



乙型肝炎病毒x蛋白通过靶向miR-200c诱导DNA异常甲基化

张媛悦^{1,2)} 王淑青³⁾ 刘岩^{4)*} 刘艳坤²⁾ 李玉辉⁵⁾ 李玉凤^{2)*}

(¹⁾ 华北理工大学研究生院, 唐山 063200; ²⁾ 唐山市人民医院肿瘤防治研究所中心实验室, 唐山 063000;

³⁾ 华北理工大学附属医院, 唐山 063200; ⁴⁾ 华北理工大学生命科学院, 唐山 063200; ⁵⁾ 唐山市人民医院神经外科, 唐山 063000)

摘要 乙型肝炎病毒x (hepatitis B virus x, HBx) 蛋白是导致肝癌 (hepatocellular Carcinoma, HCC) 的重要因素. 但HBx在HCC形成过程中表观遗传机制尚有待阐明. 本研究发现microRNA-200c (miR-200c) 在过表达乙型肝炎病毒的HCC中下调, 并且其直接靶向DNA甲基转移酶3A (DNA methyltransferase 3A, DNMT3A). 此外, miR-200c和DNMT3A在HB诱发的肝癌组织中呈现负相关. 乙型肝炎病毒诱导miR-200c下调, 进而引起DNMT3A表达上调, 导致细胞中肿瘤相关基因的启动子超甲基化. 我们对乙型肝炎病毒诱导的肝癌表观遗传学改变进行了进一步研究, 并提出一种基于miRNA的靶向治疗乙型肝炎病毒相关肝癌的潜在方法.

关键词 miR-200c, 肝癌, DNMT3A, 乙肝病毒

中图分类号 Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0009

肝癌是恶性程度极高的肿瘤, 在世界范围内, 肝癌的死亡率排名第三^[1]. 世界上超过50%的肝癌病例发生在中国. 慢性乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的感染是原发性HCC发生、发展的重要因素. 在中国, 超过80%的肝癌患者同时伴有乙型肝炎病毒的感染. HBV基因中最小开放阅读框编码的HBx蛋白在HCC发生发展中的作用日益受到重视^[2-4].

近年来的研究表明, 在细胞癌化的过程中, DNA甲基化、组蛋白修饰、microRNAs (miRNAs) 等表观遗传学的改变在肿瘤发生发展中起重要调控作用^[5]. DNA甲基转移酶 (DNA) 家族成员 (DNMT1、DNMT3A和DNMT3B) 的异常表达导致癌基因和抑癌基因DNA甲基化异常及染色体不稳定是包括HCC在内多种肿瘤发病过程中的早期事件^[6-7]. 此外, 已有报道显示在慢性肝炎或肝硬化的良性肝组织中发现DNMT的表达增加^[8].

最近研究报道, HBx蛋白通过甲基化肿瘤相关基因 (tumor-related genes, TRGs) 的启动子区DNA而导致这些基因沉默^[5-6]. 还有一项重要发现, 外源性HBx能够通过上调DNMT3A和/或DNMT1增强DNMT的活性^[9]. 这表明HBx可能通过DNMT参与HCC的发生发展, 但是其中详细机制仍然尚未明确.

MicroRNAs (miRNAs) 是一种短链和单链RNA分子, 通过与信使RNA的3'-非翻译区 (3'-UTR) 的不完全互补, 调节各种蛋白质编码基因的表达^[10]. 最近的研究表明, miRNAs可作为致癌基因或抑癌基因来促进或抑制癌变^[11-12]. 此外, 已有研究报道HBx在调节HBV相关HCC中miRNAs表达中的作用, 通过HBx诱导的DNA甲基化,

* 通讯联系人.

刘岩. Tel: 15324220508, E-mail: yanliu68@163.com

李玉凤. Tel: 15383055796, E-mail: yufeng_li@tsrmyy.cn

收稿日期: 2020-01-07, 接受日期: 2020-06-09

miRNAs的表达受到抑制^[13-14]. Pan等^[15]发现miR-21和miR-148a通过直接和间接靶向DNMT1促成狼疮CD4+T细胞DNA低甲基化.

因此, 我们假设miRNA可能是在HBV诱导的HCC过程中HBV和DNMT之间的信号. 本研究发现现在过表达HBx的HCC细胞中, miR-200c下调, 且miR-200c直接靶向DNMT3A. 另一方面, 在HBV诱导的HCC组织中下调miR-200c, 我们发现DNMT3A的表达增加. 此外, miR-200c的下调通过增加HBV相关HCC中的DNMT3A表达来促进DNA过度甲基化. 这为进一步阐明HBV诱导的HCC表观遗传学机制提供了基础依据.

1 材料和方法

1.1 细胞培养

正常人肝细胞系L02、肝细胞瘤细胞系Hep3B和HepG2以及HBV感染细胞系HepG2.2.15购自美国模式培养物集存库. Hep3B和HepG2细胞培养于含有10% FBS (Gibco BRL, 德国)的RPMI 1640 (Gibco-BRL, 德国)的培养基. 将L02和HepG2.2.15细胞培养在补充有10% FBS (Gibco-BRL, 卡尔斯鲁厄, 德国)的DMEM (金桥生物技术有限公司, 中国)中.

1.2 转染

Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 加拿大)用于瞬时转染. miR-200c的抑制剂和模拟物购北京博海通达生物科技有限公司(中国). 转染后24、48和72 h收集细胞.

1.3 免疫印迹

使用RIPA缓冲液(碧云天生物技术公司, 中国)制备细胞胞质蛋白质成分. 用于免疫印迹的抗体是HBx、 β -肌动蛋白和DNMT3A. 所有抗体均购自Santa Cruz Biotechnology (美国).

