

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)07-0706-04

肝细胞癌中 ZHX2 基因启动子甲基化增强 AFP 的表达

吕自力¹, 杜杨君¹, 文剑明^{2*}¹广西医科大学第一附属医院病理科, 广西南宁 530021; ²中山大学附属第一医院病理科, 广东广州 510080

[摘要] 目的 探讨肝细胞癌中锌指和同源框 2 (ZHX2) 基因启动子甲基化表达与血清 AFP 水平的关系, 分析 AFP 基因的表达调控机制。方法 以 0.5、1.0 及 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 甲基化抑制剂 5-氮杂脱氧胞苷 (5-Aza-Dc) 培养人肝癌细胞株 HepG2, 采用 RT-PCR 及 Western blot 法检测用药前后 ZHX2 及 AFP 基因的 mRNA 和蛋白表达差异。运用甲基化特异性 PCR 检测肝细胞癌组织 38 例中 ZHX2 基因启动子表达情况, 分析其与血清 AFP 水平的关系。结果 HepG2 可见少量 ZHX2 mRNA 扩增, 未检测到 ZHX2 蛋白表达, 而 AFP 却高表达; 应用终浓度为 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 和 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 5-Aza-Dc 处理肝癌细胞 6 d, ZHX2 表达明显增加, 而 AFP 却表达下调。血清 AFP 高于 25 ng/mL 肝细胞癌组织中 ZHX2 启动子甲基化 51.6%, 明显高于血清 AFP 小于 25 ng/mL 组 ($P < 0.05$)。结论 ZHX2 基因启动子甲基化与 AFP 基因的表达有关。

[关键词] HepG2 细胞; 甲胎蛋白; 锌指和同源框 2; 甲基化

[中图分类号] R392.12, R735.7 **[文献标志码]** A

The methylation of ZHX2 gene promoter enhances AFP gene expression in hepatocellular carcinoma

LÜ Zili¹, DU Yangjun¹, WEN Jianming^{2*}¹Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021; ²Department of Pathology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between Zinc-fingers and homeoboxes 2 (ZHX2) promoter methylation and alpha-fetoprotein (AFP) gene expression, and analyze the mechanism of AFP gene expression. **Methods** HepG2 cell line was cultured with 0.5, 1.0 or 5.0 $\mu\text{mol/L}$ of 5-aza-deoxycytidine (5-Aza-Dc). RT-PCR and Western blotting were used to detect the expressions of ZHX2 and AFP in HepG2 cell line. Methylation-specific PCR was used to detect ZHX2 promoter methylation in 38 hepatocellular carcinoma tissues. **Results** The HepG2 cell line showed a low level of ZHX2 mRNA, negative expression of ZHX2 protein, but high expression of AFP at both mRNA and protein levels. After the HepG2 cells were treated with 1.0 or 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-Dc for 6 d, the expression of ZHX2 mRNA and protein increased and the expression of AFP mRNA and protein decreased. Among 38 hepatocellular carcinoma tissues, ZHX2 promoter methylation was found in 16 hepatocellular carcinoma tissues with AFP > 25 ng/mL in serum. No methylation of ZHX2 promoter was found in 8 hepatocellular carcinoma tissues with AFP < 25 ng/mL. **Conclusion** ZHX2 promoter methylation is closely related with AFP expression.

[Key words] HepG2; AFP; zinc-fingers and homeoboxes 2; methylation

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是东南亚地区常见恶性肿瘤, 甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP) 从妊娠 6 周开始由胚胎肝细胞及卵黄囊产生, 胎儿出生后 3 个月至第 2 年逐渐降至极低水平并保持终身, 当成人肝细胞发生再生或癌变时, 血清 AFP 含量会急剧增加, 因此 AFP 是目前最常用于 HCC 普

查、诊断、判断疗效和预测复发的敏感指标^[1]。我们既往的研究发现在 HCC 及肝癌细胞株 HepG2 中存在转录抑制因子锌指和同源框 2 (zinc-fingers and homeoboxes 2, ZHX2) 基因启动子甲基化, 进而导致其表达下调^[2]。为进一步探讨 ZHX2 基因启动子甲基化对 AFP 基因表达的影响, 本实验拟采用不同浓

收稿日期: 2012-12-27; 接受日期: 2013-01-25

基金项目: 广西青年科学基金 (0728057)

