 1.1.4 生物学软件

Primer Premier 5.0 引物设计软件；  
SDS 2.3 RT-PCR 分析软件（Applied Biosystems）；  
Chromas 测序结果分析软件（Applied Biosystems）；  
SPSS 20.0 数据分析软件；  
Tocan 成像软件；  
CpG viewer 分析软件；  
GraphPad Prism 5 作图软件。

## 1.2 方法

### 1.2.1 肝/肝癌细胞系的复苏和传代培养

细胞复苏：将 HL-7702 细胞、HepG2 细胞、HepG2.2.15 细胞从 -80℃ 超低温冰箱中取出，放入 37℃ 水浴锅中，待其完全融化，转移至带有 5mL 培养基的 15 mL 离心管中，1200 rpm 离心 5 min。丢弃上清液，加入 1 mL 新鲜的含有 10% FBS 的 DMEM 培养基，混匀后，转移至带有 8 mL 培养基的 10 cm 培养皿中，混匀后放置于 37℃ 细胞培养箱中进行传代培养；

细胞换液：将细胞培养基吸出，加入 1×PBS 清洗 2 遍吸出，按照培养皿/细胞板的大小加入相应体积的新鲜培养基即可；

细胞传代：待培养皿中的细胞密度达到 90% 以上时即可进行传代，吸出培养基，加 1×PBS 清洗 2 遍吸出，加 500  $\mu$ L Trypsin-EDTA（10 cm 培养皿）。待细

胞消化成游离的单个细胞时,加入培养基终止消化,吹打混匀,按照一传三比例,传入新的培养皿中,加入培养基即可;

细胞冻存:配置含有 10% DMSO 的 DMEM 培养基,放置在 4℃ 冰箱预冷;将细胞消化成游离细胞后,加入培养基终止消化,并将液体转移至 15mL 离心管中,1200 rpm 离心 3 min,弃上清,向细胞沉淀中加入含有 10% DMSO 的 DMEM 培养基,吹打混匀后,吸取 1 mL 细胞冻存液转移至 2 mL 的细胞冻存管中,封口膜封口,放置在室温中的细胞冻存盒后冻存在 -80℃ 超低温冰箱。

### 1.2.2 细胞总 RNA 提取

实验之前,向实验器材和实验台喷洒 RNA 酶抑制剂。实验开始前,将培养皿中的培养基吸出,1×PBS 清洗一次后加入 1 mL TRIzol 裂解细胞。

- (1) 加入 200  $\mu$ L 氯仿,振荡混匀后,室温放置 5 min;
- (2) 4℃, 13,200 rpm, 离心 10 min;
- (3) 吸取上层水相至另一个离心管中,此步骤一定要注意,千万不要吸到中间界面;
- (4) 加入同等体积的异丙醇,温和混匀,室温下放置 5 min;
- (5) 4℃, 13,200 rpm, 离心 15 min,弃上清,可见白色块状的 RNA 沉于管底;
- (6) 每管中加入新鲜配置的 1 mL 75%乙醇,温和振荡离心管,悬浮沉淀;
- (7) 12,000×g 离心 5 min,倒掉上清,再加入 1 mL 75%乙醇,12,000×g 离心 5 min 倒掉上清,乙醇除尽。用最小量程的枪吸尽;
- (8) 加入 25  $\mu$ L DEPC 水溶解 RNA。

### 1.2.3 DNA/RNA 浓度测定

吸取 1  $\mu$ L DEPC 水作为空白对照,吸取 1  $\mu$ L DNA/RNA 原液,使用浓度测定仪器测定 DNA/ RNA 浓度。

### 1.2.4 逆转录 PCR ( Reverse transcription PCR)

使用总量为 500 ng RNA 进行逆转录 PCR,反应体系如下:

10×RT Buffer	2.5 $\mu$ L
25×dNTP mix(100mM)	1.0 $\mu$ L
10×RT Random Primer	2.5 $\mu$ L
Reverse Transcriptase	1.0 $\mu$ L
RNA +H <sub>2</sub> O	18 $\mu$ L
Total	25 $\mu$ L

将 RNA 样品按照上述体系加入到八联管中，振荡混匀，离心后放入 PCR 仪中，按照如下 PCR 程序进行逆转录反应。

	Stage 1	Stage2	Stage3	Stage4
<b>Temperature</b>	25℃	37℃	85℃	4℃
<b>Time</b>	10 min	120 min	5 min	∞

### 1.2.5 荧光实时定量 PCR (Real time PCR)

- (1) 将 SYBR mix、cDNA 从冰箱取出解冻；
- (2) 按照说明书要求配制 RT-PCR 反应体系，反应体系为：

SYBR 法 PCR 体系：

SYBR Mix	5.0 $\mu$ L
Primers (2 $\mu$ M)	1.0 $\mu$ L
cDNA+H <sub>2</sub> O	4.0 $\mu$ L

Total per Reaction 10.0  $\mu$ L

- (3) 将 cDNA 模板稀释 20 倍并将稀释好的 cDNA 模板加入 384 孔板中，再将配置好的引物和 Mix 溶液的混合液加入到板中，384 孔板封口膜封板，2000 rpm 离心 2 min，混匀；
- (4) 放入 ABI Prism 7900 Detector System (Applied Biosystems) 中，采用两步法 RT-PCR 扩增标准程序进行 PCR；

	Stage1	Stage2	Stage3		Stage 4		
Temperature	50℃	95℃	95℃	60℃	95℃	60℃	95℃
Time	2 min	10 min	15 s	1 min	15 s	15 s	15 s
Repeats	1		40			1	

- (5) 使用 SDS 2.3 软件分析 PCR 结果。

### 1.2.6 细胞 DNA 提取

- (1) 将细胞从培养箱拿出，吸出培养基 1×PBS 清洗两次，加入 500  $\mu$ L 0.25% EDTA-trypsin 消化 5 min；
- (2) 待细胞消化完毕，加入 1 mL 含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基终止消化，并将培养液转移到 1.5 mL 离心管中，3500 rpm 离心 5 min；
- (3) 吸掉培养液，向细胞沉淀中加入 200  $\mu$ L 1×PBS，吹打混匀；

- (4) 加入 20  $\mu\text{L}$  Protease K;
- (5) 加入 200  $\mu\text{L}$  AL 溶液, 涡旋振荡 15 s, 混匀, 快速离心;
- (6) 56 $^{\circ}\text{C}$  水浴 2 h, 快速离心移除离心管盖上的液体;
- (7) 加入 200  $\mu\text{L}$  无水乙醇, 涡旋振荡 15 s, 快速离心;
- (8) 将步骤 7 中的液体转移到 QIAamp Mini spin column(离心柱)中, 14,000 rpm 离心 1 min;
- (9) 将离心柱放置在新的 2 mL 收集管中, 丢弃含有废液的收集管;
- (10) 打开离心柱盖子, 加 500  $\mu\text{L}$  AW1 溶液, 8000 rpm 离心 1 min, 弃废液;
- (11) 将离心柱放置在新的 2 mL 收集管中, 加 500  $\mu\text{L}$  AW2 溶液, 14,000 rpm 离心 3 min;
- (12) 将离心柱放置在新的 2 mL 收集管中, 14,000 rpm 离心 1 min;
- (13) 将离心柱放置在 1.5 mL 离心管中, 向柱膜中央加入生工水 50  $\mu\text{L}$ , 室温放置 1 min, 8000 rpm 离心 1min;
- (14) 重复步骤 13, 丢弃柱子, 获得 DNA 溶液, 测 DNA 浓度, 保存在-20 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中储存。

### 1.2.7 URG11 启动子硫化测序 PCR (BSP)

原理: 用亚硫酸盐处理 DNA 样品, 将未甲基化的 C 转化为 U, 而保持甲基化的 C 不变。在 PCR 过程中, U 转化为 T, 而甲基化的 C 转化为一般的 C。亚硫酸盐将表观遗传学事件转化成了基因组的变化, 从而可以通过基于 PCR 的方法进行分析。根据样品经亚硫酸盐处理后的序列设计 BSP 引物, 引物设计在待研究的一组 CpG 位点的两侧, 扩出包括不同待测样品中目的 CpG 岛的序列, 将目的片段割胶回收, 装 TA 克隆、测序, 数据统计分析得到不同样本中各 CpG 位点甲基化状态的频率。

#### 1.2.7.1 DNA 亚硫酸盐处理

- (1) 取出冻存的 DNA 解冻, 确保亚硫酸氢盐溶液是完全溶解的;
- (2) 取 500 ng DNA, 按照如下表格按顺序向 200  $\mu\text{L}$  PCR 管中加入试剂:

	<b>High-concentration samples (1 ng–2 µg)</b>	<b>Low-concentration samples (1–500 ng)</b>
<b>Component</b>	Volume per reaction (µL)	Volume per reaction (µL)
<b>DNA</b>	≤ 20 µL	≤ 40 µL
<b>RNase-free water</b>	20- Volume <sub>(DNA)</sub>	40- Volume <sub>(DNA)</sub>
<b>Bisulfite Solution</b>	85 µL	85 µL
<b>DNA Protect Buffer</b>	35 µL	15 µL
<b>Toal</b>	140 µL	140 µL

3) 盖紧 PCR 管，振荡混匀，快速离心，放置于 PCR 仪中，按照以下程序进行转化反应：

<b>Steps</b>	<b>Time</b>	<b>Temperature</b>
<b>Denaturation</b>	5 min	95°C
<b>Incubation</b>	20 min	60°C
<b>Denaturation</b>	5 min	95°C
<b>Incubation</b>	20 min	60°C
<b>Hold</b>	Indefinite	20°C

- (4) 快速离心，将 PCR 管中的溶液转移到 1.5 mL 离心管中；
- (5) 向离心管中加入 250 µL 无水乙醇，涡旋振荡 15 s，混匀，快速离心；
- (6) 将每管中的液体转移到相应的柱子中，14,000 rpm 离心 1 min，丢弃废液，将柱子重新放入收集管中；
- (7) 每个柱子中加入 500 µL Buffer BW，14,000 rpm 离心 1 min，丢弃废液，将柱子重新放入收集管中；
- (8) 每个柱子中加入 500 µL Buffer BD，盖紧盖子，室温孵育 15 min；
- (9) 14,000 rpm 离心 1 min，丢弃废液，将柱子重新放入收集管中；
- (10) 向柱子中加入 500 µL BW 溶液，丢弃废液，将柱子重新放入收集管中；
- (11) 重复步骤 10；
- (12) 每个柱子中加入 250 µL 无水乙醇，14,000 rpm 离心 1 min；
- (13) 将柱子放入新的 2 mL 收集管中，14,000 rpm 离心 1 min；
- (14) 将柱子放入 1.5 mL 离心管中，并将 15 µL Buffer EB 加入到柱子中央，盖紧盖子，室温放置 1 min，14,000 rpm 离心 1 min 洗脱 DNA；
- (15) 重复步骤 14，所获取的 DNA 溶液放置于 -20°C 低温冰箱。

### 1.2.7.2 PCR

(1) PCR 反应扩增 URG11 的目的片段, 按照如下体系配置:

10×PCR buffer	2.0 $\mu\text{L}$
2.5 mmol/L dNTP	2.0 $\mu\text{L}$
5 $\mu\text{M}$ primer	2.0 $\mu\text{L}$
Takara Hot Start Taq	0.2 $\mu\text{L}$
DNA	4.0 $\mu\text{L}$
Water	9.8 $\mu\text{L}$
<hr/>	
Total	20 $\mu\text{L}$

(3) 使用 Touchdown PCR 摸索 URG11 BSP 引物退火温度, 反应程序如下:

94°C	5 min	
94°C	30 s	} 40 cycles
52/54/56/58/60/62°C	20 s	
72°C	30 s	
4°C	$\infty$	

(4) 1.5% 琼脂糖 DNA 电泳验证, 确定 URG11 bsp 引物的退火温度为 56°C;

(5) 确定退火温度为 56°C 后, 按照上述体系和反应程序进行 PCR 反应。

### 1.2.7.3 PCR 产物胶回收

- (1) 配置 1.5% 琼脂糖电泳胶, 将 20  $\mu\text{L}$  PCR 产物和 4  $\mu\text{L}$  6×Loading Buffer 混匀;
- (2) 拔掉梳子, 将琼脂糖胶放入电泳液中, 使胶孔浸润, 取 3  $\mu\text{L}$  D2000 Marker 加入孔中, PCR 产物和 Loading Buffer 混合液全部加入孔中, 恒压 240 V, 电泳 20 min;
- (3) 电泳完毕, 将琼脂糖胶放置在凝胶成像仪中, 准备割胶;
- (4) 在紫外灯下切下含有目的 DNA 的琼脂糖凝胶, 用纸巾吸尽凝胶表面液体并切碎。计算凝胶重量 (提前记录 1.5 mL 离心管重量), 该重量作为一个凝胶体积 (如 100 mg = 100  $\mu\text{L}$  体积);
- (5) 加入 3 个凝胶体积的 Buffer DE-A, 混合均匀后于金属浴 75°C 加热, 间断混合 (每 2-3 min), 直至凝胶块完全熔化 (约 6-8 min);
- (6) 加 0.5 个 Buffer DE-A 体积的 Buffer DE-B, 混合均匀, 加入 1 个凝胶体积的异丙醇;
- (7) 吸取步骤 3 中的混合液, 转移到 DNA 制备管 (置于 2 mL 离心管) 中, 12,000×g 离心 1 min, 弃滤液;



- (8) 将制备管置回 2 mL 离心管, 加 500  $\mu\text{L}$  Buffer W1,  $12,000\times g$  离心 30 s, 弃滤液;
- (9) 将制备管置回 2 mL 离心管, 加 700  $\mu\text{L}$  Buffer W2,  $12,000\times g$  离心 30 s, 弃滤液;
- (10) 以同样的方法再用 700  $\mu\text{L}$  Buffer W2 洗涤一次,  $12,000\times g$  离心 1 min;
- (11) 将制备管置回 2 mL 离心管中,  $12,000\times g$  离心 2 min;
- (12) 将制备管置于洁净的 1.5 mL 离心管中, 在制备膜中央加 25-30  $\mu\text{L}$  Eluent 或去离子水 (加热至  $65^{\circ}\text{C}$ ), 室温静置 1 min,  $12,000\times g$  离心 1 min 洗脱 DNA;
- (13) 重复步骤 15, 获得 DNA 溶液, 测 DNA 浓度。

#### 1.2.7.4 TA 克隆

- (1) 取出 pMD<sup>®</sup> 19-T vector 和 Solution I, 放置于冰上解冻;
- (2) 计算 Insert DNA 的量, 计算方法为 Insert DNA 的使用量 (ng) = n mol 数  $\times 660 \times$  Insert DNA (bp);
- (3) 在 0.2mL PCR 管中配置下列 DNA 溶液, 总体系为 5  $\mu\text{L}$ :

pMD <sup>®</sup> 19-T vector	1 $\mu\text{L}$
Insert DNA	0.1 pmol-0.3 pmol
dH <sub>2</sub> O	up to 5 $\mu\text{L}$
- (4) 加入 5  $\mu\text{L}$  Solution I;
- (5)  $16^{\circ}\text{C}$  反应 3 h。

#### 1.2.7.5 转化

- (1) 感受态细胞放置在冰上解冻, 10  $\mu\text{L}$  连接产物全部加入 100  $\mu\text{L}$  DH5  $\alpha$  感受态细胞, 冰中放置 30 min;
- (2) 将已灭菌的 LB 固体培养基加热融化后, 待温度下降到  $40^{\circ}\text{C}$ - $50^{\circ}\text{C}$  时, 按照 1:1000 的比例加入氨苄水溶液, 摇匀, 倒入经过紫外照射 30 min 的平板中, 待其冷却即可使用;
- (3)  $42^{\circ}\text{C}$  热激 90 s 后, 冰上放置 2-3 min;
- (4) 加入 900  $\mu\text{L}$  无菌、无氨苄的 LB 液体培养基, 放入  $37^{\circ}\text{C}$  170 rpm/min 的恒温摇床, 振荡培养 60 min;
- (5) 取 100  $\mu\text{L}$  菌液均匀涂布在含有 Amp 的 LB 琼脂平板培养基上, 倒置放入  $37^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱, 培养 16 h。

### 1.2.7.6 挑克隆

- (1) 取 LB 液体培养基，按照培养基：Amp = 1000:1 比例加入相应体积的氨苄水溶液；
- (2) 取灭菌后的 15 mL EP 管，每管中加入 5 mL 的已加氨苄水溶液的 LB 液体培养基；
- (3) 每个培养皿挑取 7-8 个大而圆的单独菌落，连并挑取菌落的枪头打入 15 mL EP 管中，放入 37℃ 250 rpm/min 的恒温摇床，振荡培养 16 h。

### 1.2.7.7 菌液 PCR

- (1) 培养结束后，将菌液放置在 4℃ 冰箱中，每管取出 1 μL 菌液进行 PCR 验证；
- (2) 按照如下体系配置：

10×PCR Buffer	2.0 μL
2.5mmol/L dNTP	1.6 μL
M13 Forward Primer	0.2 μL
M13 Reverse Primer	0.2 μL
Takara Hot Start Taq	0.1 μL
DNA	1.0 μL
Water	14.9 μL
<hr/>	
Total	20 μL

- (3) PCR 反应条件

94℃	5 min	
94℃	30 s	} 40 cycles
56℃	20 s	
72℃	30 s	
72℃	5 min	
4℃	∞	

- (4) 配置 1.5% 琼脂糖凝胶，取 10 μL PCR 产物与 2 μL 6×Loading Buffer 混匀，进行琼脂糖 DNA 电泳验证。

### 1.2.7.8 质粒抽取

- (1) 选取菌液 PCR 成功的菌液，分批倒入已灭菌的 2 mL EP 管中，12,000 ×g 离心 1 min，弃尽上清；
- (2) 加入 250 μL Buffer S1 悬浮细菌沉淀，悬浮均匀，不应留有小的菌块；
- (3) 加入 250 μL Buffer S2，温和并充分地上下翻转 4-6 次混合均匀使菌体充分裂解，直至形成透亮的溶液。此步骤不宜超过 5 min；

- (4) 加 350  $\mu\text{L}$  BufferS3, 温和并充分地上下翻转 6-8 次,  $12,000\times g$  离心 10 min;
- (5) 吸取上清, 转移到 2 mL 制备管中,  $12,000\times g$  离心 1 min, 弃滤液;
- (6) 将制备管置回离心管, 加 500  $\mu\text{L}$  Buffer W1,  $12,000\times g$  离心 1 min, 弃滤液;
- (7) 将制备管置回离心管, 加 700  $\mu\text{L}$  Buffer W2,  $12,000\times g$  离心 1 min, 弃滤液;
- (8) 重复步骤 7;
- (9) 将制备管置回 2 mL 离心管,  $12,000\times g$  离心 1 min;
- (10) 将制备管置回 1.5 mL 离心管, 向制备管膜中央加 60-80  $\mu\text{L}$  Eluent 或去离子水 ( $65^{\circ}\text{C}$  预热), 室温静置 1 min,  $12,000\times g$  离心 1 min;
- (11) 重复步骤 10, 测质粒浓度, 所获质粒取 15  $\mu\text{L}$  送出测序 (由赛音生物技术 (上海) 有限公司完成), 剩余质粒冻存在  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

#### 1.2.7.9 测序结果分析

- (1) 使用 Chromas 2 软件读取测序结果, 并导出目的序列, 保存在 txt 文本中;
- (2) 使用 CpG Viewer 软件比对参考序列和目的序列。