1.4 质粒

DNMT3A干扰和表达质粒由马立人教授(华北理工大学)友情提供. Ad-GFP和HBx-(Ad)-GFP的质粒由孙树勋教授(华北理工大学)友情提供. 使用逆转录病毒miR-Vec载体表达所有miRNA.

1.5 实时定量PCR (RT-PCR)

使用SYBR-Green PCR试剂盒(北京天根生化科技有限公司, 中国)进行定量RT-PCR, 并使用GAPDH作为对照. PCR引物的序列列于附件表S1中.

1.6 人体组织样本

本研究经唐山市人民医院医学伦理委员会批准. 收集唐山市人民医院2018年5月至2019年5月HCC患者样本(均获得患者知情同意书).

1.7 荧光素酶测定报告

将 4×10^3 个HeLa细胞接种到96孔板的每个孔中. 用终浓度为50 nmol/L的miR-200c模拟物或阴性对照RNA和10 ng质粒pmiR-RB-REPORTTM-DNMT3A-3'-UTR-WT或pmiR-RB-REPORTTM-DNMT3A-3'-UTR-MUT(北京博海通达生物科技有限公司, 中国)共转染细胞. 转染后48 h收集细胞, 并使用双荧光素酶报告基因检测系统

(Promega, 美国)进行分析. 将荧光素酶活性标准化为海肾荧光素酶活性. 转染成一式两份并在独立实验中重复至少3次.

1.8 甲基化特异性PCR法 (MSP)

使用DNA提取试剂盒(KG203, 天根生化科技, 中国)提取基因组DNA. 按照文献报道的方法进行MSP测定^[16]. PCR引物的序列列于附件表S2中.

1.9 MTT

将HepG2细胞(5×10^3 /孔)接种于96孔板中的RPMI 1640 (100 μ l/孔)中并孵育24 h. 使用Lipofectamine 2000瞬时转染质粒. 48 h后, 向每个孔中加入20 μ l MTT (5 g/L), 并将板在37°C下孵育4 h. 孵育后, 向每个孔中加入100 μ l二甲基亚砷以裂解细胞. 使用多孔分光光度计(Emax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA)在570 nm下测量吸光度.

1.10 Transwell迁移试验

使用具有8 μ m孔滤器的Transwell系统(Costar, Boston, MA)测定细胞迁移. 在用完全培养基填充下室后, 将0.5%无血清培养基中的 1×10^4 个细胞加载到上室中. 在37°C温育12 h后, 迁移到膜底部表面的细胞用甲醇固定, 用0.5%结晶紫染色并用显微镜检查. 用棉签除去膜顶表面上的细胞. 测量用乙酸洗涤的细胞 A_{570} 值.

1.11 统计分析

使用SPSS 19.0进行统计学分析. 结果表示为 $\bar{x} \pm s$ (SD), 并且重复实验至少3次. Pearson的相关性和Student's *t*检验用于分析数据. 如果 $P < 0.05$, 平均值之间的差异被认为在统计学上是有意义的.

2 结 果

2.1 表达HBx的HCC细胞中miR-200c表达量较低

为了确定HBx蛋白对miRNA表达的影响, 在人肝细胞系中检测了几种miRNA (miR-200c、miR-148a、miR-148b、miR-145、miR-146a和miR-223) 的表达水平. 在LO2和不同的肝癌细胞系, 包括Hep3B、HepG2和HepG2.2.15中, 发现, HepG2.2.15细胞中miR-200c水平显著低于亲本HepG2细胞以及LO2和Hep3B细胞 (图1a). 在这些细胞系中未观察到miR-148a、miR-148b、miR-

145、miR-146a和miR-223的显著变化. 这表明miR-200c可能是与表达HBx的肝癌细胞相关特异性miRNA.

为了检测miR-200c的表达是否通过HBx蛋白介导, 在亲本HepG2细胞转染表达HBx的腺病毒, 其标记有绿色荧光蛋白 (GFP) (Ad-GFP-HBx) 表达GFP的空质粒作为对照 (Ad-GFP). 与对照组的细胞相比 (图1b), 在用Ad-GFP-HBx感染的HepG2细胞中miR-200c水平显著下调. 而且, 转染HBx特异性siRNA的HepG2.2.15细胞中miR-200c水平显著增加 (图1c). 通过这些数据可以表明HBx是HCC中miR-200c表达的关键调节因子.