作者简介: 吕自力 (1974-), 女, 广西全州人, 副教授, 医学博士

Tel: 15907817634; E-mail: lvzili@yahoo.com.cn

* Corresponding author, 文剑明, E-mail: wenjm@mail.sysu.edu.cn

度去甲基化试剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-dexoy-cytidine, 5-Aza-Dc)处理 HepG2, 以 RT-PCR 及 Western blot 法检测后 ZHX2 基因及 AFP 基因表达情况, 并分析肝细胞癌组织中 ZHX2 基因启动子甲基化与血清 AFP 水平的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌 HepG2 细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库; 5-Aza-Dc 为 Sigma 公司产品; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司; RPMI1640 为 Gibco 公司产品, TRIzol Reagent 为 Invitrogen 公司产品; First Strand cDNA Synthesis Kit、Taq DNA 聚合酶及 dNTP 为 MBI 公司产品; ZHX2 多克隆抗体为 ABNOVA 公司产品; AFP 单克隆抗体(mAb)为 Zymed 公司产品; 小鼠抗人 β -actin mAb 购自武汉博士德公司; Phototope-HRP Western blot detection system (anti-mouse IgG, HRP-linked antibody)及 Western blot ECL 检测试剂盒为 Cell signaling 公司产品。组织 DNA 提取试剂盒 QIAamp DNA Mini Kit 购自 Omega Bio-tek D3495-01。PCR 引物由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞株及其培养 人肝癌细胞株 HepG2 用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基在 37℃、饱和湿度的 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养。培养细胞按 3×10^5 /瓶接种, 分别用 0.5、1.0 μ mol/L 及 5.0 μ mol/L 5-Aza-Dc 处理, 每 2 d 更换培养液, 6 d 后收集细胞。

1.2.2 cDNA 的制备 按 TRIzol Reagent 试剂说明书用总 RNA 提取液提取细胞的总 RNA, 用紫外分光光度计测所抽提 RNA 的浓度和纯度。按 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 说明合成 cDNA 第 1 链。

1.2.3 RT-PCR 检测 ZHX2 和 AFP mRNA 的表达 使用 Primer 5.0 软件设计跨内含子引物: AFP 上、下游引物序列分别为 5'-GT-TGCCAACTCAGTGAGGAC-3' 和 5'-AGCTTGGCA-CAGATCCTTA-3', 扩增片段长度为 240 bp; ZHX2 上、下游引物序列分别为: 5'-GGTAGCGACGAGAACCAG-3' 和 5'-AG-GACTTTG-GCACTATGAAC-3', 扩增片段长度为 389 bp; 内参 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogease) 上、下游引物序列分别为 5'-GCTGAGAACGG-GAAGCTTGT-3' 和 5'-GC-CAGGGGTGCTAAGCAGTT-3, 扩增片段长度为 299 bp。然后用以下体系正式进行 PCR 检测: 2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液、0.5 μ L 上游引物 (10 μ mol/L)、0.5 μ L 下游引物 (10 μ mol/L)、1 μ L Taq 酶 (1 U/ μ L)、1 μ L 模板 cDNA、补水至 25 μ L。ZHX2 反应条件为 94℃ 变性 5 min 后进行 34 个循环扩增: 94℃ 1 min、58℃ 1 min、72℃ 1 min; AFP 反应条件为 94℃ 变性 5 min 后进行 30 个循环扩增: 94℃ 1 min、59℃ 1 min、72℃ 1 min; GAPDH 反应条件为 94℃ 变性 5 min 后进行 28 个循环扩增: 94℃ 1 min、58℃ 1 min、72℃ 1 min。扩增产物等量 (7 μ L) 上样, 行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 采用凝胶成像系

统进行分析。

1.2.4 蛋白提取及 Western blot 法检测细胞 ZHX2 及 AFP 蛋白表达 肝癌细胞 HepG2 培养于 100 mL 培养瓶中, 待细胞长满, 用 4℃ 预冷的 1 \times PBS 洗涤细胞 3 次; 每瓶加入 200 μ L 蛋白裂解液 (50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, 10 mL/L Triton X-100, 1 mmol/L EDTA, 蛋白酶抑制剂, 高压双蒸水) 冰上放置 20 min, 用刮棒将细胞刮下; 将细胞碎片和裂解液移至 1.5 mL 离心管中, 4℃ 下 12 000 r/min 离心 20 min; 取上清, 加入 6 \times SDS 上样缓冲液 40 μ L, 煮沸 5 min。100 g/L SDS-PAGE 分离蛋白, 电转至硝酸纤维素膜, 用 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 分别按 1:1 000、1:5 000 及 1:1 000 加入小鼠抗人 AFP 抗体、小鼠抗人 ZHX2 抗体及小鼠抗人的 β 肌动蛋白抗体 4℃ 孵育过夜; 次日用 1 \times TBST 洗膜 10 min \times 3 次, 按 1:1 000 加入辣根过氧化物酶标记驴抗小鼠二抗孵育 1 h, 用 1 \times TBST 洗膜 10 min \times 3 次; 加入 ECL 发光液, 用 FUJI 公司 LAS3000 化学发光仪检测蛋白质条带。