### 1.3 结果

#### 1.3.1 URG11 在 HepG2 细胞、HL-7702 细胞和 HepG2.2.15 细胞中表达量存在明显差异

选取正常肝细胞 HL-7702 细胞 (L02)、肝癌细胞 HepG2 细胞和整合了 HBV 基因组的 HepG2.2.15 细胞, 抽取总 RNA, 经反转录 PCR 得到相应的 cDNA。以此 cDNA 为模板进行 SYBR PCR, 检测目的基因 URG11 和内参基因 GAPDH 的 mRNA 表达水平。如图 1.1 所示, URG11 在 HepG2.2.15 细胞中的表达量显著高于 HepG2 细胞和 HL-7702 细胞, 升高倍数依次是  $47.2 \pm 6.0$  倍 ( $P < 0.001$ ) 和  $24.6 \pm 6.0$  倍 ( $P < 0.001$ ); 而 URG11 的表达量在 HL-7702 细胞和 HepG2 细胞中无明显差异 ( $P = 0.758$ )。

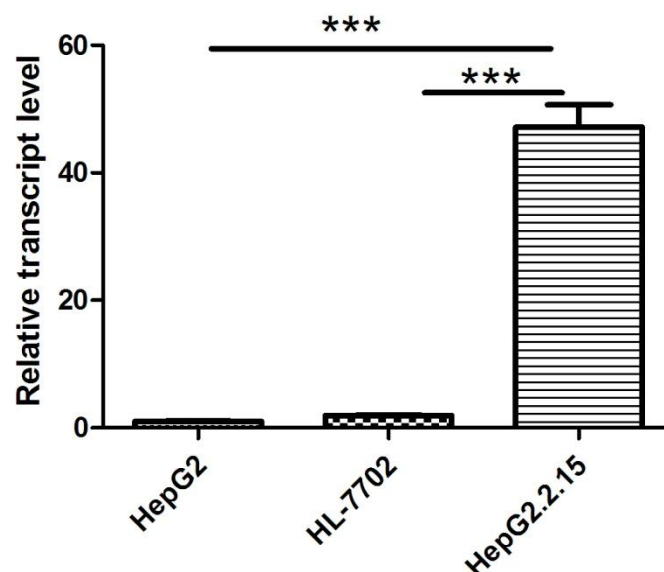


图 1.1 不同细胞系中 URG11 的表达水平。

URG11mRNA 的表达水平设为 1。柱状图代表三次重复实验的平均值  $\pm$  SD;

\*\*\*,  $P < 0.001$ 。

### 1.3.2 三者细胞 URG11 启动子的甲基化状态存在明显差异

提取上述三种细胞的 DNA，硫化测序 PCR (BSP) 检测各细胞系中 URG11 启动子区 CpG 岛的甲基化状态并计算相应的甲基化率。如图 1.2 所示，BSP 的结果表现出与定量结果一致的趋势。HepG2.2.15 细胞中 URG11 启动子区 CpG 岛的甲基化率(37.5%)明显低于 HepG2 细胞( $P = 0.008$ )和 L02 细胞( $P = 0.029$ ); HepG2 URG11 甲基化率为 93.7%，高于 L02 细胞 (78.3%)，但统计结果显示两者之间不存在明显差异 ( $P = 0.359$ )。这表明 URG11 在不同细胞中的表达水平与自身启动子区的甲基化状态呈正相关关系。

A GGGGCAAAGATCAGGGACCCCTGGGGGCGGGGTTTCGCCCTCGGCCCACA  
 CCCCCTGCCCCCGGTTTGGGAGTCCGCTTCCTGCGAAGCGCTGACTGAAGG  
 CGTCAGACCGAGGCCCGGGAGGAAACAGACTTCGGGAACAAGGCTAGC  
 ACCAGAGGCTGCGCGCCCGGGGCATGGCCCCTGTGGTGTTGGGACCCGAGAC  
 GCCTTGTTGTGACGAGGTGGGAACCGTGGAAATTGAACCCACGACGCCA  
 GGTGCGCTGTGCCGCTGAGCAGTTCTAGGCCTGCCCCAGCCTGCCAGAAG  
 GTCT

图 1.2 三种细胞株中 URG11 启动子的甲基化差异

(A) URG11 启动子目的序列，黄色标注的部分为该序列中的 CpG 位点。

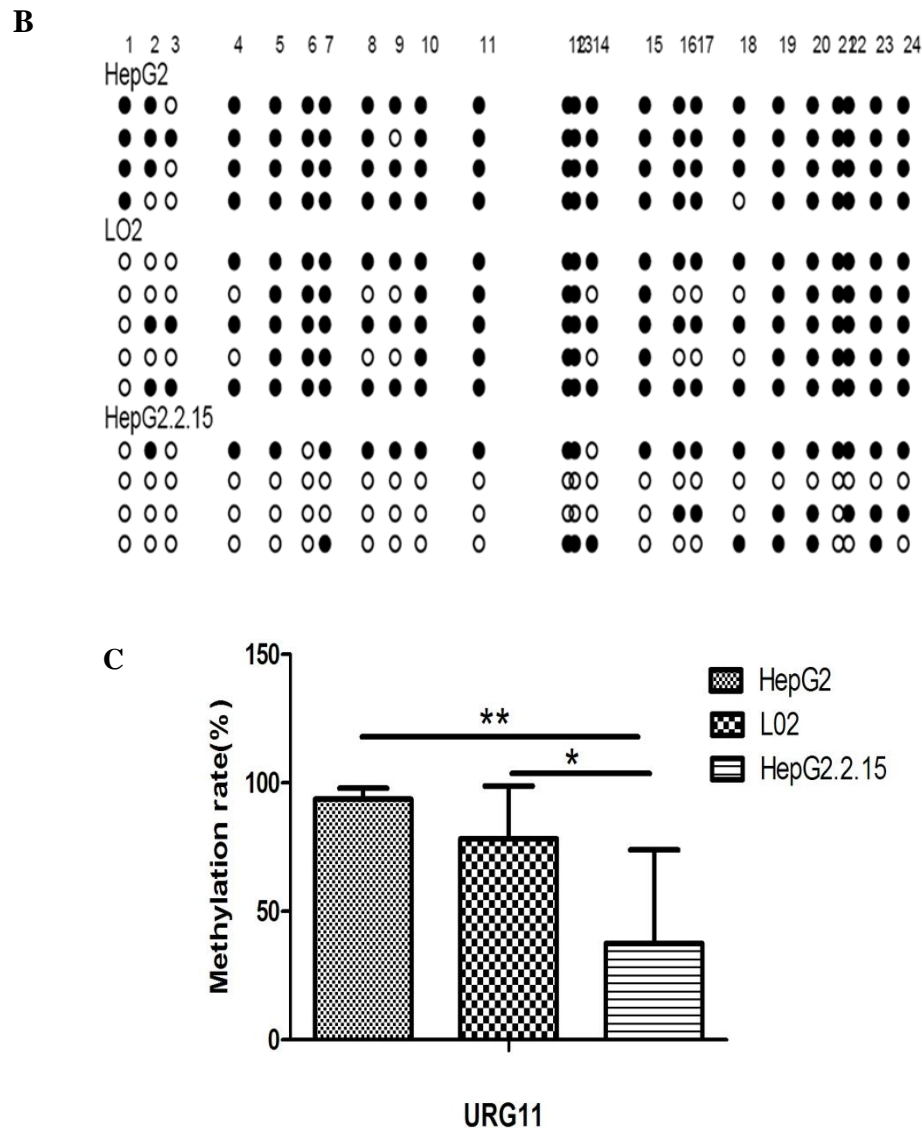


图 1.2 三种细胞株中 URG11 启动子的甲基化差异

(B) BSP 法检测三种细胞株中 URG11 启动子 CpG 岛的甲基化水平；(C) 计算三种细胞中 URG11 启动子 CpG 岛的甲基化率。柱状图代表三次重复实验的平均值  $\pm$  SD。\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ 。

### 1.4 讨论

尽管目前已报道多种因子涉及 HBV 诱发的肝癌病理现象中，但是慢性乙型肝炎诱导肝癌的精确的分子机制仍未明确。URG11 是一种可被 HBx 上调表达的癌基因，在肝炎恶性转化过程中起重要的促癌作用。我们发现 URG11 的表达量在 L02 细胞、HepG2.2.15 细胞和 HepG2 细胞中存在显著差异，且这种差异与其自身启动子 CpG 岛的甲基化程度成正相关关系，表明这种基因的差异表达很可能是通过启动子甲基化状态的改变实现的。

当 HBV 感染肝细胞后, HBx 过量表达, 极大促进了癌基因 URG11 的表达。URG11 在正常肝细胞和肝癌细胞中启动子 CpG 岛的甲基化程度高, 而在 HBV 存在时, URG11 启动子的甲基化状态发生了显著的变化, 其启动子 CpG 岛处于低甲基化状态, 表达量也发生了显著上升。这提示我们, URG11 启动子在 HBV 感染后很可能经历了去甲基化过程。目前研究表明, 表观遗传修饰是 HBx 蛋白诱导细胞恶性转化的一种重要调控方式。乙肝病毒 X 蛋白 (HBx) 可通过影响靶基因的表观遗传修饰调控靶基因的表达, 即诱导癌基因的启动子去甲基化和肿瘤抑制因子高甲基化。这提示我们, HBx 可通过影响 URG11 启动子发生去甲基化调控其表达水平。因此, 我们下一章探究参与去甲基化过程的分子是否在 HBx 调控 URG11 的分子过程中起作用。

## 1.5 小结

本章利用实时荧光定量 PCR 和硫化测序 PCR 研究了 URG11 在不同细胞系中转录水平和启动子 CpG 岛的甲基化水平是否存在相关性, 为研究 HBx 蛋白与 URG11 甲基化修饰的关联提供了分子生物学功能的依据。

我们发现:

1. URG11 在表达 HBV 的 HepG2.2.15 细胞中的转录水平明显高于 HL-7702 细胞和 HepG2 细胞, 甲基化的 CpG 位点数也少于其他两种细胞;
2. URG11 的转录水平在 L02 细胞和 HepG2 细胞中无明显差异, 其启动子 CpG 甲基化水平也无明显差异。

以上结果表明 URG11 的转录水平与自身启动子 CpG 岛的甲基化状态呈正相关关系, HBx 可能通过甲基化修饰影响 URG11 的转录水平。

## 第 2 章

### TET1 介导 HBx 上调 URG11

HBx 可通过影响靶基因的表现遗传修饰如甲基化调控靶基因的表达。上章实验结果表明, URG11 的表达差异与其自身启动子甲基化状态呈正相关关系。目前研究表明, 由 TET 家族催化的羟甲基化参与去甲基化过程。其中, TET1 在 5-mC 转化为 5-hmC 过程中起到重要作用。另外文献提示 URG11 可能是 TET1 的靶基因, 因此, 我们运用 siRNA 转染和羟甲基化 DNA 免疫共沉淀探究 TET1 是否参与 HBx 上调 URG11 表达过程。

#### 2.1 材料

##### 2.1.1 细胞株

HepG2 细胞和 HepG2.2.15 细胞为本实验室所冻存细胞株。HBx 稳转肝癌株 SMMC-7721PBX 和对照 SMMC-7721PB 细胞株由上海东方肝胆外科研究所赠送。

##### 2.1.2 试剂

DMEM basic (1×): Dulbecco's Modified Eagle Medium with high glucose (Gibco);

FBS: Fetal Bovine Serum (Gibco);

400mL 10×PBS (上海双螺旋科技有限公司);

0.25 % Trypsin-EDTA (Gibco);

TRIzol (Invitrogen);

Opti-MEM<sup>®</sup> I Reduced Serum Medium (Gibco)

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems);

QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen);

QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen);

MethylFlash<sup>™</sup> Hydroxymethylated DNA Quantification Kit (Colorimetric, Epigentec);

Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Reagent (Invitrogen);

DEPC 水 (生物生工公司);

对照 siRNA (吉玛公司);

HBx siRNA (吉玛公司);

TET1 siRNA (吉玛公司);

siRNA 溶液：对于 Negative control，每一管中加入 62.5  $\mu\text{L}$  DEPC 水配制成 20  $\mu\text{M}$  溶液，其他 siRNA 每一管中加入 125  $\mu\text{L}$  DEPC 水配制成 20  $\mu\text{M}$  溶液， $-20^{\circ}\text{C}$  保存 6 个月。

### 2.1.3 siRNA 序列

siRNA	正向序列 (5' to 3')	反向序列 (5' to 3')
<b>GAPDH Positive control</b>	GUAUGACAACAGCCUCAAGTT	CUUGAGGCUGUUGUCAUACTT
<b>Negative control</b>	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
<b>TET1 siRNA-1</b>	GCCCACAGUUGUAAGUUAUTT	AUAACUUACAACUGUGGGCTT
<b>TET1 siRNA-2</b>	CCCACCUC CAGUCUUAUATT	UAUUAAGACUGGAGGUGGGTT
<b>HBx siRNA-1</b>	GGAGGCUGUAGGCAUAAAUTT	AUUUAUGCCUACAGCCUCCTT
<b>HBx siRNA-2</b>	GGGAGGAGAUUAGGUUAAATT	UUUAACCUAUUCUCCUCCTT

### 2.1.4 定量引物序列

引物名称	正向序列 (5' to 3')	反向序列 (5' to 3')
<b>HBx</b>	TTGCCCAAGGTCTTACA	CAACTCCTCCCAGTCTTTA
<b>TET1</b>	TAATGGAAGCACTGTGGTTTGT	GCCCCAGATTTGATCTTGGC

### 2.1.5 羟甲基化定量引物序列

引物名称	正向序列 (5' to 3')	反向序列 (5' to 3')
<b>URG11-5hmC1</b>	AGGAAACAGACTTCGGGAACAA	TTTCCACGGTTCCACCTC
<b>URG11-5hmC2</b>	AGGAAACAGACTTCGGGAACAA	AGAAGTCTCAGCGGCACA

### 2.1.6 仪器

生物安全柜 (Heal Force) ;  
SDJ-ZS 双人超净工作台 (上海淀山湖净化设备厂) ;  
MCO-18AIC CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (日本三洋公司) ;  
DM1L 倒置显微镜 (德国 Leica 公司) ;  
细胞计数仪 (Biorad) ;  
HWS12 恒温水浴锅 (上海一恒科技有限公司) ;  
Centrifuge 5415 R (Eppendorf) ;  
Centrifuge 5418 (Eppendorf) ;  
Prism 7900 Detector System (Applied Biosystems) ;  
UCD300—Bioruptor Next Generation System (Diagenode) ;



Veriti 96 well thermo cycler (Applied Biosystems) ;  
C723 ND-1000 UV/Vis 分光光度仪 (美国 NanoDrop 公司) ;  
智能型电热恒温鼓风干燥箱 (上海琅轩实验设备有限公司) ;  
QT-2 旋涡混合器 (上海琪特分析仪器有限公司) ;  
QB-208 多用途旋转摇床 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司) ;  
自动压力灭菌锅 (天津市超拓公司) 。

### 2.1.7 生物学软件

Primer Premier 5.0 引物设计软件;  
Tocan 成像软件;  
SDS 2.3 RT -PCR 分析软件 (Applied Biosystems) ;  
SPSS 20.0 统计软件;  
GraphPad Prism 5 作图软件。

## 2.2 方法

### 2.2.1 肝癌细胞系的传代培养

HepG2 细胞、HepG2.2.15 细胞、SMMC-7721PBX 细胞、SMMC-7721PB 细胞按照 1.5.1 的实验方法进行培养。

### 2.2.2 细胞种板

- (1) 将细胞从培养箱中取出, 后续步骤均在超净台中进行;
- (2) 按照 1.2.1 实验方法所述, 将 HepG2 细胞或其他细胞消化完毕后, 取少许细胞液加到细胞计数板的计数槽中, 将细胞计数板插入细胞计数器, 读取结果;
- (3) 取 12 孔板, 按照每孔接种  $1 \times 10^5$  个细胞计算需要加入的细胞液体积, 并每孔加入 1 mL 培养基;
- (4) 将细胞板前后左右摇动, 确保细胞均匀生长, 放入细胞培养箱中培养。

### 2.2.3 HepG2 细胞的 HBx-pcDNA3 质粒转染

- (1) 待细胞板中的细胞密度在 70% - 90% 之间时, 即可进行脂质体转染;
- (2) 根据 Lipofectamine 2000 Reagent 说明书, 按照每孔 1  $\mu$ g 质粒和 1  $\mu$ L Lipofectamine2000 (lipo2000) 计算所需的质粒和 lipo2000 的体积;
- (3) 使用 Opti-MEM 无血清培养基稀释 lipo2000 转染试剂、HBx-pcDNA3 质粒和空质粒 pcDNA3, 分别将稀释后的 lipo2000 等体积地与稀释后的两种质粒混合, 室温下放置 5min;

- (4) 吸掉细胞板中的培养基, 每孔加入 900  $\mu\text{L}$  含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基;
- (5) 放置 5 min 后, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  的 DNA-lipo2000 的混合液, 混匀后, 放置在细胞培养箱中继续培养, 24 h 后收样。

#### 2.2.4 HepG2.2.15 细胞、SMMC-7721PBX 细胞 siRNA 转染

- (1) 按照每孔细胞数为  $0.5 \times 10^5$  个细胞, 将细胞接种在 24 孔板, 待细胞板中的细胞密度在 70%-90%之间时, 即可进行 siRNA 转染;
- (2) 将冻存在 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱的 siRNA 溶液解冻, 根据 lipo2000 的说明书, 按照每孔 15 pmol siRNA 和 1.5  $\mu\text{L}$  lipo2000 计算所需的 siRNA 和 lipo2000 的总量;
- (3) 使用 Opti-MEM 无血清培养基稀释 lipo2000 转染试剂、HBx/TET1 siRNA、和 Negative control siRNA, 分别将稀释后的 lipo2000 等体积地与稀释后的 siRNA 混合, 室温下放置 5 min;
- (4) 吸掉细胞板中的培养基, 每孔加入 450  $\mu\text{L}$  含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基;
- (5) 放置 5 min 后, 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  的 siRNA-lipo2000 的混合液, 混匀后, 放置在细胞培养箱中继续培养, 24 小时后收样。

#### 2.2.5 细胞总 RNA 提取以及浓度测定

如 1.2.2 和 1.2.3 所述的步骤进行 细胞总 RNA 提取。

#### 2.2.6 逆转录 PCR

使用 500 ng RNA 进行逆转录 PCR, 过程如 1.2.4 所述。

#### 2.2.7 荧光实时定量 PCR

如 1.2.5 所述步骤进行。

#### 2.2.8 DNA 超声破碎

- (1) 使用总量 1  $\mu\text{g}$  的 DNA, 使用超纯水稀释至 100  $\mu\text{L}$ , 浓度为 10 ng/ $\mu\text{L}$ ;
- (2) 将稀释后的 DNA 样品涡旋振荡 10-15 s, 快速离心, 放置在冰上 10-15 min;
- (3) 将水倒入水槽(自来水即可), 加入碎冰, 使其达到要求的 water level (冰不宜太多, 否则影响超声效果);
- (4) 打开电源, 设置超声强度 (2 level)、cycle number (25 cycles)、超声时间 (12 s) 和间隔时间 (30 s);

- (5) 将带有 DNA 样品的 1.5 mL Ep 管放到 tube holder 上, 要配平 (对称放置即可), 放入到水槽中;
- (6) 按压 Start 按钮, 开始运行 cycle 之后, 按 Stop 键, 检查 Ep 管的温度, 及时加冰;
- (7) 使用完毕, 将水吸出, 用抹布抹干, 关掉电源, 即可;
- (8) 配置浓度为 1% 的琼脂糖电泳胶, DNA 电泳验证 DNA 破碎片段长度是否在 200-1000 bp 之间。

### 2.2.9 羟甲基化 DNA 免疫共沉淀

原理: 在 hMeDIP 免疫沉淀过程中, 5-hmC 富集在微孔板里的 DNA 片断, 在最佳反应条件下进行处理。免疫沉淀的羟甲基化的 DNA 然后被清洗, 释放和洗提。洗提的 DNA 能用于多种下游应用, 包括: PCR (hMeDIP-PCR), 微阵列(hMeDIP-ChIP) 、qPCR 等, 以研究细胞或者组织中特异的羟甲基化基因。