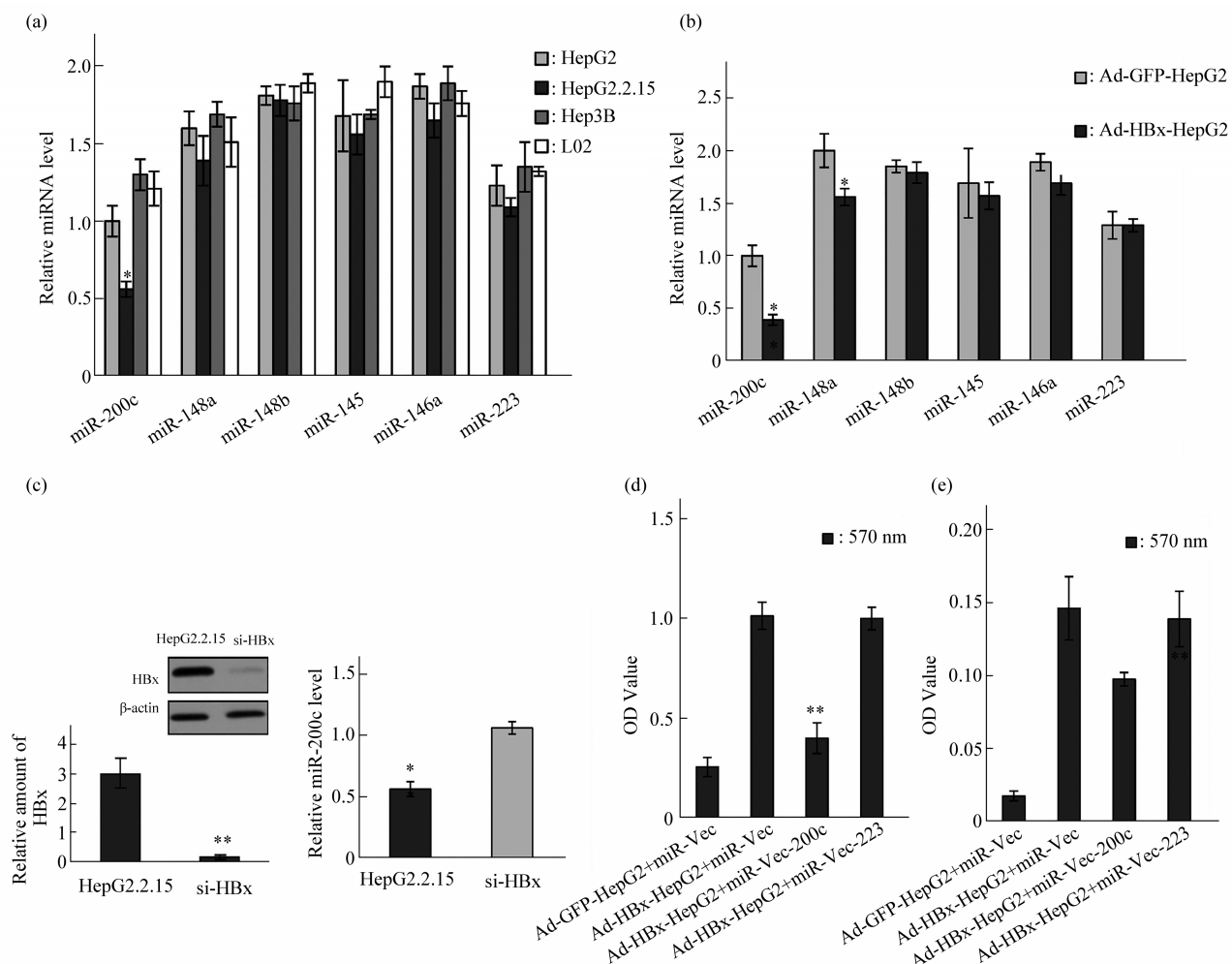


Fig. 1 MiR-200c is an important regulator in HBx-induced enhancement of HCC growth and migration

(a) The expression levels of miR-200c, miR-148a, miR-148b, miR-145, miR-146a and miR-223 were detected in human liver cell lines. (b) Parental HepG2 cells were transfected with green fluorescent protein-labeled adenovirus expressing HBx (Ad-GFP-HBx), and an empty plasmid expressing GFP was used as a control (Ad-GFP) to detect miR-200c, miR-148a, miR-148b, miR-145, miR-146a and miR-223 expression levels. (c) Detection of miR-200c level in HepG2.2.15 cells transfected with HBx-specific siRNA. (d) MTT method detects the proliferation ability of HepG2 cells co-transfected with Ad-HBx and miR-200c. (e) Transwell method detects the migration ability of HepG2 cells co-transfected with Ad-HBx and miR-200c. The above experiments were repeated three times independently, and the results are expressed as $\bar{x} \pm s$ deviation, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.2 过表达miR-200c逆转HBx诱导的HCC生物学变化

为了分析miR-200c对HBx感染的HCC致癌情况的影响, 分别通过MTT和Transwell法分析单独转染Ad-HBx及与miR-200c共转染HepG2细胞的增殖和迁移能力. 转染48 h后, 用miR-200c过表达的细胞增殖和迁移能力分别增加60% (图1d) 和49% (图1e). 在用miR-223共转染的细胞中未观察到明显变化. 这些结果表明, miR-200c是HBx诱导HCC生长和迁移增强的重要调节因子.

2.3 miR-200c调节HCC相关基因的启动子区甲基化

HBx蛋白有可能是通过调节HCC中DNA高甲基化来沉默TRGs的重要因子^[5]. 综上结果推测, HBx是miR-200c的负调节因子 (图2a), 而且我们认为miR-200c可能是HBx与TRGs甲基化水平调控的介质. 早期研究发现, 几种肿瘤相关基因在肝癌发生过程中受到DNA高甲基化调节, 包括*HIC1* (*hypermethylated in cancer 1*, *HIC1*)、细胞因子信号传导抑制因子1 (*suppressor of cytokine signaling*

1, *SOCS1*)、腺瘤性结肠息肉病相关基因 (*adenomatous polyposis coli*, *APC*)、*CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, *CDKN2A*)、*RASSF1* (*Ras association domain family 1A*, *RASSF1*) 和 *GSTP1* (*glutathione S-transferase pi 1*, *GSTP1*)^[17].