1.2.5 甲基化特异性 PCR 检测肝细胞癌组织中 ZHX2 基因启动子甲基化表达情况 收集肝细胞癌新鲜组织 38 例, 采用 DNA 提取试剂盒, 提取组织 DNA, 经亚硫酸盐修饰, 使用在线软件 (<http://www.bion.com/experiment/tool2/60989.shtml>, Long-Cheng Li), 预测 ZHX2 启动子区 CG 二核苷酸富集区, 并根据其序列设计亚硫酸盐测序 PCR 引物, 引物序列为 ZHX2-U (非甲基化特异性引物): 5'-TTTATGTAAAGGGTTTT-GG-3' (约 413 nt) 和 5'-AACAACTATTAATCTTAACCACATA-3' (约 527 nt); ZHX2-M (甲基化特异性引物): 5'-CGTAT-AGTTTTACGTAAAGGGTTTCTGTATAGT-3' (约 414 nt) 和 5'-AACAACTATTAATCTTAACCACGTA-3' (约 528 nt); ZHX2-W (野生型引物): 5'-CGAGCCTTCTCATTATCATTC-3' (约 723 nt) 和 GTAACGGACTCGGTGGAAT-3' (约 316 nt)。反应体系为 2.5 μ L 10 \times PCR 缓冲液、0.5 μ L 上游引物 (10 μ mol/L)、0.5 μ L 下游引物 (10 μ mol/L)、1 μ L Taq 酶 (1 U/ μ L)、1 μ L 模板 cDNA、补水至 25 μ L。ZHX2 甲基化特异及非特异性引物反应条件为 95℃ 变性 5 min 后进行 35 个循环扩增: 95℃ 30 s、58℃ 45 s、72℃ 45 s。扩增产物等量 (7 μ L) 上样, 80 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 银染显色。ZHX2 野生型引物反应条件为 95℃ 变性 5 min 后进行 30 个循环扩增: 95℃ 30 s、60℃ 60 s、72℃ 60 s。扩增产物等量 (7 μ L) 上样, 行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 采用凝胶成像系统进行分析。

1.2.6 统计学分析 采用统计学软件 SPSS10.0 对两样本率的比较使用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-Aza-Dc 对 HepG2 细胞中 ZHX2 mRNA 及 AFP mRNA 表达的影响 RT-PCR 检测到 HepG2 细胞株有少量 ZHX2 mRNA 表达, 使用不同浓度 5-Aza-Dc 处理后, ZHX2 mRNA 表达量增加 (产物大小 389 bp); HepG2 细胞株可见 AFP mRNA 表达, 产物大小

240 bp, 使用不同浓度 5-Aza-Dc 处理后, AFP mRNA 表达下调。5-Aza-Dc 处理前后 HepG2 细胞 GAPDH mRNA (产物大小 299 bp) 表达无差异(图 1)。

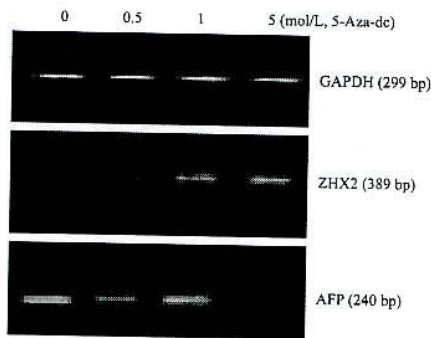


图 1 不同浓度 5-Aza-Dc 对 HepG2 细胞中 ZHX2 mRNA 及 AFP mRNA 表达的影响

2.2 5-Aza-Dc 对 HepG2 细胞中 ZHX2 及 AFP 蛋白表达的影响 Western blot 法可检测到 HepG2 细胞中 AFP 蛋白高表达, 却未检测到 ZHX2 蛋白表达, 用 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 5-Aza-Dc 处理细胞 6 d 后, 可以检测到 HepG2 细胞中有微量 ZHX2 蛋白表达, AFP 蛋白表达明显下调。