- (1) 将 10 mL WB 溶液加入到 90 mL 超纯水配置成 1×WB 溶液, 4℃保存;
- (2) 确定所需的样品孔数, 将所需的样品孔放置于样品板上;
- (3) 每孔中加入 100  $\mu$ L AB 溶剂, 每 1  $\mu$ L Non-immune IgG 加入到阴性对照孔中, 每 1  $\mu$ L 5-hmC Antibody 加入到样品孔中和阳性对照中;
- (4) 用封口膜 M 封紧样品孔, 室温孵育 60 min;
- (5) 吸出样品孔中 AB 溶液后, 每孔用 200  $\mu$ L 1×WB 溶液清洗 2 次;
- (6) 将 1  $\mu$ L 对照 DNA 加入到 9  $\mu$ L HS hMeDIP 溶液中从而稀释浓度至 50 ng/mL, DNA 样品同样用 HS hMeDIP 溶液稀释至 10  $\mu$ g/mL;

Reagent	Sample Well	Positive Control Well	Negative Control Well For Sample	Negative Control Well For Control DNA
HS Solution	50 $\mu$ L	99 $\mu$ L	50 $\mu$ L	99 $\mu$ L
Sample DNA	50 $\mu$ L	N/A	50 $\mu$ L	N/A
Control DNA	0 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0 $\mu$ L	1 $\mu$ L

- (7) 封口膜 M 封紧样品板并放置于定轨摇床上, 50-100 rpm/min, 室温孵育 90 min;
- (8) 小心吸出样品孔中的溶液, 每孔用 200  $\mu$ L 1×WB 溶液清洗 5 次;
- (9) 每孔用 200  $\mu$ L 1 DRB 试剂清洗 1 次;
- (10) 准备 DRB-PK 试剂, 每 39  $\mu$ LDRB 加入 1  $\mu$ L 蛋白酶 K;

- (11) 每孔加入 40  $\mu\text{L}$  DRB-PK 溶液，将样品孔放置于  $65^{\circ}\text{C}$  20 min 后迅速转移样品孔中的 DNA 溶液至 0.2 mL PCR 试管中；
- (12) 将带有 DNA 溶液的 0.2 mL PCR 试管放置在 PCR 仪中， $95^{\circ}\text{C}$  反应 3 min；
- (13) 取出 PCR 试管，所获取的 DNA 可用于 qPCR，冻存于  $-20^{\circ}\text{C}$ 。

## 2.3 结果

### 2.3.1 TET1 mRNA 和 URG11 启动子 5-hmC 水平在 HepG2 细胞和 HepG2.2.15 细胞中存在差异

培养 HepG2 细胞和 HepG2.2.15 细胞，提取 DNA 和总 RNA，经 qPCR 和羟甲基化 DNA 免疫共沉淀技术检测 TET1 在两者细胞中的表达是否与 URG11 的表达趋势一致。如图 2.1 所示，与 HepG2 细胞相比，TET1 在 HepG2.2.15 细胞中的表达量显著升高，升高倍数为  $31.5 \pm 0.6$  ( $P < 0.001$ )。如图 2.2 显示，我们发现 URG11 启动子 5-hmC 水平与 TET1 的表达水平呈现一致性。

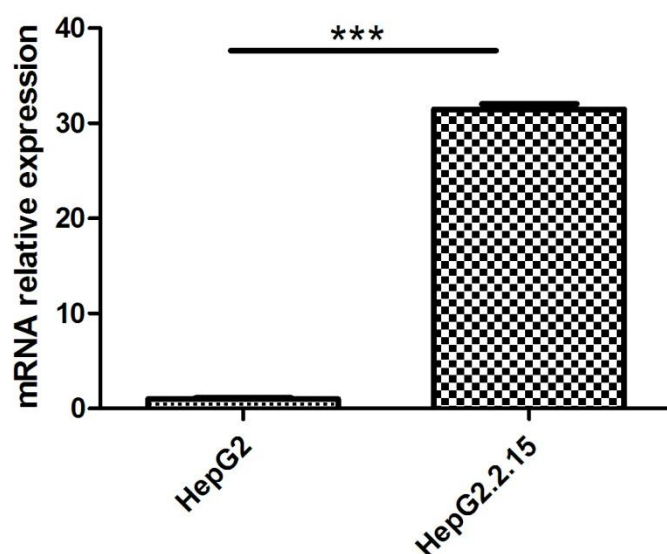


图 2.1 HepG2 和 HepG2.2.15 细胞系中的 TET1 转录水平差异  
TET1 在 HepG2 细胞中的 mRNA 水平设为 1。柱状图代表三次重复实验的平均值  $\pm$  SD。\*\*\*,  $P < 0.001$ 。

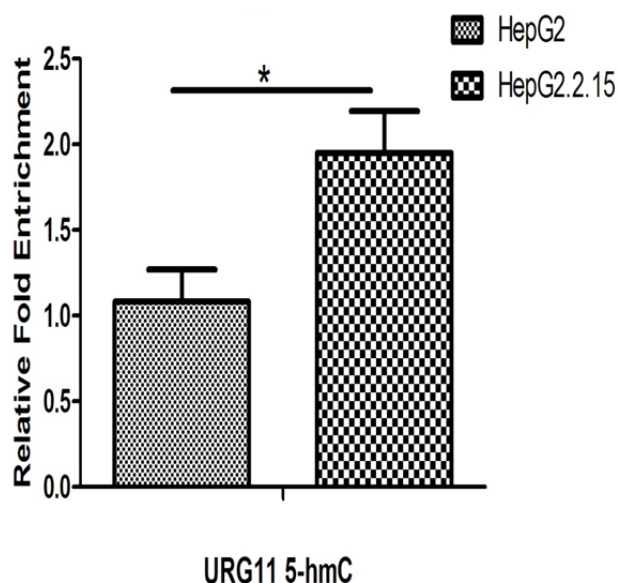


图 2.2 HepG2.2.15 细胞的 URG11 5-hmC 水平较 HepG2 细胞明显上升  
URG11 5-hmC 在 HepG2 细胞中的水平设为 1。

柱状图代表三次重复实验的平均值  $\pm$  SD。\*,  $P < 0.05$ 。

### 2.3.2 TET1 介导 HBX 上调 URG11 的分子过程

为验证 TET1 是否参与 HBx 调控 URG11 的分子过程,我们使用 TET1 siRNA 转染 HepG2.2.15 细胞,结合实时荧光定量 PCR (qPCR) 和羟甲基化 DNA 免疫共沉淀 (hMeDIP) 技术检测 TET1si 干扰后的 URG11 转录水平以及 URG11 启动子区 5-hmC 水平。

qPCR 和 hMeDIP 分析结果 (图 2.3) 显示,与阴性对照组 NC-HepG2.2.15 相比,当 TET1 干扰下调表达 47.6% 时,URG11 的 mRNA 水平也随之下调 30.3%, URG11 5-hmC 水平下调 22.1%,提示 TET1 是 HBx 上调 URG11 分子过程中的重要调节分子。

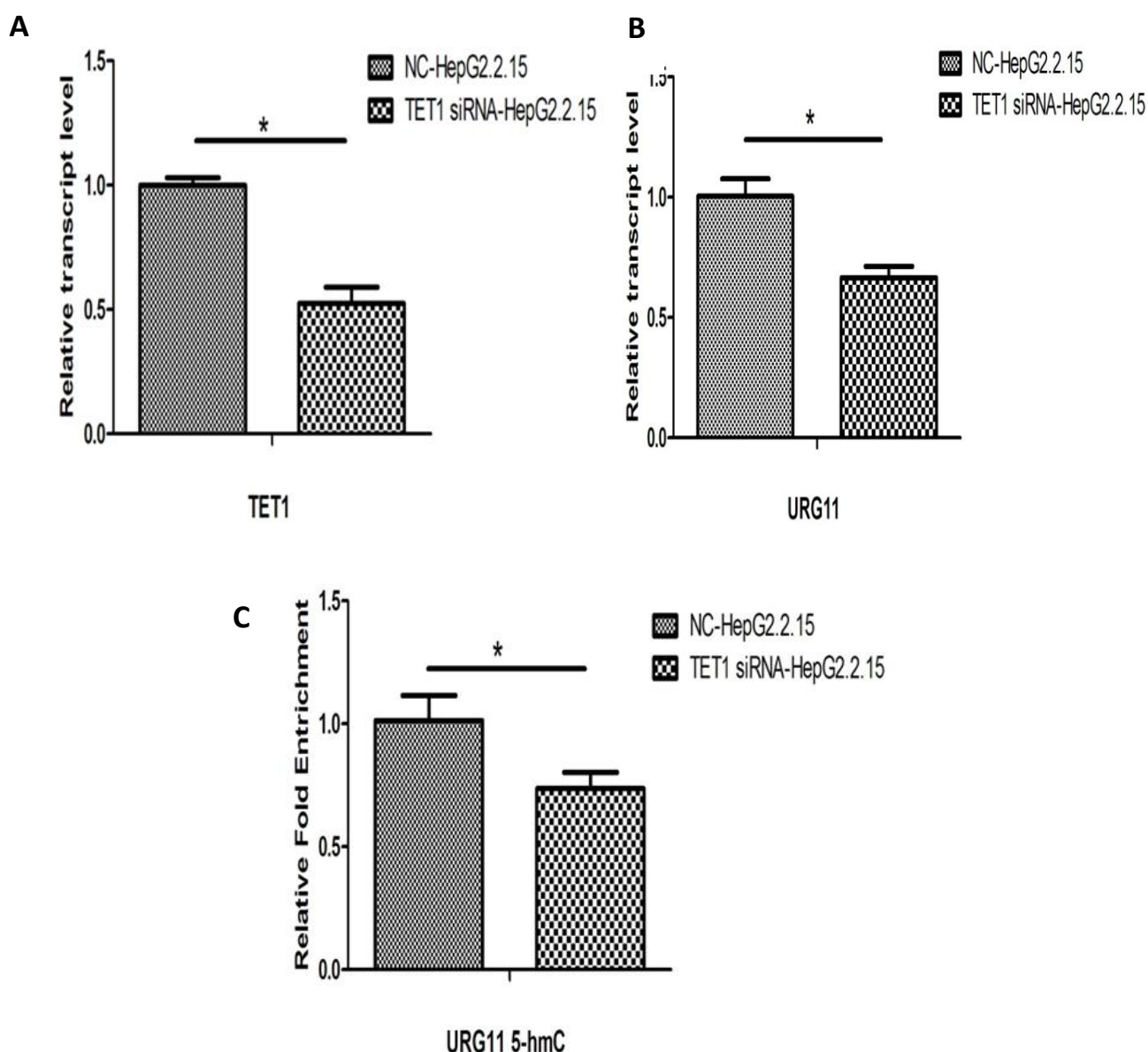


图 2.3 TET1 siRNA 转染 HepG2.2.15 细胞检测

(A) TET1 干扰后的 mRNA 水平； (B) TET1 干扰后 URG11 mRNA 水平；  
(C) TET1 干扰后 URG11 5-hmC 水平。

URG11 5-hmC 在对照组中的水平设为 1。柱状图代表三次重复实验的平均值  $\pm$  SD。\*,  $P < 0.05$ 。

### 2.3.3 HBx 通过上调 TET1 的表达促进 URG11 的转录

为进一步探究 TET1 是否受 HBx 调控, HBx 表达载体 HBx-pcDNA3 质粒和空载体 pcDNA3 转染 HepG2 细胞 24 小时后收样, 提取 DNA 和总 RNA, 采用 qPCR 和 hMeDIP 检测 TET1、URG11 和 URG11 5-hmC 的表达变化。如图 2.4 所示, 当 HBx 过表达时, TET1 mRNA 表达上升  $2 \pm 0.3$  倍 ( $P = 0.019$ ), URG11

表达上调  $1.7 \pm 0.3$  倍 ( $P = 0.011$ )，URG11 5-hmC 水平随之上调 23.6% ( $P = 0.021$ )。

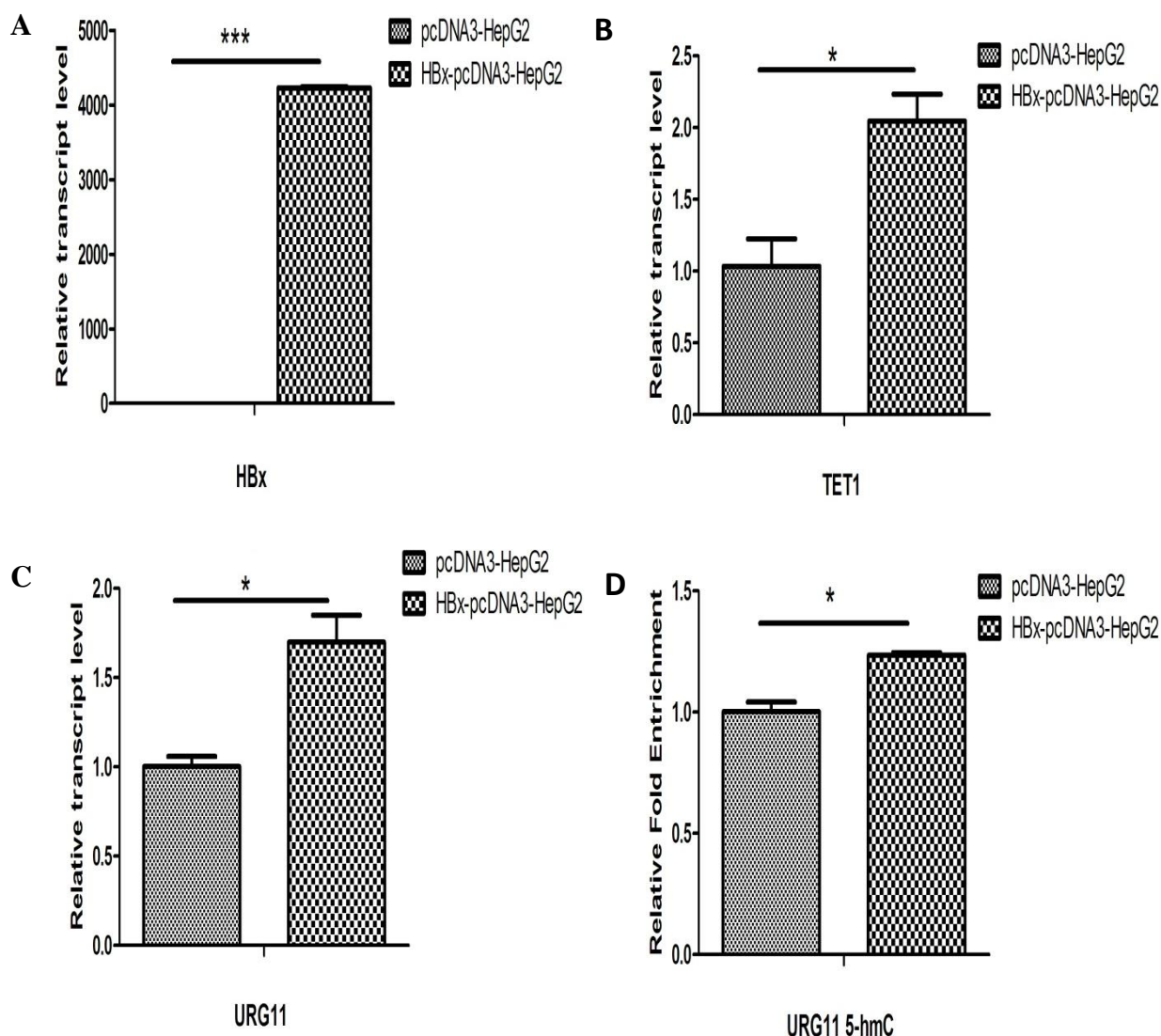


图 2.4 HBx-pcDNA3 质粒瞬转 HepG2 细胞

(A) HBx 过表达检测； (B) 瞬转后 TET1 mRNA 水平升高； (C) 瞬转后 URG11 表达上调； (D) 瞬转后 URG11 5-hmC 上升。

HBx、TET1、URG11 和 URG11 5-hmC 在对照组中的水平设为 1。柱状图代表三次重复实验的平均值  $\pm$  SD。\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ 。

选取另外一株 HBx 稳转肝癌细胞株 SMMC-7721PBX 细胞和对照株 SMMC-7721PB，提取总 RNA 并反转录，qPCR 进行转录水平检测。如图 2.5 所示，SMMC-7721PBX 中 TET1 和 URG11 的表达水平均上升，分别上调了 42.5%



和 190.3%，URG11 5-hmC 水平也上升了 26.9% ( $P = 0.037$ )，说明 HBx 可促进 TET1 的表达上调。

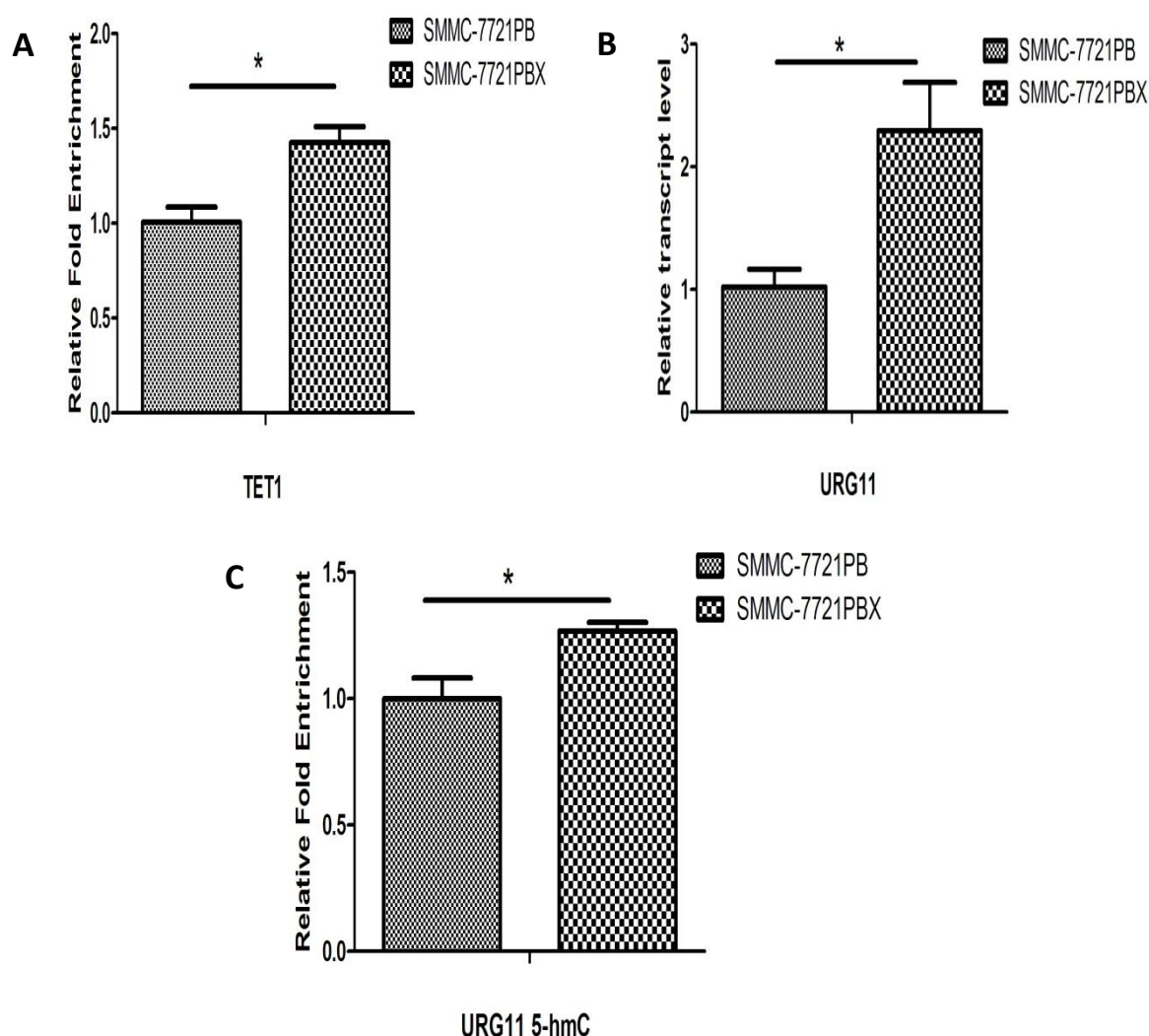


图 2.5 TET1、URG11 mRNA 水平以及 URG11 羟甲基化水平在 SMMC-7721PBX 和 7721PB 细胞中存在差异

(A) 两种细胞 TET1 mRNA 表达差异； (B) 两种细胞 URG11 mRNA 表达差异； (C) 两种细胞 URG11 启动子 5-hmC 水平差异。