因此, 我们研究了在人HCC中miR-200c基因调控的作用. 分别用miR-200c抑制剂和miR-200c模拟物转染HepG2和HepG2.2.15细胞. 使用MSP测定*HIC1*、*SOCS1*、*APC*、*CDKN2A*、*RASSF1*和*GSTP1*的甲基化水平. 抑制miR-200c导致HepG2细胞中*HIC1*、*SOCS1*、*APC*和*CDKN2A*启动子的甲基化水平增加, 而HepG2.2.15细胞中miR200c的过表达导致4个启动子甲基化水平显著降低 (图2b). 在用miR-200c模拟物和抑制剂转染的细胞中, 没有观察到*GSTP1*和*RASSF1*启动子甲基化水平的显著变化. 我们的数据揭示了miR-200c在调节HCC细胞中*SOCS1*、*HIC1*、*APC*和*CDKN2A*基因在启动子甲基化中的作用.

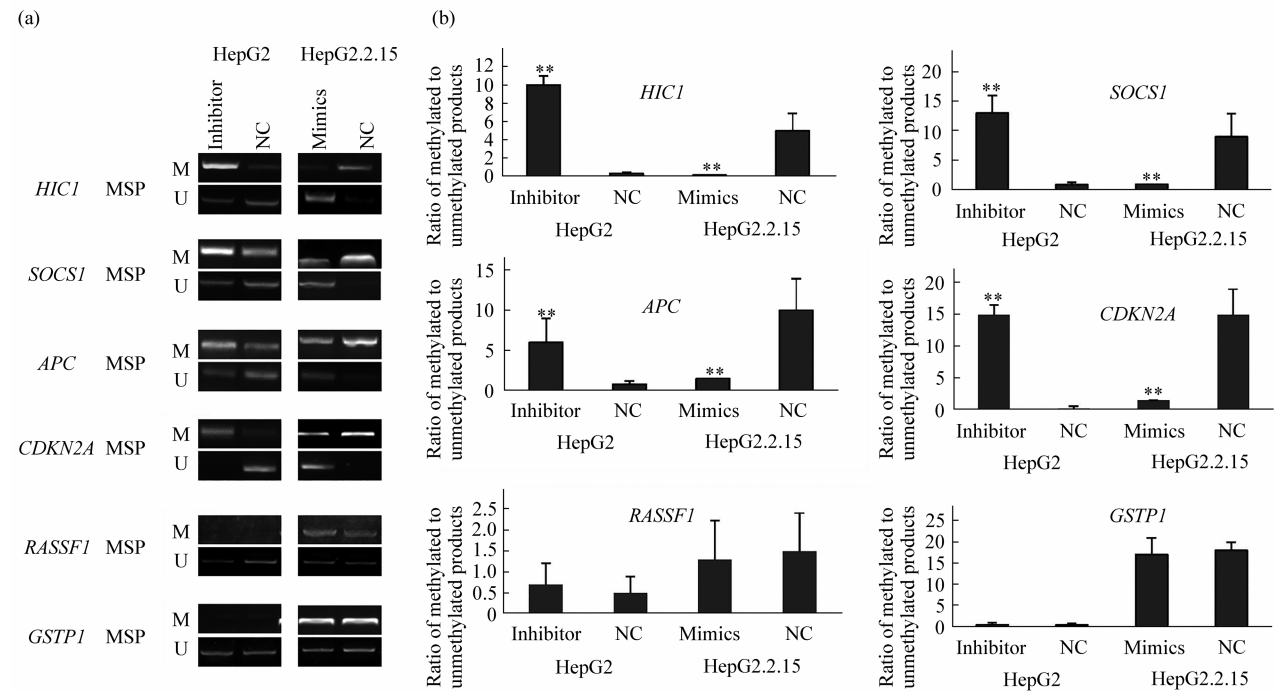


Fig. 2 miR-200c regulates promoter methylation status of tumor-related genes in HCC

The above experiments were repeated three times independently, and the results are expressed as $\bar{x} \pm s$ deviation, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 miR-200c参与调控HBx诱导的DNMT3A表达

已有研究表明DNMT3A在HCC和慢性肝炎中表达上调^[8]. HepG2.2.15细胞中DNMT3A的mRNA和蛋白质水平均显著高于HepG2细胞(图3a). 为了分析DNMT3A表达是否受HBx调节, 采用空miR-Vec和Ad-GFP载体、空miR-Vec和Ad-GFP-HBx、Ad-GFP-HBx和miR-200c, 分别转染HepG2细胞. 在Ad-GFP-HBx的HepG2细胞中DNMT3A的mRNA水平显著上调, 而在共转染Ad-GFP-HBx和miR-200c的细胞中表达水平恢复(图3b左). 在蛋白质水平也观察到DNMT3A类似

的变化(图3b右). 这些数据表明, HBx诱导的DNMT3A表达由miR-200c介导. 为了阐明DNMT3A是否也参与miR-200c的调节, 分别用表达DNMT3A的质粒, 靶向DNMT3A的siRNA、空质粒或乱序siRNA转染Hep3B和HepG2细胞. DNMT3A的敲低(图3c左)和过表达(图3c右)分别在转染si-DNMT3A和表达DNMT3A的表达质粒细胞中得到证实. 然而, DNMT3A的过表达和敲低均未影响miR-200c表达(图3d), 表明DNMT3A不是miR-200c的调节分子.