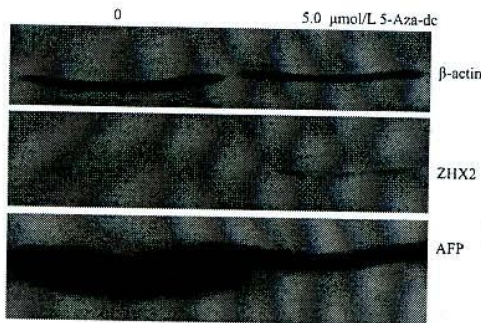
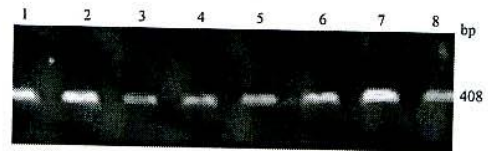


图 2 不同浓度 5-Aza-Dc 对 HepG2 细胞中 ZHX2 及 AFP 表达的影响

2.3 肝细胞癌组织中 ZHX2 基因启动子甲基化表达情况及其与患者血清 AFP 的关系

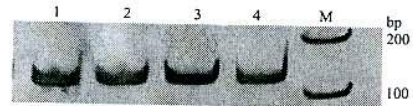
2.3.1 甲基化引物的设计 针对 ZHX2 启动子区上游 1 000 bp 序列使用在线软件分析 CG 分布情况, 选择 CG 二核苷酸富集区, 即 CpG 岛作为检测对象, 并针对该序列设计引物, 进行 PCR 扩增。该扩增片段包含 17CpG 序列。

2.3.2 甲基化特异性 PCR 扩增情况 所有未经过修饰 DNA 均可以被野生型引物扩增, 产物长度 408 bp(图 3)。修饰后的 38 例肝细胞癌组织 DNA, 有 16 例可被甲基化特异性引物扩增, 产物 115 bp(图 4)。



1~8: 编号为 1 至 8 的肝细胞癌组织。

图 3 野生型引物扩增结果, 所有未经过修饰的 DNA 均可被扩增



1~4: 编号为 3、7、20、32 的肝细胞癌组织。

图 4 ZHX2 甲基化特异性引物扩增情况(扩增产物 115 bp)

2.3.3 ZHX2 基因启动子甲基化与 AFP 关系 38 例肝细胞癌患者中, 血清 AFP > 25 ng/mL 组中 ZHX2 基因启动子甲基化高于血清 AFP < 25 ng/mL 组 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 ZHX2 基因启动子甲基化与血清 AFP 水平的关系

	ZHX2 甲基化(+)	ZHX2 甲基化(-)
AFP > 25 ng/mL	16*	14
AFP < 25 ng/mL	0	8

* $P < 0.05$ vs AFP < 25 ng/mL.

3 讨论

ZHX2 是新近发现的一转录抑制因子, 位于染色体 8q24.13, 含有 2 个锌指结构和 5 个同源结构, 编码的蛋白定位于细胞核内, 与核因子-YA (nuclear factor-YA, NF-YA) 结合^[3], 调节下游基因的表达, 参与多发性骨髓瘤^[4]、霍奇金淋巴瘤^[5]、胃肠道癌^[6-7]及肝细胞癌^[2]等多种恶性肿瘤的发生和发展。ZHX2 在肝细胞癌的发生和发展中有重要作用: 通过与 NF-YA 基因结合调节 cyclin A 和 E 基因的表达^[8], 影响细胞周期, 从而参与肝细胞癌发生和发展的早期阶段; 通过参与 AFP 基因的表达参与肝细胞癌的发生和发展^[9]。

本研究结果显示, 在肝细胞癌株 HepG2 中存在 ZHX2 基因启动子甲基化, 进而导致其 mRNA 仅有微量表达, 而无相应蛋白表达。表明基因启动子甲基化有沉默或抑制基因表达的作用。使用去甲基化试剂 5-Aza-Dc 培养肝癌细胞株 6 d 后, 发现 ZHX2 基因表达恢复, 表明 HepG2 中 ZHX2 基因的沉默与启动子甲基化密切相关。同时, 本研究还发现在 HepG2 中存在 AFP 基因大量表达, 而使用 5-Aza-Dc 培养肝癌细胞株 6 d 后, AFP 基因表达明显下调, 推测可能是 5-Aza-Dc 有抑制 AFP 基因表达的作用; 或 5-Aza-Dc 通过逆转 ZHX2 基因启动子甲基化而抑制 AFP 基