TET1、URG11 和 URG11 5-hmC 在 SMMC-7721PB 对照株中的表达水平设为 1。柱状图代表三次重复实验的平均值  $\pm$  SD。\*,  $P < 0.05$ 。

当 HBx siRNA 转染 HepG2.2.15 细胞，HBx 下调表达 63.8% (图 2.6 A) 时，TET1 和 URG11 表达随之降低，分别下调 54.8% (图 2.6 B) 和 24.5% (图 2.6 C)；URG11 5-hmC 水平下调 26.0% (图 2.6 D)，同样表明 HBx 是通过促进 TET1 的表达上调 URG11 的转录水平。



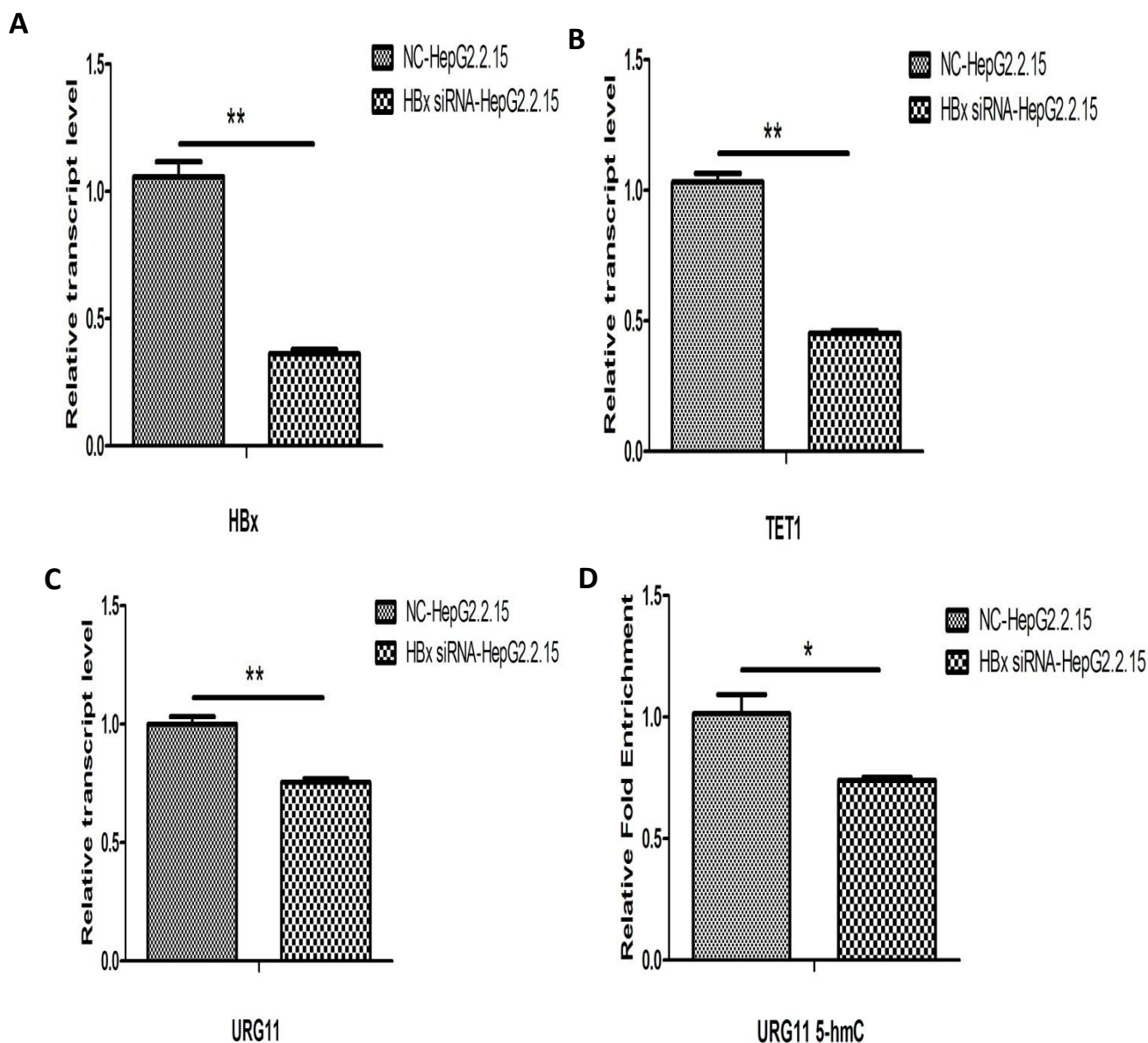


图 2.6 HBx siRNA 转染 HepG2.2.15 细胞

(A) HBx 表达干扰效率； (B) HBx 干扰后 TET1 的表达变化； (C) HBx 干扰后 URG11 的表达变化； (D) HBx 干扰后 URG11 5-hmC 变化。

NC-HepG2.2.15 细胞中的表达设为 1。柱状图代表三次重复实验的平均值  $\pm$  SD。

\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ 。

同样的实验结果在 HBx siRNA 转染 SMMC-7721PBX 细胞实验 (图 2.7) 中得到验证。当 HBx 表达下调 43.9% 时, TET1 和 URG11 mRNA 水平分别下调表达 31.3% 和 23.3%, URG11 启动子区 5-hmC 水平也下调 26.0%, 表明 HBx 调控 TET1 的表达, 进而下调 URG11 5-hmC 水平。

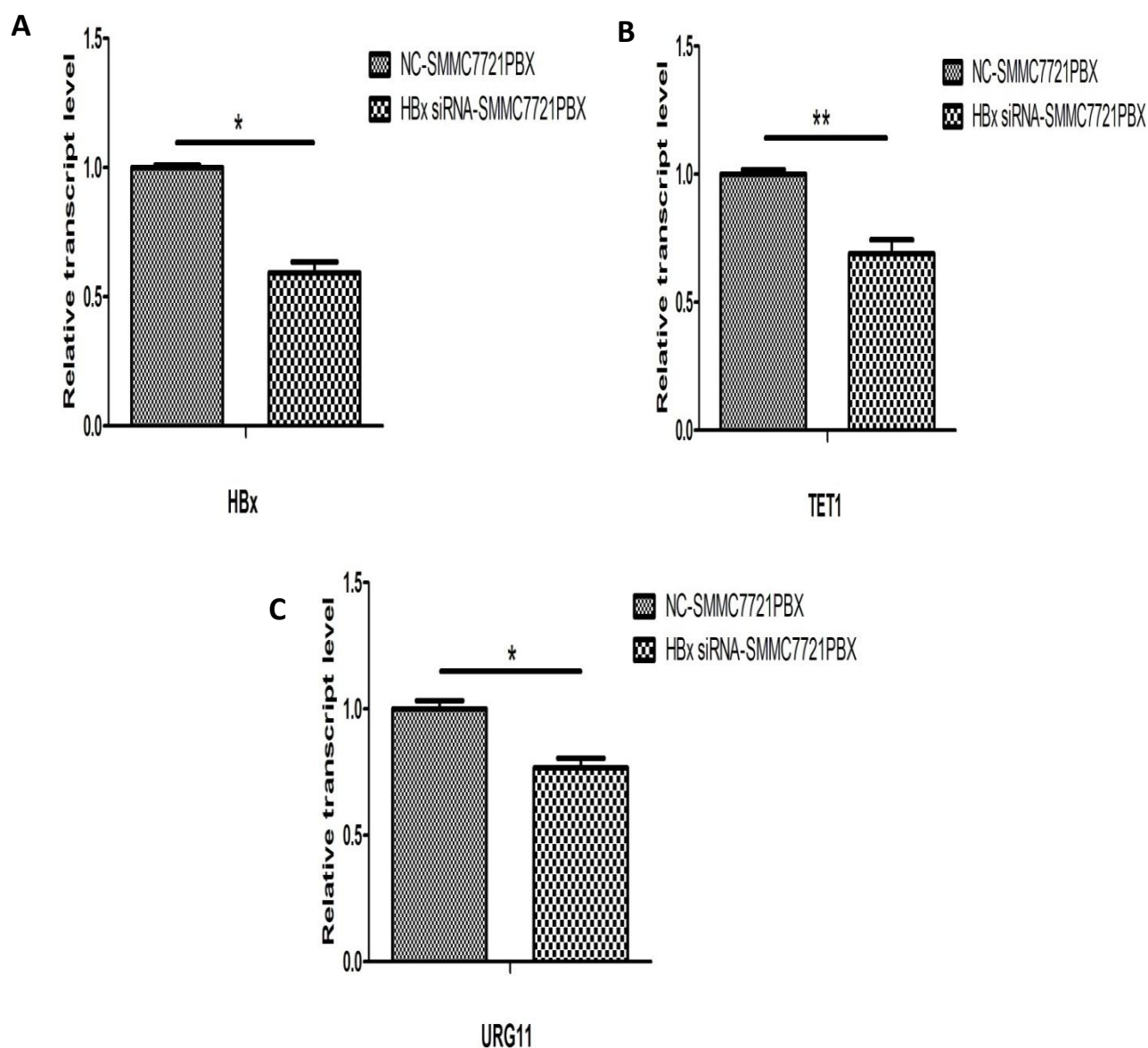


图 2.7 HBx siRNA 转染 SMMC-7721PBX 细胞 mRNA 和 5-hmC 检测  
(A) HBx 表达干扰效率； (B) HBx 干扰后 TET1 的表达变化； (C) HBx 干扰后 URG11 的表达变化。

HBx/TET1/URG11 mRNA 和 URG11 5-hmC 在对照组中的水平设为 1。柱状图代表三次重复实验的平均值  $\pm$  SD。\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ 。

## 2.4 讨论

在 HepG2.2.15 细胞和 HepG2 细胞中,我们发现 TET1 和 URG11 以及 URG11 启动子区羟甲基化水平呈现一致性,提示 HBx、TET1 和 URG11 之间可能存在着内在联系。目前关于 TET1 的报道主要集中于 TET1 在胚胎干细胞分化和发育过程中的生物学功能研究,但在肝癌发生发展中的生物功能研究较少。与正常肝

组织相比，肝癌组织中 TET1 和 5-hmC 表达水平下调，而 TET 家族其他两个成员——TET2 和 TET3 表达无明显差异，表明 5-hmC 水平降低、TET1 表达下调与肝癌的发生发展有关<sup>[47]</sup>。然而，迄今为止，尚未有文献证实 TET1 和 5-hmC 在 HBV 诱导的肝癌发生发展过程中是否发挥生物功能。

我们发现 TET1 干扰下调可下调 URG11 mRNA 和 URG11 启动子 5-hmC 水平，表明 TET1 能够调控癌基因 URG11 的表达，具有促进细胞恶性转化的功能。这表明，HBx 上调 TET1 表达很可能在炎症向癌症恶性转化过程中起着重要的生物学作用。现有研究结果显示 TET1 在肿瘤中的作用似乎具有双重作用。如 TET1 在混合谱系白血病基因（MLL）重排的白血病中起到癌基因作用。TET1 与 MLL 融合蛋白共同调控它们共同的关键靶基因，包括 Hoxa, Meis1 和 Pbx3，促进 MLL 重排白血病的发展<sup>[48]</sup>；小鼠成纤维细胞（NIH3T3）研究发现，Tet1 的敲除能够阻止 cyclin D1 在 G1 期的积聚，抑制 Rb 磷酸化，延长 G1 期向 S 期过渡，证实 Tet1 通过介导 Rb 信号通路为细胞增殖所必需，起到促癌作用<sup>[49]</sup>。然而，另有研究发现在前列腺癌和乳腺癌中 TET1 的高表达可抑制细胞侵袭，抑制组织抑制因子金属蛋白酶甲基化并维持它们的表达，从而抑制肿瘤发展和侵袭<sup>[50]</sup>，起到肿瘤抑制因子的作用。

现有 CHIP-seq 数据显示，TET1 的靶基因大多参与细胞基础的生物活动，因此 TET1 的异常表达能够引起细胞内某些重要生物过程的紊乱<sup>[45]</sup>。除能诱导癌基因发生去甲基化，TET1 还能通过促进细胞发生纤维化或者与肿瘤预后密切关联。Fatao Liu 等人的研究显示，在 A549 细胞（人肺腺癌细胞）发生 TGF- $\beta$  诱导的上皮间质转化（EMT）后，TET1 表达显著上调<sup>[51]</sup>，提示我们 TET1 还可能在细胞纤维化演变过程中起到重要作用。Yang Q 等人发现，与癌旁组织相比，胃癌组织中 TET1 的转录水平和蛋白水平均发生明显下降，并与胃癌患者的一些临床病理指标（年龄、性别、肿瘤定位、肠道组织学类型、浸润深度、淋巴结转移等）相关；降低的 5-hmC 水平认为是胃癌患者不良预后的分子指标<sup>[52]</sup>。

TET1 与癌症的研究现已主要关注在癌旁组织和癌症组织的 TET1 和 5-hmC 的差异，然而忽略了 TET1 在炎症阶段和癌症阶段中的表达水平变化。因此，本实验下章重点在于探究 HBV 是如何调控 TET1，为后续探讨其在炎症向癌症转化过程中的作用和功能，为治疗和预防炎症癌转变发现新的有效分子靶标。

## 2.5 小结

本章用小干扰 RNA（siRNA）和 HBx 表达载体瞬转肝癌细胞的方法，通过实时荧光定量 PCR 和羟甲基化 DNA 免疫共沉淀检测，初步确认了 TET1 介导了 HBx 上调 URG11 的分子过程。

我们发现：

3. 与 HepG2 细胞相比，HepG2.2.15 细胞中 TET1 的表达量显著升高，对应的 URG11 启动子 5-hmC 水平也上升；
4. TET1 可调节 URG11 5-hmC 水平：在 HBx 存在的情况下，TET1 的表达受干扰会下调 URG11 mRNA 和 5-hmC 水平；
5. HBx 可调控 TET1 的表达：当 HBx 过表达时，TET1、URG11 及 URG11 5-hmC 表达量均升高；当 HBx 表达受干扰时，TET1、URG11 及 URG11 5-hmC 表达量也发生明显降低。

## 第 3 章

### HBx 调控 TET1 的分子机制

现有研究表明, 在乳腺癌中 TET1 受甲基化调控。为探究 TET1 是否在肝癌中同样受甲基化调控及 HBx 蛋白是否通过影响 TET1 甲基化上调其表达, 我们对 HepG2 细胞进行去甲基化处理检测其 mRNA 和甲基化水平, 并检测 HBx 稳转株 TET1 启动子甲基化状态。此外, 为探究 TET1 是否可能是 HBx 直接的靶基因, 结合 HEK293T 细胞不表达 TET1 的特性, 我们构建 TET1 启动子荧光载体并转染 HEK293T 细胞, 用于检测 HBx 过表达能否激活 TET1 启动子活性。

#### 3.1 材料

##### 3.1.1 细胞系

HEK293T 细胞为现代人类学重点实验室赠送, 其他细胞株如 2.1.1 所述。

##### 3.1.2 试剂

DMEM basic (1×): Dulbecco's Modified Eagle Medium with high glucose (Gibco);

FCS: Fetal Calf Serum (Gibco);

400mL 10×PBS (上海双螺旋科技有限公司);

0.25% Trypsin-EDTA (Gibco);

TRIzol (Invitrogen);

5-Aza (Sigma);

Trichostatin A (TSA, Sigma);

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems);

QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen);

QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen);

EpiTect<sup>®</sup> Fast Bisulfite Conversion (Qiagen);

PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara);

双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Promega);

Hind III (Takara);

Xho I (Takara);

酵母提取物 (OXOID);

蛋白胨 (OXOID);

琼脂粉 (上海文旻生化科技有限公司);

Ampicillin (上海生工生物工程有限公司);

氯化钠（上海大合化学制品有限公司）；

无水乙醇（上海振兴化工一厂）；

配制 5-Aza （sigma, A3656）储液：配置 500  $\mu\text{L}$ ，取 1.71 mg 5-Aza 溶于 1  $\times$  PBS 中。500  $\mu\text{L}$  分装成 10 管，取其中一管 50  $\mu\text{L}$  并 1: 10 稀释，再分装成 10 管（每管浓度是：1.5 mM）；

配制 TSA（sigma T-8552）储液：将干粉溶于 1  $\times$  PBS 中。使用前，取 5  $\mu\text{L}$  稀释至 50  $\mu\text{L}$  备用（每管浓度是：0.5 mM）。

### 3.1.3 TET1 启动子序列和 BSP 引物序列

引物名称	正向序列（5' to 3'）	反向序列（5' to 3'）
<b>TET1 promoter</b>	CCGCTCGAGGGACTGAATCCTT TCTC	CCCAAGCTTGTTTATCTCCGGCA ACAA
<b>TET1 bsp</b>	TTGAGGTTTGT TTTGGGGAGAT ATT	CAACTCCAAACCTACACCAACC CT

### 3.1.4 仪器

生物安全柜（Heal Force）；

MCO-18AIC CO<sub>2</sub> 细胞培养箱（日本三洋公司）；

DM1L 倒置显微镜（德国 Leica 公司）；

细胞计数仪（Biorad）；

称量仪（Sartorius）；

Centrifuge 5415 R（Eppendorf）；

Centrifuge 5418（Eppendorf）；

Thermomixer comfort（Eppendorf）；

C723 ND-1000 UV/Vis 分光光度仪（美国 NanoDrop 公司）；

QT-2 旋涡混合器（上海琪特分析仪器有限公司）；

Veriti 96 well thermo cycler（Applied Biosystems）；

Prism 7900 Detector System（Applied Biosystems）；

Bio-rad PowerPac 300 电泳仪；

隔水式恒温培养箱（上海一恒科技有限公司）；

Tocan 领成全自动凝胶成像系统（上海领成生物科技有限公司）；

THZ - 052 型气热式恒温摇床（SHAKER 公司）；

自动压力灭菌锅（天津市超拓公司）；

GloMax 20/20 Luminometer（Promega）；

UCD300—Bioruptor Next Generation System（Diagenode）。

### 3.1.5 生物学软件

MethPrimer 引物设计软件；  
 Toca 成像软件；  
 SDS 2.3 分析软件（Applied Biosystems）；  
 SPSS 20.0 统计软件；  
 GraphPad Prism 5 作图软件；  
 Chromas 2 测序结果读取软件；  
 CpG Viewer 测序分析软件；  
 GloMax 20/20 Luminometer 分析软件。

## 3.2 方法

### 3.2.1 细胞培养

细胞培养方法如 1.2.1 所述。

### 3.2.2 去甲基化处理

- (1) 按照 3.1.2 所述，配制  $10\times 5\text{-Aza}$  溶液和  $10\times \text{TSA}$  溶液；
- (2) 细胞准备，80%-90%满度细胞，一传三，即大约 20%-25 %满度种入 6 孔板中，过夜培养；
- (3) 按照下述表格处理细胞：