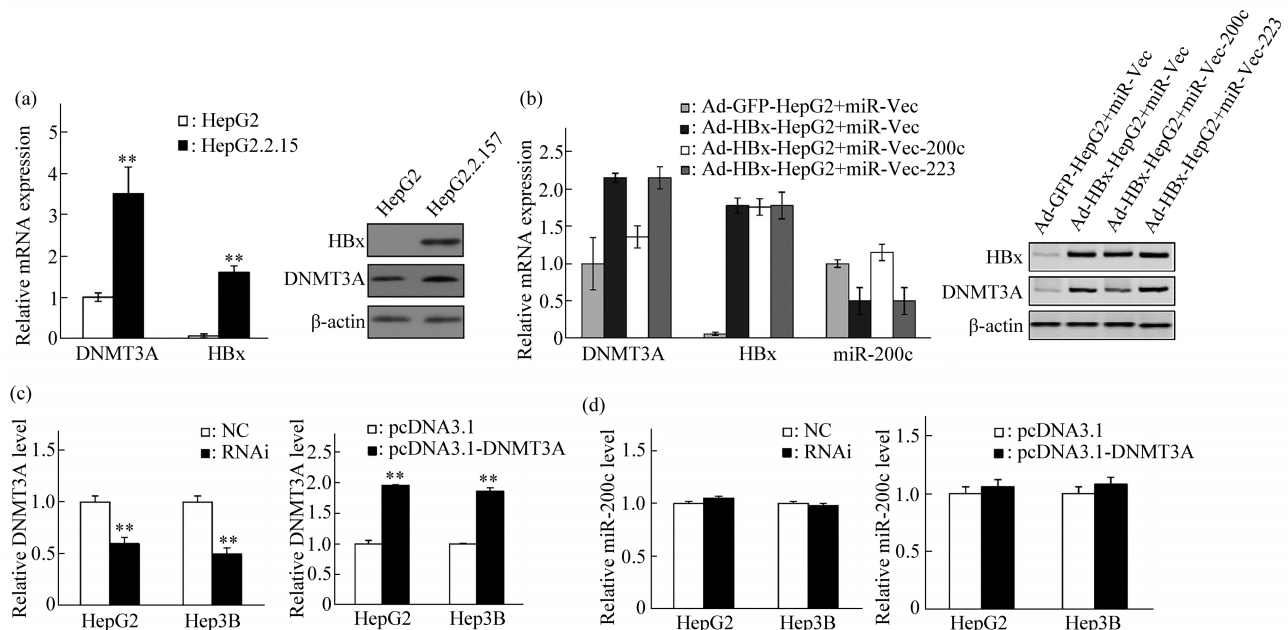


Fig. 3 miR-200c is a mediator in HBx-induced expression of DNMT3A

(a) mRNA and protein levels of DNMT3A and HBx in HepG2.2.15 cells and HepG2 cells. (b) 1) Empty miR-Vec and Ad-GFP vector, 2) Empty miR-Vec and Ad-GFP-HBx, 3) Ad-GFP-HBx and miR-200c were transfected into HepG2 cells respectively to detect the mRNA and protein levels of DNMT3A, HBx, miR-200c. (c, d) Transfect Hep3B and HepG2 cells with plasmids expressing DNMT3A, siRNA targeting DNMT3A, empty plasmids or scrambled siRNAs, and detect DNMT3A levels and miR-200c levels. The above experiments were repeated three times independently, and the results are expressed as $\bar{x} \pm s$ deviation, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.5 miR-200c直接靶向DNMT3A

使用miRanda和TargetScan预测程序进行靶标预测分析. DNMT3A可能是miR200c的作用靶基因, 因为DNMT3A mRNA中的3'UTR含有miR-200c种子序列的互补位点(图4a). 为了确定miR-200c是否是DNMT3A的直接调控因子, 在T细胞萤光素酶报告基因的下游克隆了一个含有突变或野生型(WT) miR-200c结合位点的DNMT3A 3'UTR片段(图4a). 与含有DNMT3A 3'UTR(WT)和乱序对照的报告质粒共转染的细胞相比,

用含有DNMT3A 3'UTR(WT)和miR-200c模拟物的报告质粒共转染的细胞和加扰对照中的萤光素酶活性显著降低(图4b). 在用含有突变体DNMT3A 3'UTR和miR-200c模拟物的报告质粒共转染的细胞中萤光素酶活性未改变(图4b). 这些结果表明, miR-200c通过与DNMT3A mRNA的3'UTR序列结合而抑制DNMT3A转录. 作为对照, 这些实验用DNMT3B和DNMT3C进行, 且没有发现显著差异(图4f).