因的表达。后者与 Peterson 等^[9]及 Shen 等^[10]的研究结果相似。Peterson 等^[9]通过小鼠动物模型,发现 ZHX2 通过影响 P53 和 P73 基因的表达,参与 AFP 的表达;Shen 等^[10]通过 siRNA 等技术发现肝细胞癌株中 ZHX2 基因与 AFP 基因表达有相关性,但确切机制及通路尚未明了。本研究结果显示 ZHX2 基因启动子甲基化参与了 AFP 基因表达的调控,从而为探讨肝细胞癌中 AFP 基因重新表达提供了新的思路。

本研究通过采用甲基化特异性 PCR 检测人肝细胞癌组织中 ZHX2 基因启动子甲基化情况,设计的引物扩增区域包含 17 个 CpG,特异性高。所有未经修饰的肝细胞癌组织 DNA 均可以被野生型引物扩增,表明该序列的完整性。而修饰后的 DNA 均不能被野生型引物扩增,表明修饰成功。修饰后的 DNA 有 16 例可以被甲基化特异性引物扩增,表明 42.1% 肝细胞癌组织中存在 ZHX2 基因启动子甲基化。进一步统计还发现存在 ZHX2 基因启动子甲基化的患者血清中,AFP 值均高于 25 ng/mL;而血清 AFP 值不高者,均无 ZHX2 基因启动子甲基化,表明不仅在动物模型或在细胞株中,并且在肝细胞癌患者中,ZHX2 基因启动子甲基化与 AFP 基因的表达也存在密切关系。同时,本研究还发现在 ZHX2 基因启动子甲基化阴性的 22 例患者中,血清中 AFP 水平高于 25 ng/mL 仍有 68.1%,表明影响 AFP 基因表达的因素很多,有可能是众多基因共同参与的结果,也有可能是 ZHX2 基因通过多阶段、多途径调控的结果。

总之,本研究发现在肝细胞癌株和肝细胞癌患者中,ZHX2 基因启动子甲基化均影响了 AFP 基因的表达,尽管详细的机制尚未明确,但为探讨肝细胞癌的发生机制提供了实验依据,也为肝细胞癌的早期诊断及治疗提供新的靶点。

参考文献:

- [1] Kawaoka T, Aikata H, Murakami E, et al. Evaluation of the mRECIST and α -fetoprotein ratio for stratification of the prognosis of advanced-hepatocellular-carcinoma patients treated with sorafenib [J]. *Oncology*, 2012, 83(4): 192-200.
- [2] Lv Z, Zhang M, Bi J, et al. Promoter hypermethylation of a novel gene, ZHX2, in hepatocellular carcinoma [J]. *Am J Clin Pathol*, 2006, 125(5): 740-746.
- [3] Kawata H, Yamada K, Shou Z, et al. Zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) 2, a novel member of the ZHX family, functions as a transcriptional repressor [J]. *Biochem J*, 2003, 373(Pt3): 747-757.
- [4] Legartova S, Hamcarova-Horakova A, Bartova E, et al. Expression of RAN, ZHX-2, and CHC1L genes in multiple myeloma patients and in myeloma cell lines treated with HDAC and Dnmts inhibitors [J]. *Neoplasma*, 2010, 57(5): 482-487.
- [5] Nagel S, Schneider B, Meyer C, et al. Transcriptional deregulation of homeobox gene ZHX2 in Hodgkin lymphoma [J]. *Leu Res*, 2012, 36(5): 646-655.
- [6] 魏晶晶, 吕自力, 党裔武, 等. 结直肠癌中 ZHX2 蛋白表达的检测及其临床病理意义 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2012, 28(2): 128-130.
- [7] 陈其军, 吕自力, 党裔武, 等. 转录抑制因子 ZHX2 在胃癌组织中的表达及临床意义 [J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(30): 3163-3167.
- [8] Yue X, Zhang Z, Liang X, et al. Zinc fingers and homeoboxes 2 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and represses expression of Cyclins A and E [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(7): 1559-1570.
- [9] Peterson ML, Ma C, Spear BT. Zhx2 and Zbtb20: novel regulators of postnatal alpha-fetoprotein repression and their potential role in gene reactivation during liver cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2011, 21(1): 21-27.
- [10] Shen H, Luan F, Liu H, et al. ZHX2 is a repressor of alpha-fetoprotein expression in human hepatoma cell lines [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(6B): 2772-2780.

版权许可声明

本刊已许可中国学术期刊(光盘版)电子杂志社在中国知网及其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。作者向本刊提交文章发表的行为,均视为同意在本编辑部网站及 CNKI 中国期刊全文数据库等数据库出版,使用费不再另行支付。