Time	1.5 $\mu\text{M}$ 5-Aza	3.0 $\mu\text{M}$ 5-Aza	4.5 $\mu\text{M}$ 5-Aza
<b>First day</b>	2 $\mu\text{L}$ $10\times 5\text{-Aza}$	4 $\mu\text{L}$ $10\times 5\text{-Aza}$	6 $\mu\text{L}$ $10\times 5\text{-Aza}$
	2 mL DMEM	2 mL DMEM	2 mL DMEM
<b>Second day</b>	2 $\mu\text{L}$ $10\times 5\text{-Aza}$	4 $\mu\text{L}$ $10\times 5\text{-Aza}$	6 $\mu\text{L}$ $10\times 5\text{-Aza}$
	2 mL DMEM	2 mL DMEM	2 mL DMEM
<b>Third day</b>	2 $\mu\text{L}$ $10\times 5\text{-Aza}$	4 $\mu\text{L}$ $10\times 5\text{-Aza}$	6 $\mu\text{L}$ $10\times 5\text{-Aza}$
	2 mL DMEM	2 mL DMEM	2 mL DMEM
<b>Forth day</b>	2 $\mu\text{L}$ $10\times 5\text{-Aza}$	4 $\mu\text{L}$ $10\times 5\text{-Aza}$	6 $\mu\text{L}$ $10\times 5\text{-Aza}$
	2 $\mu\text{L}$ $10\times \text{TSA}$	4 $\mu\text{L}$ $10\times \text{TSA}$	6 $\mu\text{L}$ $10\times \text{TSA}$
	2 mL DMEM	2 mL DMEM	2 mL DMEM
<b>Fifth Day</b>	Microscope observation of cell morphology	Microscope observation of cell morphology	Microscope observation of cell morphology
	Cell received	Cell received	Cell received

- (4) 倒去培养液加  $1 \times \text{PBS}$  1mL, 清洗一遍后, 每皿加入 200  $\mu\text{L}$  Trypsin-EDTA, 待细胞消化完毕, 加入 1 mL DMEM 终止消化, 转移至 1.5 mL EP 管中; 将细胞分为两份, 一份用来抽 DNA, 另一份用来抽 RNA;
- (5) 去甲基化验证, qPCR 检测 TET1 mRNA 水平变化, BSP 检测 TET1 启动子 CpG 岛的甲基化状态变化。

### 3.2.3 RNA 抽取、浓度测定

将消化终止后的细胞悬液 3500 rpm, 离心 5 min, 弃上清, 加入 1 mL TRIzol, 吹打混匀, 后续步骤如 1.2.2 所述, 如 1.2.3 所述进行 RNA 浓度测定。

### 3.2.4 反转录 PCR

取总量 500 ng 的 RNA 按照 1.2.4 所述步骤进行反转录 PCR。

### 3.2.5 荧光实时定量 PCR

将 cDNA 模板稀释 20 倍, 按照 1.2.5 所述步骤进行 qPCR。

### 3.2.6 DNA 抽取及浓度测定

将消化终止后的细胞悬液 3500 rpm, 离心 5 min, 弃上清, 加入 200  $\mu\text{L}$   $1 \times \text{PBS}$  重悬细胞, 后续步骤如 1.2.6 所述抽提 DNA, 并进行 DNA 浓度测定。

### 3.2.7 TET1 启动子硫化测序 PCR

#### 3.2.7.1 DNA 亚硫酸盐处理

如 1.2.7 方法所述, 取 500 ng DNA 进行亚硫酸盐转化。

#### 3.2.7.2 TET1 PCR

- (1) PCR 反应扩增 TET1 启动子目的片段, 按照如下体系配置:

10 $\times$ PCR buffer	2.0 $\mu\text{L}$
2.5 mmol/L dNTP	2.0 $\mu\text{L}$
5 $\mu\text{M}$ primer	2.0 $\mu\text{L}$
DNA	4.0 $\mu\text{L}$
Takara Hot Start Taq	0.2 $\mu\text{L}$
Water	9.8 $\mu\text{L}$
<hr/>	
Total	20 $\mu\text{L}$

- (2) 使用 Touchdown PCR 摸索 TET1 BSP 引物退火温度, 反应程序如下:



94℃	5 min		
94℃	30 s	}	40 cycles
52/54/56/58/60/62℃	20 s		
72℃	30 s		
4℃	∞		

(3) 1.5 % 琼脂糖 DNA 电泳验证, 确定 TET1 bsp 引物的退火温度为 58℃;

(4) 将退火温度设为 58℃后, 按照上述体系和反应程序进行 PCR 反应。

### 3.2.7.3 PCR 产物胶回收

将 20  $\mu\text{L}$  PCR 产物与 4  $\mu\text{L}$  6 $\times$  Loading Buffer 混合后全部上样, DNA 电泳, 后续步骤如 1.2.7.3 所述。

### 3.2.7.4 TA 克隆

Insert DNA 量为 50 ng, 剩余步骤如方法 1.2.7.4 所述。

### 3.2.7.5 转化

10  $\mu\text{L}$  连接产物转化 100  $\mu\text{L}$  DH5  $\alpha$  感受态细胞, 方法如 1.2.7.5 所述。

### 3.2.7.6 挑克隆

方法如 1.2.7.6 所述。

### 3.2.7.7 菌液 PCR 验证

(1) 培养结束后, 将菌液放置在 4℃冰箱中, 每管取出 1  $\mu\text{L}$  菌液进行 PCR 验证;

(2) 按照如下体系配置:

10 $\times$ PCR buffer	2.0 $\mu\text{L}$
2.5mmol/L dNTP	1.6 $\mu\text{L}$
M13 Forward Primer	0.2 $\mu\text{L}$
M13 Reverse Primer	0.2 $\mu\text{L}$
Takara Hot Start Taq	0.1 $\mu\text{L}$
DNA	1.0 $\mu\text{L}$
Water	14.9 $\mu\text{L}$
<hr/>	
Total	20 $\mu\text{L}$

#### PCR 反应条件

94°C	5 min	
94°C	30 s	} 35 cycles
58°C	20 s	
72°C	30 s	
72°C	5 min	
4°C	∞	

- (3) 取 10  $\mu$ L 菌液 PCR 产物与 2  $\mu$ L 6 $\times$ Loading Buffer 混匀，进行琼脂糖 DNA 电泳验证；
- (4) 电泳条带位置在 500 bp 处的则为成功连接目的条带的克隆，进行质粒抽取和测序。

#### 3.2.7.8 质粒抽取

方法如 1.2.7.8 所述。

#### 3.2.7.9 测序结果分析

序列分析方法如 1.2.7.9 所述。

#### 3.2.8 DNA 超声破碎

取 1  $\mu$ g DNA 进行超声破碎，步骤如 2.2.8 所述。

#### 3.2.9 羟甲基化 DNA 免疫共沉淀

按照 2.2.9 方法所述。

#### 3.2.10 TET1-pGL4.17 启动子载体构建

本实验选用的空载体为 pGL4.17 vector，我们构建的 TET1-pGL4.17 启动子载体是将 TET1 启动子 1.3Kb 的序列插入到 Xho I 和 Hind III 酶切位点之间，图谱如图 3.1A 所示。另外，pRL-SV40 vector（图 3.1B）为实验的萤火虫萤光素酶报告基因正态化提供内对照值。

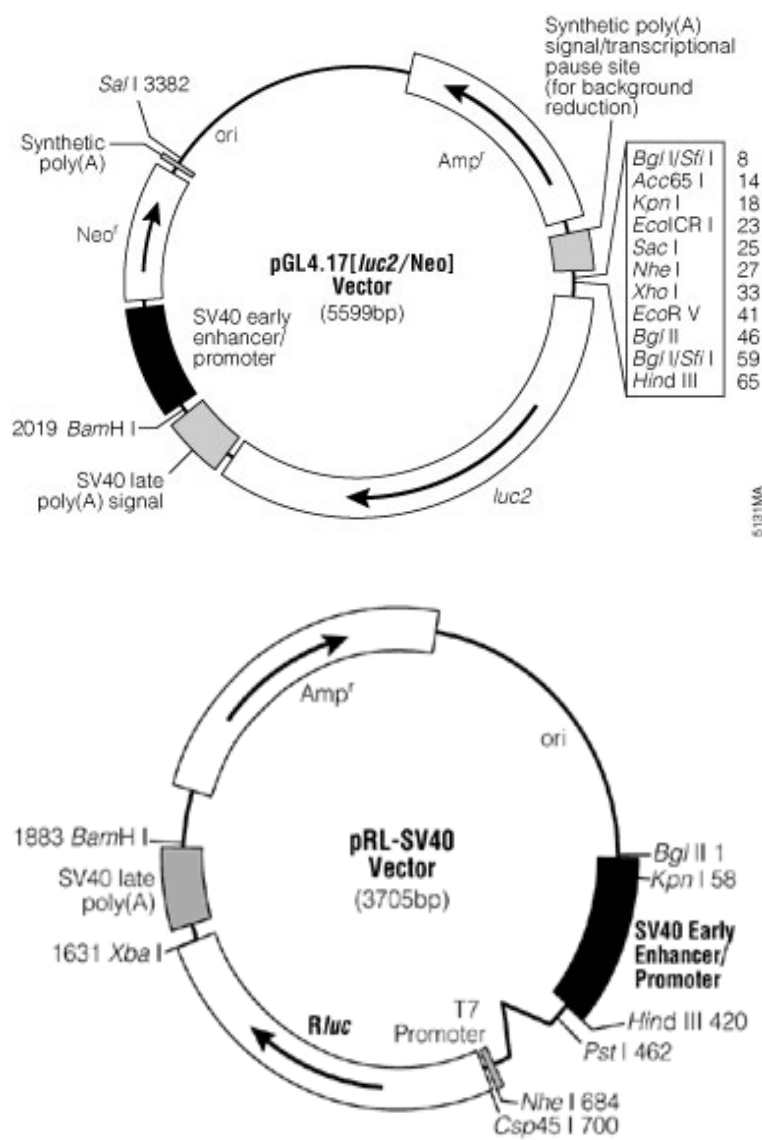


图 3.1 质粒图谱

(A) pGL4.17 质粒图谱; (B) pRL-SV40 图谱。

- (1) 从网址 [www.genecopoeia.com](http://www.genecopoeia.com) 下载 TET1 promoter 序列信息, 利用 primer premier 5.0 根据序列信息设计 TET1 promoter 引物序列, 并根据序列确定不会对目的片段产生剪切作用的内切酶种类, 从中选出能共用同一种缓冲体系的 *Xho* I 和 *Hind* III 内切酶, 两个内切酶的序列分别添加到引物的两端;
- (2) 以正常人 DNA 为模板, 使用高保真酶 Prime STAR HS DNA Polymerase 进行 TET1 启动子片段 PCR, 反应体系如下:

5×PCR buffer	4.0 μL
2.5mmol/L dNTP	1.6 μL
10μmol/L Primer	0.8 μL
Takara Hot Start Taq	0.2 μL
DNA	1.0 μL
Water	12.4 μL
Total	20 μL

反应条件如下：

98°C	5 min	
98°C	30 s	} 30 cycles
54°C	15 s	
72°C	90 s	
72°C	5 min	
4°C	∞	

- (3) 配置 1.5% 琼脂糖电泳胶，对 PCR 产物进行胶回收；
- (4) 对胶回收产物和空载体 pGL4.17 进行双酶切反应，37°C 酶切过夜，双酶切体系如下：

TET1 PCR 产物	23 μL	} 40 μL	pGL4.17 质粒	20 μL	} 40 μL
10×M buffer	4.0 μL		10×M buffer	4.0 μL	
Xho I	1.5 μL		Xho I	2.0 μL	
Hind III	1.5 μL		Hind III	2.0 μL	
生工水	10 μL		生工水	10 μL	

- (5) 对双酶切反应进行产物回收：
- 柱平衡，即向吸附柱 CB2 中（将吸附柱放入收集管中）加入 500 μL 平衡液 BL，12,000 rpm 离心 1 min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CB2 重新放回收集管中；
  - 向 40 μL 酶切反应液的体积中加入 200 μL 体积的结合液 PB，充分混匀；
  - 将上一步所得溶液加入已平衡的吸附柱 CB2 中（吸附柱放入收集管中），室温放置 2 min，12,000 rpm 离心 30-60 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CB2 重新放入收集管中；
  - 向吸附柱 CB2 中加入 600 μL 漂洗液 PW，室温下放置 2-5 min，12,000 rpm 离心 30-60 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CB2 放入收集管中；

- e) 重复操作步骤 d, 并将生工水放置在 65℃ 预热;
  - f) 将吸附柱 CB2 放回收集管中, 12,000 rpm 离心 2 min, 尽量除去漂洗液; 将吸附柱 CB2 置于室温放置数分钟, 彻底地晾干, 以防止残留的漂洗液影响下一步的实验;
  - g) 将吸附柱 CB2 放入一个干净的 1.5 mL 离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加 30  $\mu$ L 已预热的生工水, 室温放置 2 min, 12,000 rpm 离心 2 min 收集 DNA 溶液;
  - h) 重复步骤 g, 收集 DNA 溶液, 可冻存与 -20℃ 冰箱。
- (6) 将回收后的 TET1 promoter 片段和 pGL4.17 质粒在 T4 连接酶的作用进行连接反应, 25℃ 反应 3 h, 反应体系如下:
- |               |              |
|---------------|--------------|
| T4 连接酶 buffer | 2.0 $\mu$ L  |
| T4 连接酶        | 1.0 $\mu$ L  |
| pGL4.17       | 1.7 $\mu$ L  |
| TET1 PCR 产物   | 15.3 $\mu$ L |
| <hr/>         |              |
| Total         | 20 $\mu$ L   |
- (7) 取 10  $\mu$ L 连接产物转化 100  $\mu$ L DH5  $\alpha$  感受态细胞, 涂板, 挑克隆, 菌液 PCR 验证;
  - (8) 菌液 PCR 成功的菌液用于抽质粒后, 送测序(测序反应由赛音生物技术科技有限公司完成);
  - (9) 测序后的序列与参考序列进行比对, 无突变即为 TET1-pGL4.17 载体构建成功。

### 3.2.11 双荧光素酶报告质粒的转染

- (1) 按照 2.5.2 方法所述, 将 293T 细胞接种到 48 孔板中, TET1-pGL4.17 质粒+HBx-pcDNA3 质粒处理组和 TET1-pGL4.17 质粒+pcDNA3 质粒对照组各接种 6 孔;
- (2) 待细胞密度达到 70%-90% 时即可进行双荧光素酶报告质粒的转染。每孔转染 250 ng DNA (TET1-pGL4.17 : HBx-pcDNA3 = 125 ng: 125 ng; TET1-pGL4.17: pcDNA3 = 125 ng: 125 ng), pRL-SV40 vector 每孔转染 25 ng;
- (3) 后续步骤如 2.5.3 所述, 转染 24 h 之后, 收集细胞进行荧光素酶报告基因检测。

### 3.2.12 双荧光素酶报告基因活性检测

- (1) 将 5 $\times$ Passive Lysis Buffer 用超纯水稀释至 1 $\times$ Passive Lysis Buffer;

- (2) 将细胞板中的培养基吸出, 1×PBS 清洗一遍, 每孔中加入 80  $\mu$ L 1×Passive Lysis Buffer, 轻轻吹打细胞, 使细胞脱壁, 并将细胞板室温下放置在摇床上 15 min 以充分裂解细胞;
- (3) 将乙醇泡过的 GloMax 20/20 Luminometer 检测板用超纯水清洗干净, 放入烘箱, 蒸干水分;
- (4) 将细胞裂解液转移至 1.5 mL EP 管中, 14,000 rpm 离心 30 s, 吸取上清 40  $\mu$ L 至 GloMax 20/20 Luminometer 检测板;
- (5) 根据说明书, 稀释 Luciferase Assay Reagent II (LAR II) 和 Stop & Glo<sup>®</sup> Buffer, 根据 GloMax 20/20 Luminometer 的操作程序进行荧光素酶报告基因检测;
- (6) 实验结果使用 GloMax 20/20 Luminometer 分析软件进行处理。

### 3.3 结果

#### 3.3.1 TET1 在肝癌细胞中受甲基化调控

为验证 TET1 是否受甲基化调控, 使用不同浓度的甲基化酶抑制剂 5-Aza 和 TSA 对 HepG2 细胞进行去甲基化处理。如图 3.1 所示, HepG2 细胞系中 TET1 启动子的甲基化率 86.7% (3.2 B), 经过 5-Aza 处理之后甲基化率 (图 3.2 C) 下降到 73.1%, 两组之间甲基化率存在明显差异 ( $P = 0.013$ )。说明, HepG2 细胞在经过 5-Aza 处理后, TET1 启动子区原有的一些甲基化位点成功地去除了甲基化。

检测去甲基化处理组细胞和对照组细胞中 TET1 的 mRNA 表达水平, 发现与对照组细胞相比, TET1 的 mRNA 表达量具有 5-Aza 剂量依赖性, 即随着 5-Aza 使用量的增加而升高 (图 3.2 D)。由此可以看出, TET1 启动子区 CpG 岛的甲基化状态影响其 mRNA 表达。

A:

CTGAGGTCTGTCCTGGGGAGACACTGCTGCTCCG GGGGGGCTGACCTGGCG  
GGGAGTGGCCGCGCAGTCTGCTCCG GCGCCGCTTTGTGCGCGCAGCCGCT  
GGCCCCTCTACTCCCG GGTCTGCCCCCG GGACACCCCTCTGCCTCGCCCA  
AGTCATGCAGCCCTACCTGCCTCTCCACTGTGGACCTTTGGGAACCGACTC  
CTCACCTCG GGGGCTCG GGCCTTGACTGTGCTGGGAGCCG GTAGGCGTCC  
TCGCGCACC CGCCCGCGCCCCTCGCGCCCGCG GGGCCCCCG GGCTCCAAA  
GTTGTGGGGACCGGCGCGAGTTGGAAAGTTTGCCCGAGGGCTGGTGCAGG  
CTTGAGCTG

B:

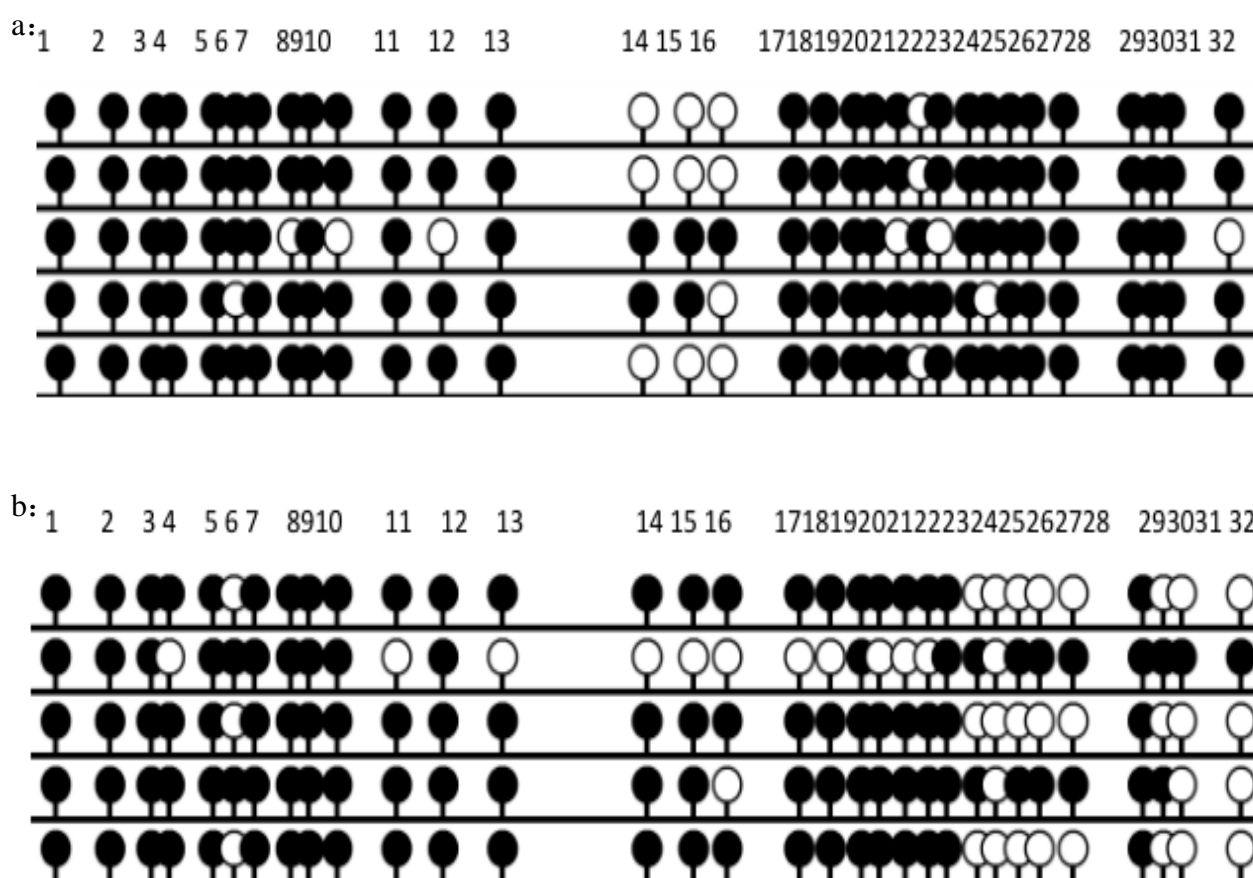
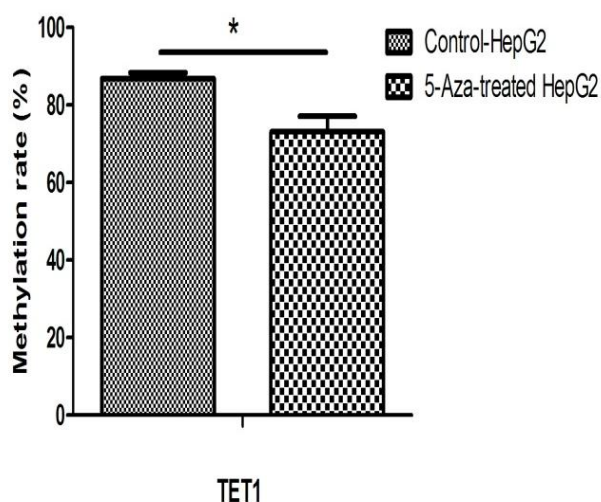


图 3.2 HepG2 细胞经过去甲基化处理后，TET1 启动子区去甲基化且 mRNA 表达上调

(A) TET1 启动子目的序列；(B) 5-Aza 处理 4 天的 HepG2 细胞 (b) 与对照组 (a) 的 BSP 检测结果。

C:



D:

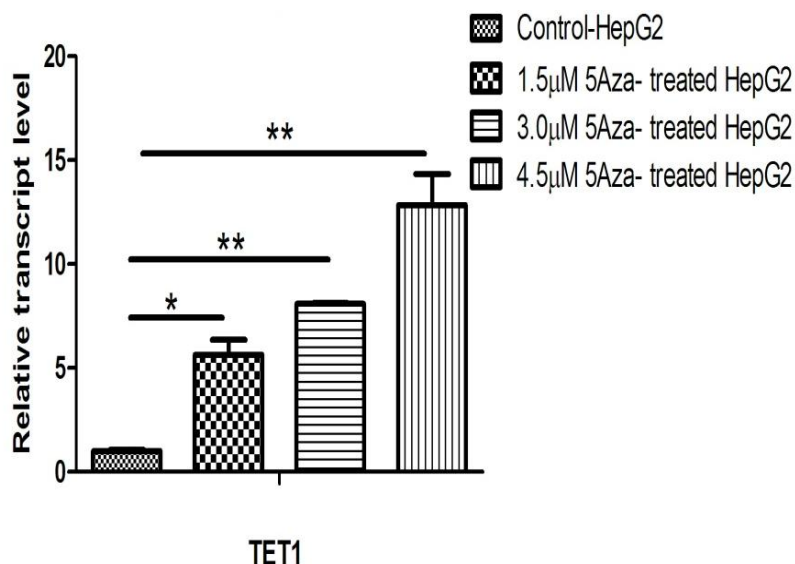


图 3.2 HepG2 细胞经过去甲基化处理后，TET1 启动子区去甲基化且 mRNA 表达上调

(C) TET1 甲基化率计算；(D)去甲基化处理组和对照组相比，TET1 mRNA 表达检测。TET1 在对照组中的表达设为 1。\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ 。

### 3.3.2 URG11 受 TET1 的羟甲基化调节

为验证 URG11 是否同样直接受甲基化调控，使用甲基化酶抑制剂 5-Aza 和 TSA 对 HepG2 细胞进行去甲基化处理。如图 3.3A 和 B 所示，HepG2 细胞 5-Aza 处理组的启动子区 CpG 岛甲基化状态并没有发生明显变化，但 URG11 mRNA 水平（图 3.3 C）同样具有剂量依赖性，即随着 5-Aza 处理剂量的增加，表达水平也逐渐升高。同样地，URG11 5-hmC 的量也具有 5-Aza 剂量依赖性，羟甲基



化水平逐渐增加。以上结果表明 URG11 并不直接受甲基化调控，而是受甲基化调控的 TET1 的调节。

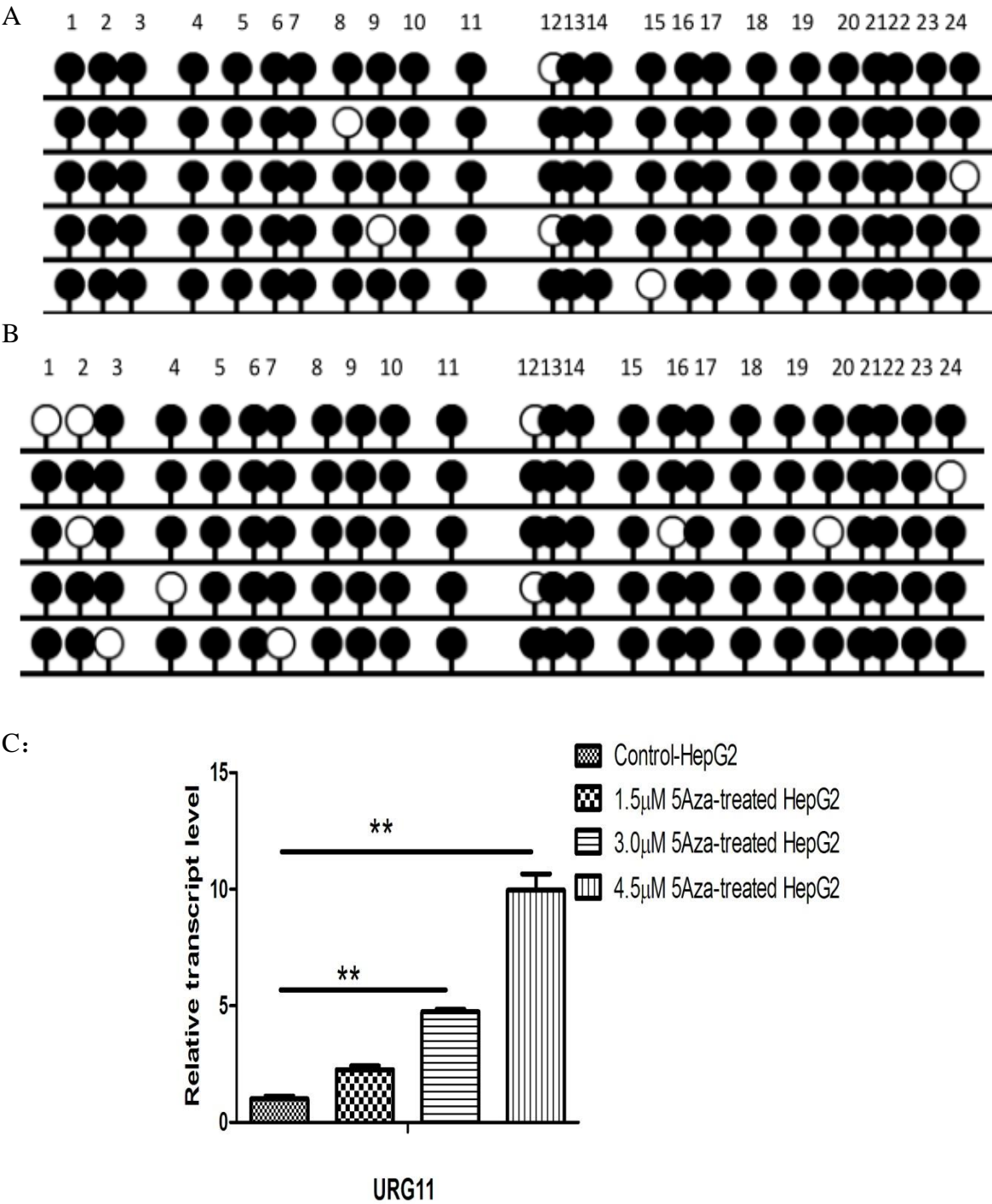


图 3.3 HepG2 细胞经过去甲基化处理后，URG11 启动子区未发生去甲基化但 mRNA 表达上调

(A) 对照组 BSP 检测结果；(B) 5-Aza 处理 4 天的 HepG2 细胞 (b) 与对照组 (a) 的 BSP 检测结果；(C) 处理组和对照组 URG11 mRNA 表达检测。URG11 在对照组中的表达设为 1。\*\*,  $P < 0.01$ 。

D:

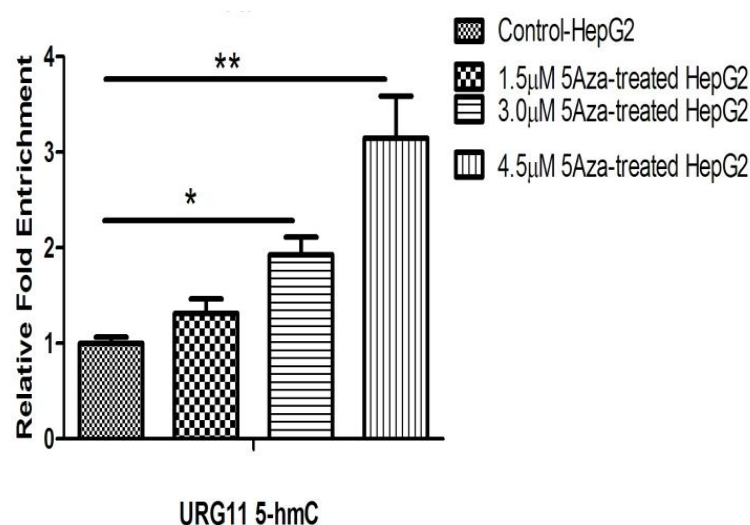


图 3.3 HepG2 细胞经过去甲基化处理后，URG11 启动子区未发生去甲基化但 mRNA 表达上调

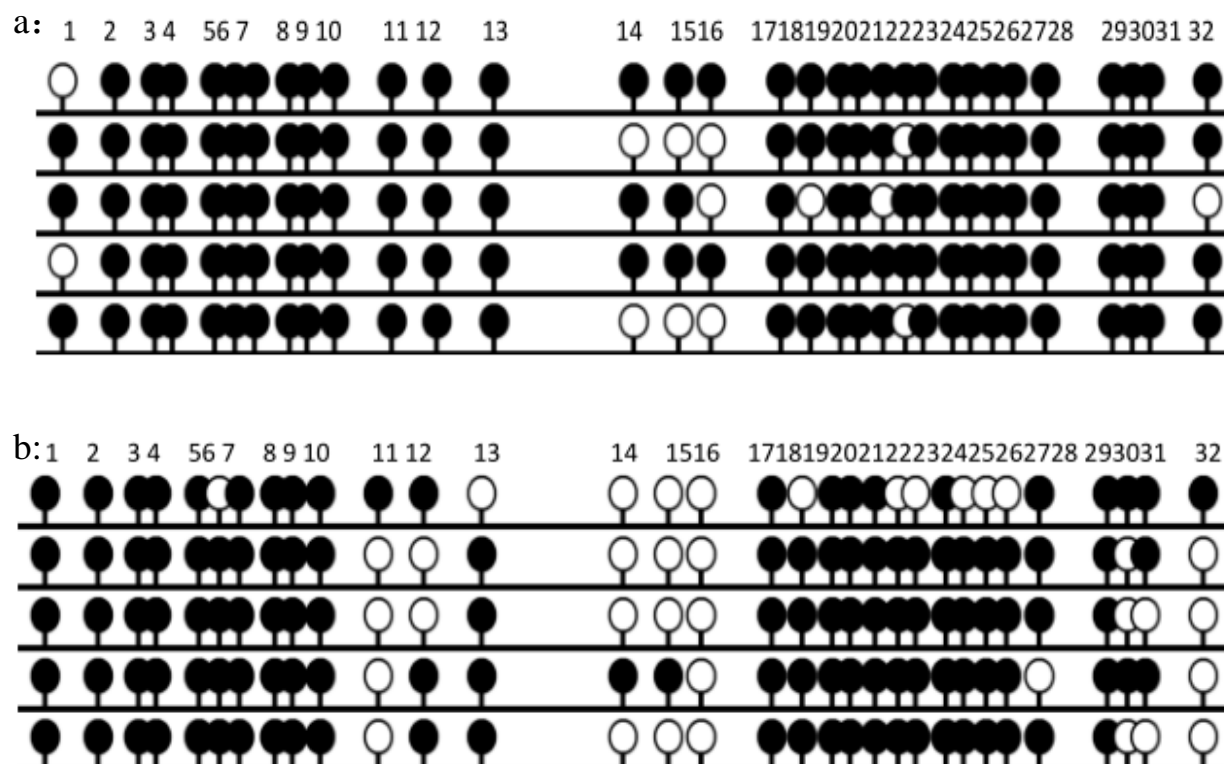
(D) 对照组和处理组中 URG11 启动子 5-hmC 水平检测。

URG11 5-hmC 在对照组中的表达设为 1。\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ 。

### 3.3.3 HBx 通过影响 TET1 的甲基化状态调节其表达

为探究 HBx 是否会影响 TET1 的甲基化，对 HBx 稳转株 SMMC-7721PBX 和对照株 SMMC-7721PB TET1 启动子区 CpG 岛进行甲基化水平检测。结果如图 3.4 所述，TET1 启动子在 SMMC-7721PBX 细胞株中的甲基化率（76.9%）与对照组（91.3%）具有明显差异（ $P = 0.009$ ）。由此表明 HBx 能够降低 TET1 启动子 CpG 岛的甲基水平，从而上调 TET1 的表达。

A



B:

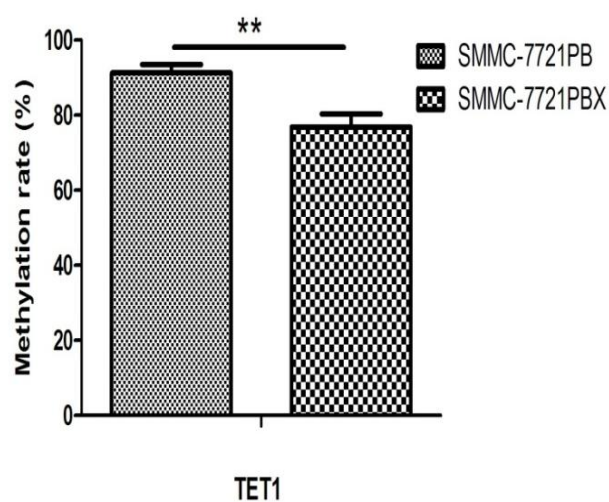


图 3.4 SMMC-7721PBX 中 TET1 启动子甲基化水平较对照细胞株低  
(A) HBx 稳转株 SMMC-7721PBX (b) 和对照株 SMMC-7721PB (a) TET1 启动子甲基化状态检测; (B) 两株细胞中 TET1 启动子甲基化率。\*\*,  $P < 0.01$ 。

### 3.3.4 HBx 能增强 TET1 启动子活性

以 pGL4.17 质粒作为空载体构建人 TET1 启动子载体, 经测序鉴定, 证明人 TET1-pGL4.17 质粒构建成功。构建成功的 TET1-pGL4.17 质粒分别和表达载体 HBx-pcDNA3 或空载体 pcDNA3 质粒转染 HEK293T 细胞, 然后进行双荧光素酶报告基因检测 HBx 表达激活 TET1 启动子荧光活性的产生情况。双荧光素酶报告基因实验结果显示, 在 HEK293T 细胞中, 与 TET1-pGL4.17+pcDNA3 对照组相比, TET1-pGL4.17+HBx-pcDNA3 处理组中的 TET1 的活性上升了  $1.6 \pm 0.1$  倍 ( $P = 0.01$ )。由于文献报道 TET1 能结合到自身启动子区, 促进自身发生羟甲基化和去甲基化同时上调表达, 所以 HBx 蛋白通过触发 TET1 启动子活性, 结合 TET1 的正反馈调节诱导 TET1 表达增加。

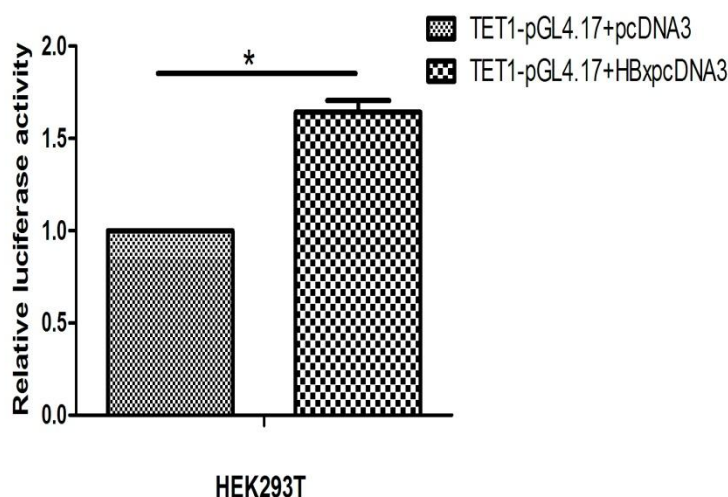


图 3.5 HBx-pcDNA3 质粒能增强 TET1-pGL4.17 启动子活性  
TET1-pGL4.17 质粒在对照组中的活性设为 1。\*,  $P < 0.05$ 。

### 3.4 讨论

本研究利用甲基化抑制剂 5-Aza 处理 HepG2 细胞, qPCR 和 BSP 检测发现处理后 TET1 的表达水平随着 5-Aza 剂量的增加而升高, 处理组 TET1 启动子 CpG 岛的甲基化程度也随之降低了。由此, 可以看出 TET1 的在肝癌中的下调表达与启动子 CpG 岛的甲基化程度有关。另外 SMMC-7721PBX 细胞株中 TET1 的表达水平和启动子 CpG 岛的甲基化程度与对照株相比具有明显差异, 表明在肝癌细胞中 HBx 是可以影响 TET1 启动子 CpG 岛甲基化状态上调其表达的。TET1 也在其他癌症中被报道下调表达与甲基化状态相关, 如 Miao Sun 等人发现 TET1

启动子区转录起始位点上游±1kb 区域含有甲基化的 CpG 岛，当乳腺癌细胞中 HMAG2 被敲除后，该段区域的甲基化程度发生明显下降，诱导 TET1 的表达<sup>[53]</sup>。