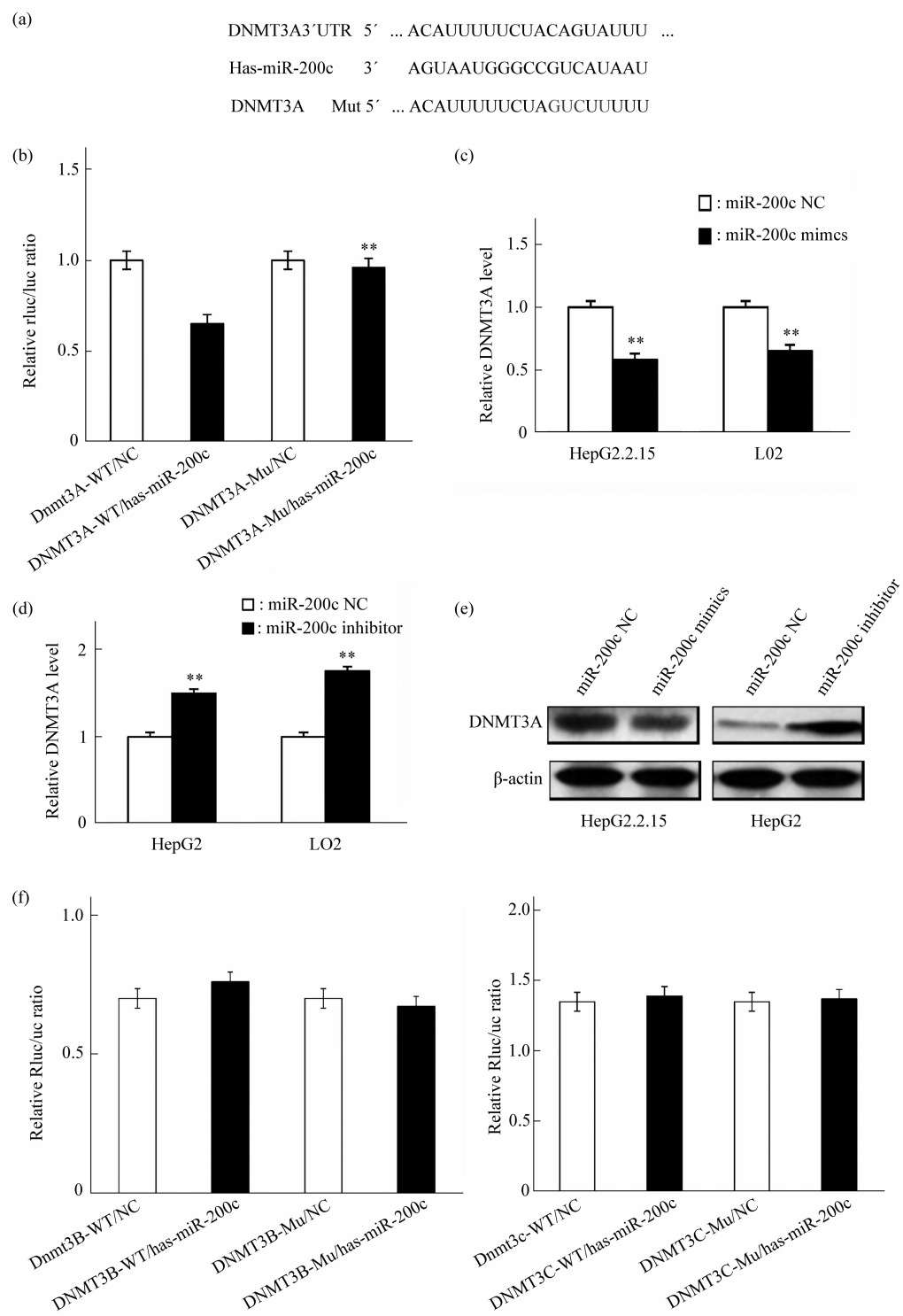


Fig. 4 miR-200c targets DNMT3A directly

(a) A DNMT3A 3'UTR fragment containing a mutant or wild-type (WT) miR-200c binding site was cloned downstream of the T cell luciferase reporter gene. (b) Co-transfect cells with a reporter plasmid containing DNMT 3A 3'UTR (WT) and miR-200c mimic and scramble the luciferase activity in the control. (c,e) Use miR-200c mimic Or scrambled miRNAs were transfected into HepG2.2.15 and L02 cells, and the mRNA and protein levels of DNMT3A were measured. (d, e) Overtransfection of miR200c inhibitor inhibits miR-200c in L02 and HepG2 cells, and measures the mRNA and protein levels of DNMT3A. (f) A control experiment with DNMT3B and DNMT3C. The above experiments were repeated three times independently, and the results are expressed as $\bar{x} \pm s$ deviation, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.6 miR-200c调节肝细胞中DNMT3A的表达

为了确定 miR200c 是否为 DNMT3A 的上游调节分子, 用 miR-200c 模拟物或乱序 miRNA 转染 HepG2.2.15 和 L02 细胞, 并使用 RT-PCR 测定 DNMT3A 表达. 结果表明, miR-200c 的过表达导致 DNMT3A mRNA 水平以及转染后 48 h 的蛋白质水平显著降低 (图 4c, e). 此外, 通过转染 miR200c

抑制剂, 抑制 L02 和 HepG2 细胞中的 miR-200c 提高了 DNMT3A 的 mRNA 和蛋白质水平 (图 4d, e). 这些数据表明 miR-200c 是正常和恶性肝细胞中 DNMT3A 的上游负调分子. 作为对照, 这些实验也用 DNMT3B 和 DNMT3C 进行, 但没有发现显著差异 (图 5a, b, c).

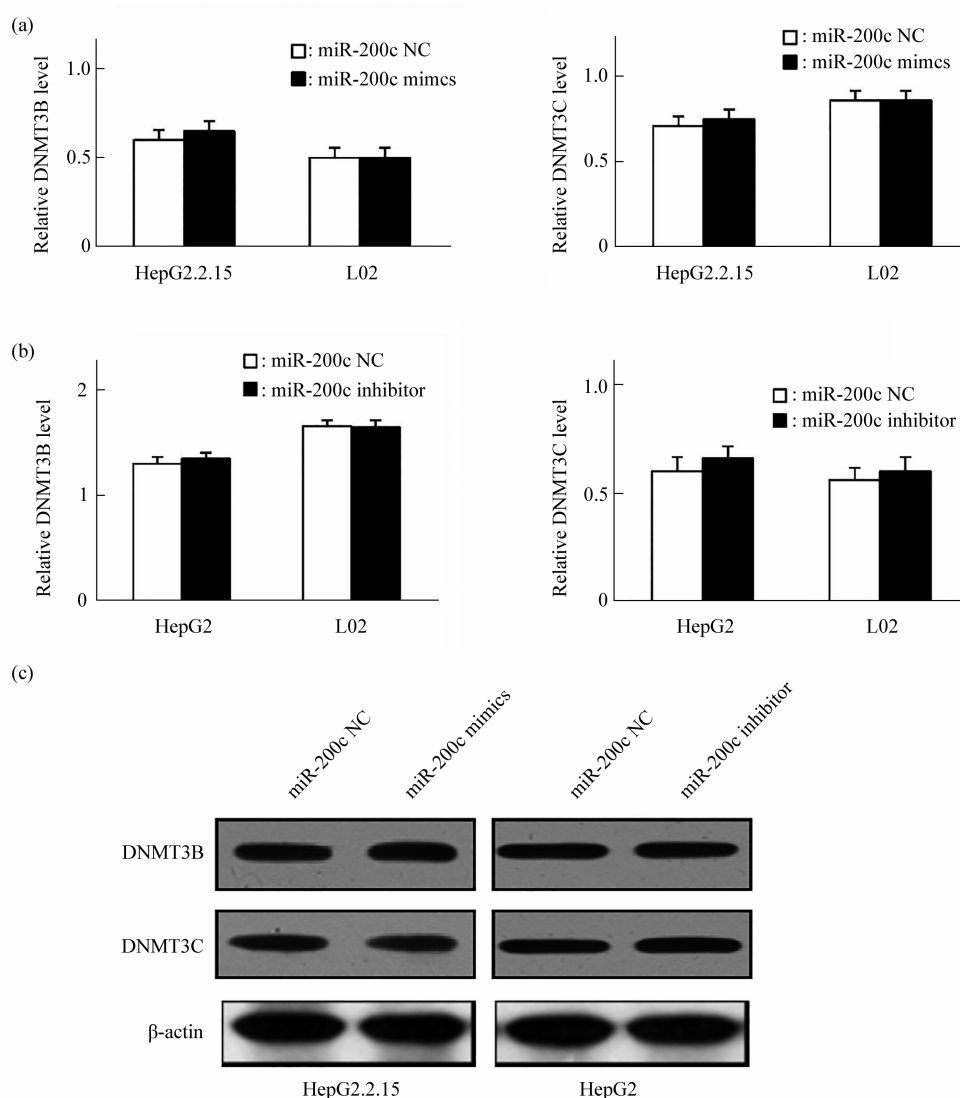


Fig. 5 Control experiments at DNMT3B and DNMT3C

3 讨 论

一些肿瘤相关基因的异常表达部分通过表观遗传机制介导^[18]. 虽然基因启动子的异常 DNA 超甲基化在病毒相关恶性肿瘤中是常见的, 包括 HBV 相关的 HCC, 但与病毒相关恶性肿瘤的表观遗传

机制尚未得到充分的研究. 越来越多的证据表明, 病毒蛋白在调节 DNA 甲基化中起着重要的作用^[19]. 在 HBV 诱导的肝癌中, HBx 可能是调节 DNA 甲基化的关键因素^[20]. 早期研究揭示 HBx 水平与 TRGs 的表观遗传调节之间的显著相关性, 包括 *HIC1*、*SOCS1*、*APC*、*CDKN2A*、*RASSF1* 和

GSTP1^[21]. 然而, HBV 诱导的 DNA 甲基化变化的机制仍不清楚. 本研究揭示了 HBx 介导的 miR-200c 低表达通过直接上调 DNMT3A 促进 HCC 中 *CDKN2A*、*APC*、*SOCS1* 和 *RASSF1* 的启动子高甲基化.

与癌旁组织相比, 在 HBV 相关 HCC 患者的肿瘤样品中观察到 miR-200c 表达降低, 表明 miR-200c 可能在 HBV 诱导的肝癌发生中发挥作用. 我们观察到这些肿瘤样品中 miR-200c 降低与 DNMT3A 表达增加呈负相关. DNMT3A 诱导的人肿瘤 CpG 岛异常 DNA 甲基化与肿瘤抑制基因在癌变过程中的转录抑制密切相关^[22].

除肝癌外, miR-200c 在卵巢肿瘤、非小细胞肺癌中下调, 低 miR-200c 与预后不良相关^[23-24]. miR-200c 有可能成为胃癌患者病情进展和病患存活的预测因子^[25]. miR-200c 的调节可作为抑制结肠癌转移的治疗工具^[26].

总之, 我们的数据为理解 HBx 蛋白的功能及其在 HCC 肿瘤发生中的作用提供了新的认识, 并发现了 miR-200c 在肿瘤发生中的重要作用. miR-200c 可能是 HBV 诱导的 HCC 治疗新靶点, 为肝癌的治疗诊断研究提供新思路.

附件 20200009_表 S1、表 S2 见本文网络版(<http://www.cnki.net> 或 <http://www.pibb.ac.cn>).