TET1 在 DNA 去甲基化过程中发挥重要作用，协同转录激活因子或转录抑制因子活化或抑制基因表达。有趣的是，已有的 ChIP-seq 数据显示<sup>[45, 54, 55]</sup>，TET1 本身具有正反馈调节机制，即 TET1 能够结合自身启动子序列并催化发生去甲基化，增强自身表达，调控下游靶基因的表达<sup>[53]</sup>。为避免细胞中 TET1 的本底表达对 TET1 的启动子载体 TET1-pGL4.17 的荧光活性产生影响，我们选取了不表达 TET1 的 HEK293T 细胞探究 TET1 是否是 HBx 直接的靶基因。双荧光素酶报告基因检测结果证实了 HBx-pcDNA 表达载体可以激活 TET1 启动子活性，说明 HBx 可作为一种转录因子结合到 TET1 的启动子区。

基于上述研究基础并结合我们的实验结果，可推断 HBx 蛋白促进 TET1 发生去甲基化的机制，即 HBx-pcDNA3 质粒能够作为一种转录因子结合到 TET1 启动子区，激活 TET1 启动子活性，诱使 TET1 表达，TET1 的表达升高进一步促进催化 TET1 启动子区 5-mC 转化为 5-hmC，导致 TET1 的甲基化水平发生明显下调。由于甲基化修饰是一个可逆的过程，所以当 HBx 蛋白不存在时，TET1 启动子活性降低，不再结合到自身启动子序列，甲基化程度上升，表达下调。

### 3.5 小结

本章主要通过去甲基化实验和双荧光素酶报告基因检测的方法，探究 HBx 调控 TET1 的分子机制。

我们发现：

1. 在肝癌中，TET1 的表达受甲基化调控，其表达升高会促进 URG11 启动子 5-hmC 水平增加；
2. HBx 可以促进 TET1 启动子 CpG 岛的甲基化程度降低；
3. HBx 可以激活 TET1-pGL4.17 启动子活性。

提示 HBx 可通过甲基化和/或激活启动子调控 TET1，进而调控 URG11 表达。

## 第4章 总结与展望

HBV 感染是我国肝癌发生的主要诱因,从病毒感染引发慢性炎症直至癌症发生发展的过程非常漫长,对这一炎症转化过程的调控网络和分子机制的深入探讨有助于揭示炎症向肿瘤转化的本质,发现能早期预警、诊断和判断预后的候选标志物或肿瘤防治的干预靶点。

URG11 是一个可被 HBx 上调的重要的癌基因,不仅能促进肝细胞增殖、分化,并可促进肝癌细胞在裸鼠体内的成瘤能力,在肝癌发生发展中发挥重要的促癌功能;更为重要的是,其单独或联合其他基因对于从乙肝慢性炎症到肝癌发生有重要的预警价值,因此,深入明确其调控网络具有重要的意义。本论文基于此研究背景,探讨 HBx 调控 URG11 的分子机制。

本研究首次发现 HBx 蛋白和羟甲基化存在着关联性,即 HBx 蛋白能够调控羟甲基化酶 TET1 进而促进癌基因 URG11 的上调表达。我们从 mRNA 水平和 DNA 水平比较了肝细胞 HL-7702、整合 HBV 基因组的 HepG2.2.15 细胞和肝癌细胞 HepG2 中 URG11 的表达水平和甲基化水平差异。qPCR 和 BSP 实验结果显示,URG11 的表达差异与其自身启动子甲基化水平呈正相关关系,即在 HepG2.2.15 细胞中,URG11 的表达量显著升高,其启动子甲基化水平最低。由此推测,当 HBV 感染肝细胞后,URG11 启动子经历去甲基化过程,其表达水平也随之上调;当 HBV 不存在时,URG11 的甲基化状态恢复到高甲基化状态。

TET 家族参与了 DNA 去甲基化过程。其成员之一 TET1 在肝癌中的表达量较正常肝组织显著下降,因此我们猜测 TET1 可能参与了 HBx 蛋白上调 URG11 的分子过程。为验证这一猜测,我们使用 TET1 siRNA 干扰 HepG2.2.15 细胞,qPCR 和羟甲基化免疫共沉淀方法检测 TET1/URG11 的 mRNA 水平以及 URG11 启动子 5-hmC 水平,发现 URG11 的 mRNA 和 5-hmC 水平均发生明显下调,表明 TET1 在 HBx 调控 URG11 中发挥作用。为进一步证实 HBx 可以调控 TET1 促进 URG11 启动子发生羟甲基化,我们进行了 HBx-pcDNA3 质粒和 HBx siRNA 转染,结果证实 HBx 可以上调 TET1 转录水平,进而促进 URG11 发生羟甲基化,URG11 表达上调。

我们随后重点研究了 HBx 调控 TET1 的分子机制。用去甲基化试剂 5-Aza 处理 HepG2 细胞后,qPCR 和 BSP 结果表明 TET1 在肝癌中受甲基化调控。因此,我们猜测 HBx 可能通过影响 TET1 启动子甲基化状态调节其表达。为验证此猜测,我们对 HBx 稳转株 SMMC-7721PBX 和对照株 SMMC-7721PB 进行 TET1 启动子甲基化水平检测,结果证实 TET1 介导 HBx 上调 URG11 的分子过程。为进一步验证 TET1 是否是 HBx 直接的靶基因,我们构建了 TET1 启动子荧光载体,进行双荧光素酶报告基因检测,结果表明 HBx 可增强 TET1 启动子活性。

我们的研究不仅深入了对 URG11 在肝癌中的分子调控网络的认识,还揭示了一种新的炎癌恶性转化调节机制,即基于羟甲基化酶 TET1 介导的 HBx 诱导肝癌发生过程。URG11 是 TET1 调控的众多靶基因之一,其他靶基因在肿瘤发生发展过程中同样起到重要的作用。因此,TET1 可能成为炎癌恶性转化过程中的关键节点或重要分子,是潜在的新型肿瘤防治药物靶点。研究 HBx 蛋白上调 TET1 的分子机制以及 TET1 下游分子调控网络有望为预防非可控性炎症向癌症转化发现新的靶标分子,为临床研究提供新的药物靶点或诊断方法。

## 参考文献

- [1] COUGOT D, NEUVEUT C, BUENDIA M A. HBV induced carcinogenesis[J]. J Clin Virol, 2005, 34 Suppl 1: S75-78.
- [2] ENGELKE M, MILLS K, SEITZ S, et al. Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site[J]. Hepatology, 2006, 43(4): 750-760.
- [3] 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.
- [4] KEW M C. Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26 Suppl 1: 144-152.
- [5] NG S A, LEE C. Hepatitis B virus X gene and hepatocarcinogenesis[J]. J Gastroenterol, 2011, 46(8): 974-990.
- [6] MURAKAMI S. Hepatitis B virus X protein: a multifunctional viral regulator[J]. J Gastroenterol, 2001, 36(10): 651-660.
- [7] PARK Y H, SHIN H J, KIM S U, et al. iNOS promotes HBx-induced hepatocellular carcinoma via upregulation of JNK activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 435(2): 244-249.
- [8] FEITELSON M A, LEE J. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis[J]. Cancer Lett, 2007, 252(2): 157-170.
- [9] GUERRIERI F, BELLONI L, PEDICONI N, et al. Molecular mechanisms of HBV-associated hepatocarcinogenesis[J]. Semin Liver Dis, 2013, 33(2): 147-156.
- [10] YE L, DONG N, WANG Q, et al. Progressive changes in hepatoma cells stably transfected with hepatitis B virus X gene[J]. Intervirology, 2008, 51(1): 50-58.
- [11] ZHANG X, DONG N, ZHANG H, et al. Effects of hepatitis B virus X protein on human telomerase reverse transcriptase expression and activity in hepatoma cells[J]. J Lab Clin Med, 2005, 145(2): 98-104.
- [12] LIU Y C, CHEN C J, WU H S, et al. Telomerase and c-myc expression in hepatocellular carcinomas[J]. Eur J Surg Oncol, 2004, 30(4): 384-390.
- [13] BECKER S A, LEE T H, BUTEL J S, et al. Hepatitis B virus X protein interferes with cellular DNA repair[J]. J Virol, 1998, 72(1): 266-272.
- [14] MA N F, LAU S H, HU L, et al. COOH-terminal truncated HBV X protein plays key role in hepatocarcinogenesis[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(16): 5061-5068.



- [15]WANG Y, LAU S H, SHAM J S, et al. Characterization of HBV integrants in 14 hepatocellular carcinomas: association of truncated X gene and hepatocellular carcinogenesis[J]. *Oncogene*, 2004, 23(1): 142-148.
- [16]KIM S O, PARK J G, LEE Y I. Increased expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene in hepatocellular carcinoma cell lines: implications of IGF-I receptor gene activation by hepatitis B virus X gene product[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(16): 3831-3836.
- [17]LIAN Z, LIU J, LI L, et al. Upregulated expression of a unique gene by hepatitis B x antigen promotes hepatocellular growth and tumorigenesis[J]. *Neoplasia*, 2003, 5(3): 229-244.
- [18]DU R, XIA L, SUN S, et al. URG11 promotes gastric cancer growth and invasion by activation of beta-catenin signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(3): 621-635.
- [19]O'LEARY J M, HAMILTON J M, DEANE C M, et al. Solution structure and dynamics of a prototypical chordin-like cysteine-rich repeat (von Willebrand Factor type C module) from collagen IIA[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(51): 53857-53866.
- [20]DRICKAMER K, FADDEN A J. Genomic analysis of C-type lectins[J]. *Biochem Soc Symp*, 2002, (69): 59-72.
- [21]TOMASETTO C, MASSON R, LINARES J L, et al. pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins[J]. *Gastroenterology*, 2000, 118(1): 70-80.
- [22]CHRISTIAN S, AHORN H, KOEHLER A, et al. Molecular cloning and characterization of endosialin, a C-type lectin-like cell surface receptor of tumor endothelium[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(10): 7408-7414.
- [23]LIAN Z, LIU J, LI L, et al. Enhanced cell survival of Hep3B cells by the hepatitis B x antigen effector, URG11, is associated with upregulation of beta-catenin[J]. *Hepatology*, 2006, 43(3): 415-424.
- [24]DU R, HUANG C, BI Q, et al. URG11 mediates hypoxia-induced epithelial-to-mesenchymal transition by modulation of E-cadherin and beta-catenin[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1): 135-141.
- [25]BAYLIN S B. DNA methylation and gene silencing in cancer[J]. *Nat Clin Pract Oncol*, 2005, 2 Suppl 1: S4-11.
- [26]TISCHOFF I, TANNAPFE A. DNA methylation in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(11): 1741-1748.

- [27]GAMA-SOSA M A, SLAGEL V A, TREWYN R W, et al. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors[J]. *Nucleic Acids Res*, 1983, 11(19): 6883-6894.
- [28]OZEN C, YILDIZ G, DAGCAN A T, et al. Genetics and epigenetics of liver cancer[J]. *N Biotechnol*, 2013, 30(4): 381-384.
- [29]TIAN Y, YANG W, SONG J, et al. Hepatitis B virus X protein-induced aberrant epigenetic modifications contributing to human hepatocellular carcinoma pathogenesis[J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(15): 2810-2816.
- [30]HERCEG Z, PALIWAL A. Epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinoma: how environmental factors influence the epigenome[J]. *Mutat Res*, 2011, 727(3): 55-61.
- [31]PARK I Y, SOHN B H, YU E, et al. Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(4): 1476-1494.
- [32]HERMAN J G, BAYLIN S B. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(21): 2042-2054.
- [33]CHEN T, LI E. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2004, 60: 55-89.
- [34]POGRIBNY I P, RUSYN I. Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2014, 342(2): 223-230.
- [35]ITO S, D'ALESSIO A C, TARANOVA O V, et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification[J]. *Nature*, 2010, 466(7310): 1129-1133.
- [36]ITO S, SHEN L, DAI Q, et al. Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine[J]. *Science*, 2011, 333(6047): 1300-1303.
- [37]TAHILIANI M, KOH K P, SHEN Y H, et al. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1[J]. *Science*, 2009, 324(5929): 930-935.
- [38]BHUTANI N, BRADY J J, DAMIAN M, et al. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation[J]. *Nature*, 2010, 463(7284): 1042-1047.
- [39]VALINLUCK V, SOWERS L C. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 946-950.

- [40] ABDEL-WAHAB O, MULLALLY A, HEDVAT C, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies[J]. *Blood*, 2009, 114(1): 144-147.
- [41] KINNEY S R, PRADHAN S. Ten eleven translocation enzymes and 5-hydroxymethylation in mammalian development and cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2013, 754: 57-79.
- [42] FRAUER C, ROTTACH A, MEILINGER D, et al. Different binding properties and function of CXXC zinc finger domains in Dnmt1 and Tet1[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16627.
- [43] ZHANG H K, ZHANG X, CLARK E, et al. TET1 is a DNA-binding protein that modulates DNA methylation and gene transcription via hydroxylation of 5-methylcytosine[J]. *Cell Research*, 2010, 20(12): 1390-1393.
- [44] SZWAGIERCZAK A, BULTMANN S, SCHMIDT C S, et al. Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(19): e181.
- [45] WILLIAMS K, CHRISTENSEN J, PEDERSEN M T, et al. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity[J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 343-U472.
- [46] GUO J U, SU Y, ZHONG C, et al. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain[J]. *Cell*, 2011, 145(3): 423-434.
- [47] LIU C G, LIU L M, CHEN X J, et al. Decrease of 5-Hydroxymethylcytosine Is Associated with Progression of Hepatocellular Carcinoma through Downregulation of TET1[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5).
- [48] HUANG H, JIANG X, LI Z, et al. TET1 plays an essential oncogenic role in MLL-rearranged leukemia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(29): 11994-11999.
- [49] HUANG S S, ZHU Z Q, WANG Y Q, et al. Tet1 is required for Rb phosphorylation during G1/S phase transition[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 434(2): 241-244.
- [50] HSU C H, PENG K L, KANG M L, et al. TET1 Suppresses Cancer Invasion by Activating the Tissue Inhibitors of Metalloproteinases[J]. *Cell Reports*, 2012, 2(3): 568-579.

- [51]LIU F, ZHOU Y, ZHOU D, et al. Whole DNA methylome profiling in lung cancer cells before and after epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Diagn Pathol, 2014, 9(1): 66.
- [52]FRYCZ B A, MURAWA D, BOREJSZA-WYSOCKI M, et al. Decreased expression of ten-eleven translocation 1 protein is associated with some clinicopathological features in gastric cancer[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2014, 68(2): 209-212.
- [53]SUN M, SONG C X, HUANG H, et al. HMGA2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(24): 9920-9925.
- [54]XU Y F, WU F Z, TAN L, et al. Genome-wide Regulation of 5hmC, 5mC, and Gene Expression by Tet1 Hydroxylase in Mouse Embryonic Stem Cells[J]. Molecular Cell, 2011, 42(4): 451-464.
- [55]WU H, D'ALESSIO A C, ITO S, et al. Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells[J]. Nature, 2011, 473(7347): 389-U578.

## 综述

### MicroRNA 单核苷酸多态与肝癌易感性的关联研究进展

近年来我国肝癌发病率迅速增长, 由于早期肝癌症状不典型、诊断困难, 缺乏有效的筛查手段, 就诊时多已为肿瘤晚期。目前的肝癌筛查手段因其操作复杂, 花费高且效果差, 限制了其在肝癌筛查中的广泛应用, 因此急需开发肝癌筛查、早期诊断的可靠标志物。现有较多研究表明 microRNA 与癌症的发生发展密切相关, 并且 microRNA 的单核苷酸多态可通过改变 microRNA 的加工过程以及靶结合位点的选择从而影响肿瘤的易感性以及患者预后等, 因此 microRNA SNP 有望成为肝癌诊断和预后评估的肿瘤筛查标志物。

#### 1. 概述

##### 1.1 肝癌

肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是目前人类最常见的恶性肿瘤之一, 也是世界上第三大引起死亡的肿瘤<sup>[1]</sup>。遗传因素和环境因素都能诱导肝癌的发生。其中乙肝病毒和丙肝病毒慢性感染是造成肝癌发生的主要因素; 酗酒、吸烟、糖尿病、肥胖等因素也可诱导肝癌的发生<sup>[2]</sup>。

我国肝癌的发病率位居全球首位, 而且大多肝癌病例发现较晚, 治疗成本高昂且效果差。因此, 肝癌早期诊断显得尤为重要。目前, 传统的肝癌诊断方法主要分为血清学检查和肝脏影像技术。血清学检查包括  $\alpha$ -甲胎蛋白 (AFP) 和异常甲基化的 DNA; 肝脏影像技术则包括腹部超声波检查、计算机断层扫描、磁共振成像技术、血管造影片以及肝脏活组织检查等<sup>[3]</sup>。但由于这些传统的诊断方法应用具有局限性并缺乏高度的灵敏性、准确性而使肝癌具有不良预后的现状, 导致肝癌的死亡率和发生率几乎相等, 因此, 寻找并开发具有高准确性、高灵敏性的新型诊断方法成为目前肝癌研究的热点和难点<sup>[4]</sup>。大量研究表明, miRNA SNP 与癌症的发生发展有着密切关系, 是一种新型癌症标志物, 有望成为肝癌筛查的潜在有效手段。

##### 1.2 MicroRNA SNP

MicroRNAs (miRNAs) 即微小 RNA, 是在所有真核类生物中发现的一类平均长度为 22 个核苷酸的小分子 RNA。它产生于前体 miRNA (pre-miRNA), 可与靶 mRNA 的 3'-UTR 区配对并抑制靶 mRNA 的翻译或促使其降解, 具有转录后调控基因表达的功能 (图 1)<sup>[5]</sup>。人类基因组中约有 1000 种 microRNA, 可影响 60 % 基因的表达与调控。进一步的研究表明, microRNA 分子参与了包括发

育、细胞分化、细胞凋亡、脂类代谢和激素分泌等多种生理过程，以及包括白血病、肺癌、结肠癌、糖尿病和病毒感染等多种病理过程<sup>[6]</sup>。

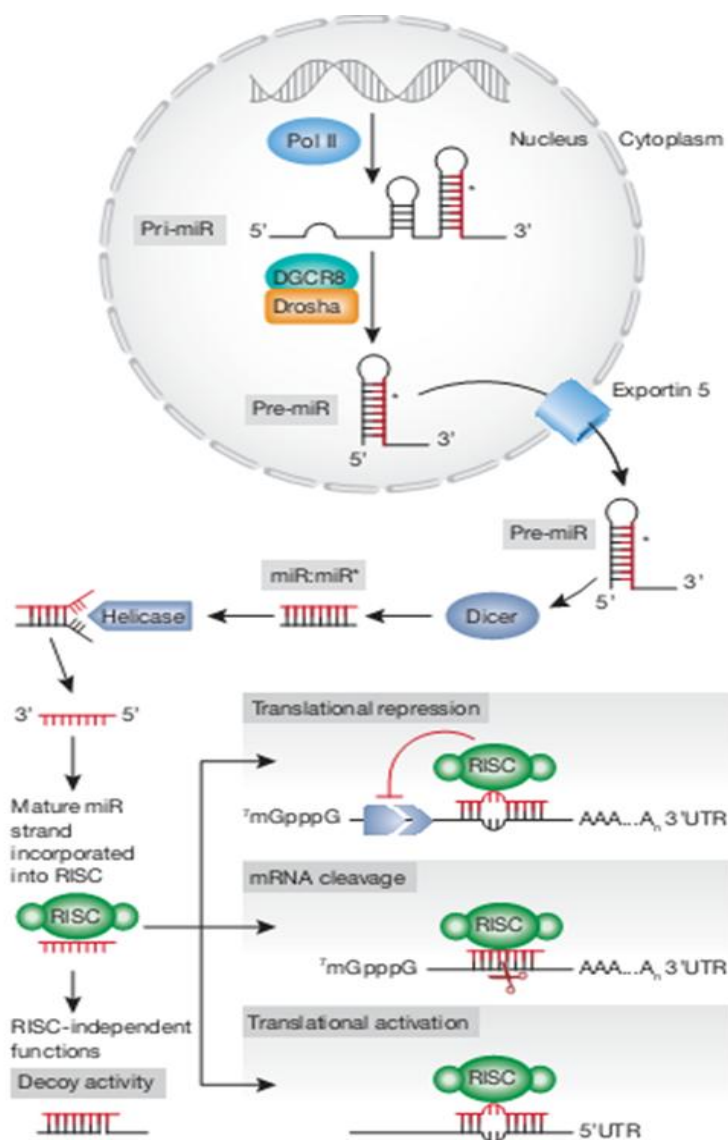


图 1. miRNA 加工形成过程及机制

既往研究表明，与正常组织相比，microRNA 在肝癌组织中异常表达<sup>[7]</sup>，并与肿瘤的发生发展以及患者预后密切相关，因此是潜在的诊断、治疗以及预后的生物标志物。如樊嘉研究小组发现一组 microRNA 可以有效地用来诊断或预测肝癌的发生发展，尤其是早期肝癌的发生，其准确度可达到 90 %<sup>[4]</sup>。此项研究推动了肝癌早期诊断技术的发展。另外，microRNA 在物种进化中相当保守，具有组织特异性和时序性；同时，血清 microRNA 作为肿瘤标志物具有高稳定性和高敏感性、检测方便、创伤性小、成本较低、易于推广等特点的特点<sup>[8]</sup>，因此，microRNA 有望成为肝癌诊断和预后评估的理想的肿瘤筛查标志物。