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al.* Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011, **61**(2): 69-90
- [2] Kim C M, Koike K, Saito I, *et al.* HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature*, 1991, **351**(6324): 317-320
- [3] Wang Y L, Cui F, Lv Y X, *et al.* HBsAg and HBx knocked into the p21 locus causes hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* (Baltimore, Md), 2004, **39**(2): 318-324
- [4] Paterlini P, Poussin K, Kew M, *et al.* Selective accumulation of the X transcript of hepatitis B virus in patients negative for hepatitis B surface antigen with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* (Baltimore, Md), 1995, **21**(2): 313-321
- [5] Novak K. Epigenetics changes in cancer cells. *MedGenMed*, 2004, **6**(4): 17
- [6] Robertson K. D. DNA methylation and human disease. *Nat. Rev. Genet*, 2005, **6**(8): 597-610
- [7] Cécile D, Mounir E M, Tom G, *et al.* Combined analysis of DNA methylation and cell cycle in cancer cells. *Epigenetics*, 2015, **10**(1): 82-91
- [8] Choi M S, Shim Y H, Hwa J Y, *et al.* Expression of DNA methyltransferases in multistep hepatocarcinogenesis. *Hum. Pathol*, 2003, **34**(1): 11-17
- [9] Park I Y, Sohn B H, Yu E, *et al.* Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein. *Gastroenterology*, 2007, **132**(4): 1476-1494
- [10] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281-297
- [11] Anuradha B, Hu L J, Marshonna F, *et al.* Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2008, **47**(3): 897-907
- [12] Dong Q C, Meng P, Wang T, *et al.* MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo* by targeting E2F2 and CCND2. *Plos One*, 2010, **5**(4): e10147
- [13] Wei X F, Tan C, Tang C Y, *et al.* Epigenetic repression of miR-132 expression by the hepatitis B virus x protein in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Cellular Signalling*, 2013, **25**(5): 1037-1043
- [14] Chen J J, Tang Y S, Huang S F, *et al.* HBx protein-induced upregulation of microRNA-221 promotes aberrant proliferation in HBV-related hepatocellular carcinoma by targeting estrogen receptor- α . *Oncol. Rep*, 2015, **33**(2): 792-798
- [15] Pan W, Zhu S, Yuan M, *et al.* MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4⁺ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md: 1950), 2010, **184**(12): 6773-6781
- [16] Qian T, Lode J S, Jie Y, *et al.* Methylation status of the Epstein-Barr virus major latent promoter C in iatrogenic B cell lymphoproliferative disease. *The American Journal of Pathology*, 1999, **155**(2): 619-625
- [17] Nishida N, Kudo M, Nagasaka T, *et al.* Characteristic patterns of altered DNA methylation predict emergence of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2012, **56**(3): 994-1003
- [18] Ichimura N, Shinjo K, An B, *et al.* Aberrant TET1 methylation closely associated with CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Cancer Prevention Research* (Philadelphia, Pa), 2015, **8**(8): 702-711
- [19] Li H P, Leu Y W, Chang Y S. Epigenetic changes in virus-associated human cancers. *Cell Research*, 2005, **15**(4): 262-271
- [20] Zheng D L, Zhang L, Cheng N, *et al.* Epigenetic modification induced by hepatitis B virus X protein *via* interaction with *de novo* DNA methyltransferase DNMT3A. *Journal of Hepatology*, 2009, **50**(2): 377-387
- [21] Formosa A, Lena A M, Markert E K, *et al.* DNA methylation silences miR-132 in prostate cancer. *Oncogene*, 2013, **32**(1): 127-134

- [22] Jones P A, Baylin S B. The epigenomics of cancer. *Cell*, 2007, **128**(4): 683-692
- [23] Cittel D M, Dimitrova I, Howe E N, *et al.* Restoration of miR-200c to ovarian cancer reduces tumor burden and increases sensitivity to paclitaxel. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2012, **11**(12): 2556-2565
- [24] Paolo C, Giridhar M, Regalla K, *et al.* Loss of miR-200c expression induces an aggressive, invasive, and chemoresistant phenotype in non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer Research*, 2010, **8**(9): 1207-1216
- [25] Manuel V A, Margarita R, Vanessa M-V, *et al.* Circulating miR-200c as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *Journal of Translational Medicine*, 2012, **10**(1): 186
- [26] Ling C M, Sen L L, Kang W X. miR-200c inhibits invasion and migration in human colon cancer cells SW480/620 by targeting ZEB1. *Clinical & Experimental Metastasis*, 2012, **29**(5): 457-469

Hepatitis B Virus x Protein Induces Aberrant DNA Methylation by Targeting miR-200c

ZHANG Yuan-Yue^{1,2)}, WANG Shu-Qing³⁾, LIU Yan^{4)*}, LIU Yan-Kun²⁾, LI Yu-Hui⁵⁾, LI Yu-Feng^{2)*}

¹⁾Graduate School of North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, China;

²⁾Central Laboratory of Cancer Research Institute of Tangshan People's Hospital, Tangshan 063000, China;

³⁾North China University of Science and Technology School Clinic, Tangshan 063200, China;

⁴⁾School of Life Science, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, China;

⁵⁾Department of Neurosurgery, Tangshan People's Hospital, Tangshan, 063000, China)

Abstract The hepatitis B virus x (HBx) protein has been implicated in the pathogenesis of HBV-associated hepatocellular carcinoma (HCC). The mechanisms of HBx involved in epigenetic changes during hepatocarcinogenesis are still obscure. We report here that microRNA-200c (miR-200c) was downregulated in HBV-expressing HCC cells and it targeted DNMT3A directly. In addition, an inverse correlation between miR-200c and DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) was founded in HBV-induced HCC tissues. HBV-induced downregulation of miR-200c upregulated DNMT3A expression, and then resulted in promoter hypermethylation of tumor-related genes in HCC. Our data supplied an epigenetic insight into HBV-induced HCC and identified a potential miRNA-based targeted approach for treating HBV-related HCC.

Key words miR-200c, HCC, DNMT3A, HBV

DOI: 10.16476/j.pibb.2020.0009

* Corresponding author.

LIU Yan. Tel: 86-15324220508, E-mail: yanliu68@163.com

LI Yu-Feng. Tel: 86-15383055796, E-mail: yufeng_li@tsrmyy.cn

Received: January 7, 2020 Accepted: June 9, 2020