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)是 DNA 序列上发生的单个核苷酸碱基之间的变异,它是人类可遗传的变异中最常见的一种,在人类基因组中广泛存在。microRNA SNPs 这种单个碱基的改变会导致 microRNA 与不同的靶基因的结合并因此影响靶基因的正常表达<sup>[9]</sup>。单核苷酸多态性是导致个体和种族药物反应性和疾病易感性差异的重要原因之一。在肿瘤的发生、发展的过程中,SNP 并不直接诱导细胞的恶性转变及肿瘤发生,但可能会通过赋予个体对某种特殊的环境因素易感性从而使个体或种群患癌症的危险性升高<sup>[10]</sup>。近来研究发现,编码 microRNA 的基因及 microRNA 的靶基因结合位点也存在 SNP,这些 SNP 为阐明人类疾病易感性和药物反应性个体差异提供了新的解释<sup>[11]</sup>。目前已有多项研究证实 microRNA 基因的单核苷酸多态性在多种肿瘤的发生、发展过程中都发挥着关键的调节作用<sup>[12, 13]</sup>。因此, microRNA SNPs 为肝癌诊断方法的发展提供了一个新的发展方向。本文主要讨论位于编码 microRNA 基因的单核苷酸多态位点对肝癌易感性的影响。

## 2. MiRNA SNP 的调节机制

microRNA 在人类的生长发育中发挥重要的调节作用。大量病例对照研究证实 microRNA SNPs、microRNA 靶位点的 SNP 位点以及癌症易感性之间存在着关联性。microRNA 的 SNPs 可以影响成熟 mRNA 的表达水平、新 microRNA 的生成以及 miRNA 与靶基因的结合的亲和力,从而诱导恶性肿瘤的发生<sup>[14]</sup>。位于 microRNA 基因中的 SNPs 主要通过以下三种方式影响靶基因与 microRNA 的结合进而上调/下调基因表达,从而使体内的多种生理活动发生改变,影响个体的肿瘤易感性:一是通过初级转录物的转录;二是通过 pri-miRNA 与 pre-miRNA 的加工过程;三是通过 miRNA 与 mRNA 之间的相互作用<sup>[15]</sup>。

## 3. 与肝癌相关的 microRNA SNP

目前研究报道的与肝癌易感性密切相关的 microRNA SNP 位点不多,位于 microRNA 基因的 SNP 位点主要有以下 4 个 (Table. 1)。

### 3.1 miR-146a rs2910164 与肝癌

miR-146a rs2910164 是第一个发现的与肝癌易感性相关的 microRNA SNP 位点。Xu T 等人对 479 例肝癌患者和 504 例正常人进行 microRNA-146a SNP 位点测序的研究中,统计结果显示:与带有 CC 基因型的个体相比,带有 GG 基因型的个体,患原发性肝癌的风险更大<sup>[16]</sup>。结果显示携带 GG 基因型的男性患原发性肝癌的风险性是携带 CC 基因型男性的 2 倍。该单核苷酸多态位点位于成熟 miR-146a 序列的配对茎部区域,从而可导致 miR-146a 前体的茎部结构发生 G:

U→C: U 的错配。碱基的错配进一步影响了成熟 miR-146a 的产生。携带 G 等位基因的 miR-146a 前体, 其成熟 miR-146a 的表达水平比携带 C 等位基因的要高。在 NIH/3T3 细胞系中, 研究发现 miR-146a 可以显著促进细胞增殖和克隆形成<sup>[16]</sup>。因此 miR-146a 基因携带 GG 基因型的个体, 其成熟 miR-146a 的表达水平显著增高, 从而促使细胞增殖, 更易发生癌变。

### 3.2 miR-196a-2 rs11614913 与肝癌

从目前的研究不难看出, miR-196a2 是研究最多的一个 microRNA 单核苷酸多态位点, 也是与肝癌易感性相关性得到较多验证的位点。H. Akkiz 等人的研究表明, 土耳其人的 miR-196a-2 rs11614913 多态性位点是原发性肝癌遗传易感性因素之一, 尤其是对于男性和乙肝病毒感染的患者。携带 miR-196a2 rs11614913 C 等位基因和 CC 基因型的个体更易于患有肝癌<sup>[17]</sup>。此 microRNA SNP 位点不仅与肝癌易感性密切相关, 在其他一些癌症, 如非小细胞肺癌<sup>[18]</sup>、食管癌<sup>[10]</sup>、乳腺癌<sup>[19]</sup>和胃癌<sup>[20]</sup>等, 同样得到实验验证其存在相关性。在多项研究中表明, miR-196a2 rs11614913C 突变为 T, 影响成熟 miR-196a2 的加工过程, 从而降低了成熟 miR-196a2 的表达水平<sup>[21, 22]</sup>。现有报道表明 HOX 基因和 ANXA1 基因是 miR-196a2 的靶位点。HOX 基因是一种重要的转录因子, 在胚胎发生、器官发生以及癌发生中具有重要作用。因此, HOX 基因失调可诱发肝癌发生以及恶性肿瘤的转化<sup>[23]</sup>。ANXA1 则是已知的细胞凋亡的调节子, 细胞增殖的抑制子。研究同样表明 ANXA1 失调会促使恶性肿瘤转化从而导致肝癌发生发展, 并且与组织学等级以及肝癌的转移能力有关<sup>[24]</sup>。而 miR-196a2 表达水平升高, 会使其 HOX 基因和 ANXA1 基因等靶位点失调, 从而可能在肝癌的易感性方面起一种致癌基因的作用。

### 3.3 pri-miR-218 rs11134527 与肝癌

此外, 另有研究报道, 在中国人群中, pri-miR-218 rs11134527 位点也与肝癌遗传易感性具有相关性。Zhang LS 等人研究结果表明携带有 AG 基因型的 miR-128rs11134527 位点的中国人群患肝癌的危险系数更高, 并且此位点还调节肝癌患者体内甲胎蛋白 (AFP) 的表达<sup>[25]</sup>。已往研究结果显示, 在胚胎发育过程中, 肝脏和胰腺器官中, miR-218 与肝脏和胰腺发育的重要调节因子——Onecut 转录因子 2 (OC-2) 3'-UTR 区域靶位点的结合, 从而可降低内源性 OC-2 mRNA 的表达水平<sup>[26]</sup>, 因此 miR-218 在肝脏和胰腺的发育中起重要的调节作用, 增加原发性肝癌发生的危险性。

### 3.4 mir-499 rs3746444 与肝癌



Yu Xiang 等人研究表明, 在中国人群中, mir-499 rs3746444 与乙肝病毒引起的肝癌易感性相关。G > C 多态性位于成熟 miR-146a 配对序列的茎部区域, 这一多态性导致 miR-499 前体茎部区域序列中 A: U 配对转变成 G: U 碱基对错配, 从而影响 miR-499a 的功能<sup>[27]</sup>。以往有研究报道, 在头颈鳞状细胞癌中, miR-499 rs3746444 与癌症易感性同样具有相关性<sup>[28]</sup>。

	SNP ID	miRNA	Allele	样本量	人种	参考
		Gene				文献
Pre-miRNA	rs2910164	miR-146a	G/C	479/504	中国	16
	rs11614913	miR-196-a2	T/C	185/185	土耳其	17
				310/222	中国	21
				560/391	中国	22
	rs11134527	miR-218	A/G	302/513	中国	25
	rs3746444	miR-499	G/C	100/200	中国	27

Table 1. 与肝癌相关的 microRNA SNP 位点

4. 结论与展望

目前所报道的与肝癌易感性相关的 microRNA SNP 位点不多, 而且还存在着研究结果的差异性。如 Zhou Juan 等人的研究结果表明, miR-146a (rs2910164 G > C) 和 miR-499 (rs3746444 T > C) 与早期肝癌发生的危险性缺乏显著的相关性<sup>[29]</sup>; Hikmet Akkız 等人研究表明土耳其人 pre-microRNA-146a rs2910164 多态性与肝癌的易感性没有相关性<sup>[30]</sup>。因此, 目前的研究成果仍需要在不同人群或种族中进行更深一步的研究和证明。

随着 miRNA SNP 研究越来越多, 所发现的与癌症相关的 microRNA SNP 也越来越多。但是其 miRNA SNP 具体的调节机制尚未研究清楚。miRNA 多态性不仅影响 miRNA 的生物学功能, 而且可引起与细胞凋亡和增殖相关的基因的异常表达; 此外, miRNA 单核苷酸多态性也可会影响治疗疗效。因此, 对 microRNA 的深入研究, 确定 microRNA SNP 与疾病的诊断与预后的关系, 这将有助于肿瘤的诊断和临床治疗。

## 参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global Cancer Statistics[J]. CA-A CANCER JOURNAL FOR CLINICIANS, 2011,61(2):69-90.
- [2] Gomaa A I, Khan S A, Toledano M B, et al. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis[J]. World J Gastroenterol, 2008,14(27):4300-4308.
- [3] Chen C J, Lee M H. Early diagnosis of hepatocellular carcinoma by multiple microRNAs: validity, efficacy, and cost-effectiveness[J]. J Clin Oncol, 2011,29(36):4745-4747.
- [4] Zhou J, Yu L, Gao X, et al. Plasma MicroRNA Panel to Diagnose Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma[J]. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, 2011,29(36):4781-4788.
- [5] Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, et al. The role of site accessibility in microRNA target recognition[J]. Nat Genet, 2007,39(10):1278-1284.
- [6] Cai Y, Yu X, Hu S, et al. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2009,7(4):147-154.
- [7] Jiang J, Gusev Y, Aderca I, et al. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival[J]. Clin Cancer Res, 2008,14(2):419-427.
- [8] Iorio M V, Croce C M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review[J]. EMBO Mol Med, 2012,4(3):143-159.
- [9] Sun G, Yan J, Noltner K, et al. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function[J]. RNA, 2009,15(9):1640-1651.
- [10] 尤伟艳, 李锋. MicroRNA 的单核苷酸多态性与食管癌[J]. 临床与实验病理学杂志, 2011(7):758-760.
- [11] Duan R, Pak C, Jin P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA[J]. Hum Mol Genet, 2007,16(9):1124-1131.
- [12] Erichsen H C, Chanock S J. SNPs in cancer research and treatment[J]. Br J Cancer, 2004,90(4):747-751.
- [13] McLeod H L, Yu J. Cancer pharmacogenomics: SNPs, chips, and the individual patient[J]. Cancer Invest, 2003,21(4):630-640.

- [14]陈磊, 陈小平, 李元建. MicroRNA 及其作用靶点单核苷酸多态性研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2009(3):211-215.
- [15]Ryan B M, Robles A I, Harris C C. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010,10(6):389-402.
- [16]Xu T, Zhu Y, Wei Q K, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2008,29(11):2126-2131.
- [17]Akkiz H, Bayram S, Bekar A, et al. A functional polymorphism in pre-microRNA-196a-2 contributes to the susceptibility of hepatocellular carcinoma in a Turkish population: a case-control study[J]. *J Viral Hepat*, 2011,18(7):e399-e407.
- [18]Hu Z, Chen J, Tian T, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival[J]. *J Clin Invest*, 2008,118(7):2600-2608.
- [19]Hoffman A E, Zheng T, Yi C, et al. microRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis[J]. *Cancer Res*, 2009,69(14):5970-5977.
- [20]Peng S, Kuang Z, Sheng C, et al. Association of MicroRNA-196a-2 Gene Polymorphism with Gastric Cancer Risk in a Chinese Population[M]//Volume 55, Number 8. 55:2288-2293.
- [21]Li X D, Li Z G, Song X X, et al. A variant in microRNA-196a2 is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese patients with cirrhosis[J]. *Pathology*, 2010,42(7):669-673.
- [22]Qi P, Dou T H, Geng L, et al. Association of a variant in MIR 196A2 with susceptibility to hepatocellular carcinoma in male Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Hum Immunol*, 2010,71(6):621-626.
- [23]Kawasaki H, Taira K. MicroRNA-196 inhibits HOXB8 expression in myeloid differentiation of HL60 cells[J]. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 2004(48):211-212.
- [24]Luthra R, Singh R R, Luthra M G, et al. MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers[J]. *Oncogene*, 2008,27(52):6667-6678.
- [25]Zhang L S, Liang W B, Gao L B, et al. Association Between pri-miR-218 Polymorphism and Risk of Hepatocellular Carcinoma in a Han Chinese Population[J]. *DNA Cell Biol*, 2012,31(5):761-765.

- [26]Simion A, Laudadio I, Prevot P P, et al. MiR-495 and miR-218 regulate the expression of the Onecut transcription factors HNF-6 and OC-2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010,391(1):293-298.
- [27]Xiang Y, Fan S, Cao J, et al. Association of the microRNA-499 variants with susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Chinese population[M]//Volume 39, Number 6. 39:7019-7023.
- [28]Liu Z, Li G, Wei S, et al. Genetic variants in selected pre-microRNA genes and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. *Cancer*, 2010,116(20):4753-4760.
- [29]Zhou J, Lv R, Song X, et al. Association between two genetic variants in miRNA and primary liver cancer risk in the Chinese population[J]. *DNA Cell Biol*, 2012,31(4):524-530.
- [30]Akkiz H, Bayram S, Bekar A, et al. No association of pre-microRNA-146a rs2910164 polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma development in Turkish population: a case-control study[J]. *Gene*, 2011,486(1-2):104-109.

## 致谢

白驹过隙,我三年的硕士研究生生涯即将画上句号。在这三年的科研生活中,在我深爱的复旦校园里,有欢笑也有泪水,有付出也有收获,这一切的一切都将成为我今后人生之路的宝贵财富。我的成长和收获离不开我敬爱的老师、同学和朋友们,因为是他们给予我莫大的关心、支持和帮助,是他们见证我的蜕变。在此,向他们表示我最由衷的感谢。

首先,我要感谢我敬爱的导师刘杰教授,是他给予我进入我向往已久的复旦大学深造的通行证。这三年来,刘老师对我的悉心指导和敦敦教诲令我受益匪浅,将终生难忘。刘老师风度翩翩,温文尔雅,学识渊博,对待学生和蔼可亲,常常鼓励我们,让我们充满自信和解决困难的勇气。在我申请出国留学和找工作时,刘老师也给予我莫大的支持和帮助,非常感谢刘老师对我的关怀和厚爱。

其次,我要感谢现代人类学教育部重点实验室的王久存教授。王老师是一个治学严谨、工作勤勉的好导师,非常关心学生的健康成长。从2012年来到王老师实验室开展我的研究课题到如今已经接近两年了,王老师对于我的课题提出了很多有益的建议,使我的毕业课题得以顺利完成。王老师工作日程繁忙,却仍在百忙之中帮我写推荐信,令我感动万分。

再者,感谢张骏老师、杨冬琴老师和马彦云师兄在我的科研学习中提供的帮助。张骏老师对待工作特别认真、细致,而且非常敬业,是我今后工作学习的榜样。他不仅热心帮助我解决科研中遇到的难题,还指导我撰写论文和发表文章。杨冬琴老师的科研素养和实验技能高,同样在课题方向和实验技术方面给予我了很多建议,令我受益颇丰。马彦云师兄热爱科研,科研思维活跃,乐于探索新事物。在我刚进入实验室时,马师兄教我学会了细胞实验等技术,并对我的毕业课题的实验方案和开展提供了很多帮助。可以说,课题的完成离不开以上三位老师的指导和付出。

此外,我还要感谢三年来帮助过我的师兄师姐们。如张晓姣师姐待我如亲姐妹,帮助我解决问题,时常开导、安慰我。她活泼风趣、乐观开朗的性格也深深地影响了我,使我变得更加地外向和风趣。还有郭士成师兄、徐向红师姐在甲基化领域对我的帮助,吴利俊师姐、楚海燕师姐、刘庆梅师姐等对我的实验技术方面的指导,张会禄师兄在细胞和组织样本方面对我的帮助。是他们的协助,我才能顺利完成课题。非常幸运认识了马韵芳、章琦、赵现光和陈林硕,收获了美好的友谊,他们是我三年硕士生涯中浓墨重彩的一笔。还要感谢实验室的师弟师妹们——张熠彤、余顺吉、严凤阳、周敬茹、潘亦达、陈平等对我的关心,在此祝福他们幸福快乐,前途似锦!

三年的研究生涯更离不开我父母的支持和鼓励。那浓浓的亲情所承载的他们对我深深的爱，温暖着我，激励着我。是他们在背后默默地付出，是他们含辛茹苦地教育，才有今天即将毕业的我。他们是值得我用一辈子的时间去感恩和回报的人。在这里祝愿他们身体健康，永葆青春！

## 攻读学位期间发表论文

1. **Rui Wang\***, Jun Zhang\*, et al. Association study of miR-149 rs2292832 and miR-608 rs4919510 and the risk of hepatocellular carcinoma in a large-scale population. *Molecular Medicine Reports* 2014(已接收, \*共同第一作者)
2. Jun Zhang\*, **Rui Wang\***, et al. Association between the single nucleotide polymorphisms in miRNA196a-2 and miRNA146a and the susceptibility to hepatocellular carcinoma in Chinese population. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2013, 14(11): 6427-31(\*共同第一作者)
3. Yanyun Ma, **Rui Wang**, et al. Identification of miR-423 and miRNA-499 polymorphisms on affecting the risk of hepatocellular carcinoma in large-scale population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. (已接收)
4. 蔡敏, 李力, 王睿等。肿瘤替代组织端粒长度与消化系统肿瘤[J]. *胃肠病学*, 2012 年 12 期
5. **Rui Wang\***, Jun Zhang\*, et al. Association between a variant in microRNA-646 and susceptibility to hepatocellular carcinoma in a large-scale population. *The Scientific World Journal*. (审稿中)
6. Jun Zhang\*, **Rui Wang\***, et al. Association of miRNA-3144 variant with the susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. (审稿中)

### 论文独创性声明

本论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。论文中除了特别加以标注和致谢的地方外,不包含其他人或其它机构已经发表或撰写过的研究成果。其他同志对本研究的启发和所做的贡献均已在论文中作了明确的声明并表示了谢意。

作者签名: 王睿 日期: 2014.5.29

### 论文使用授权声明

本人完全了解复旦大学有关保留、使用学位论文的规定,即:学校有权保留送交论文的复印件,允许论文被查阅和借阅;学校可以公布论文的全部或部分内容,可以采用影印、缩印或其它复制手段保存论文。保密的论文在解密后遵守此规定。

作者签名: 王睿 导师签名: 285 日期: 2014.5.29