

BORIS 通过表观修饰对人肝癌细胞 SOCS3 表达的调控*

何靖炀¹, 刘秋英¹, 魏玲¹, 刘中建¹, 黄元¹, 俞小琴¹, 李波², 覃扬^{1△}

1. 四川大学华西基础医学与法医学院 生物化学与分子生物学教研室(成都 610041);

2. 四川大学华西医院 肝脏与肝移植外科(成都 610041)

【摘要】 目的 探讨人肝癌细胞系中印记位点结合因子(BORIS)对细胞因子信号传导抑制因子-3(SOCS3)表达的调控方式。方法 通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 SOCS3 mRNA 在肝癌细胞中的表达; Western blot 检测敲低和过表达 BORIS 的肝癌细胞中 SOCS3 蛋白的表达; 在敲低和过表达 BORIS 的肝癌细胞系中使用甲基化特异性 PCR(MSP-PCR), 检测 SOCS3 基因启动子区域甲基化状态; 通过 UCSC 数据库分析, 找到 SOCS3 基因启动子区潜在的 BORIS 结合位点, 使用染色质免疫共沉淀(ChIP)-实时定量 PCR(ChIP-qPCR)探索内源性高表达 BORIS 细胞中 BORIS 在 SOCS3 启动子区的富集状况; 通过 ChIP-qPCR 检测敲低和过表达 BORIS 对 SOCS3 启动子区组蛋白甲基化状态。结果 在肝癌细胞中 SOCS3 mRNA 表达较高, 在敲低或过表达 BORIS mRNA 肝癌细胞中, SOCS3 蛋白表达相应下调或上调, 即在肝癌细胞中 BORIS 以正向调控的方式调控 SOCS3 蛋白质的表达; MSP-PCR 实验显示在 SMMC-7721 和 HepG2 细胞 SOCS3 启动子为非甲基化, 敲低 BORIS 不改变甲基化状态, Huh7 细胞的 SOCS3 启动子区为甲基化状态, 过表达 BORIS 后, SOCS3 启动子区转变为非甲基化状态, 但在 HCCLM3 中 SOCS3 启动子为非甲基化, 过表达 BORIS 不影响甲基化状态; ChIP-qPCR 表明在内源性高表达 BORIS 的细胞中, BORIS 特异性结合在 SOCS3 启动子区; 组蛋白甲基化检测结果表明, 敲低 BORIS 减少了 BORIS 在 SOCS3 启动子区富集, 同时减少该区域 H3K4 me2, 增加 H3K27 me3, 而在过表达 BORIS 的细胞中呈现相反的结果。结论 BORIS 作为一个表观遗传调控因子调控 SOCS3 基因启动子区的甲基化状态和组蛋白甲基化修饰, 影响 SOCS3 的表达, 进而参与肝癌发生发展的过程。

【关键词】 肝癌 BORIS SOCS3 表观遗传

BORIS Regulates SOCS3 Expression Through Epigenetic Mechanisms in Human Hepatocellular Carcinoma Cells HE Jing-yang¹, LIU Qiu-ying¹, WEI Ling¹, LIU Zhong-jian¹, HUANG Yuan¹, YU Xiao-qin¹, LI Bo², QIN Yang^{1△}. 1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Liver and Liver Transplantation Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: qin_1@sina.com

【Abstract】 **Objective** To study the regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) expression by the brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) in hepatocellular carcinoma cell. **Methods** The expression of SOCS3 mRNA in HCC cell lines was detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The expression of SOCS3 protein in knockdown and overexpression BORIS of HCC cell lines was tested by Western blot. The SOCS3 gene promoter methylation status in the knockdown and overexpression BORIS of hepatocarcinoma cell lines was detected by using methylation specific PCR (MSP-PCR) method. The potential BORIS binding site of SOCS3 promoter region was found by UCSC database analysis. The enrichment of BORIS in SOCS3 promoter region in endogenous high expression BORIS of HCC cells was evaluated by using chromatin immunoprecipitation (ChIP)-qPCR (ChIP-qPCR). The SOCS3 promoter region histone methylation status in the knockdown and overexpression BORIS of HCC was detected by ChIP-qPCR. **Results** The expression of SOCS3 mRNA in hepatocellular carcinoma cells was higher and SOCS3 protein expression was down-regulated or up-regulated in the knockdown or overexpression of BORIS mRNA hepatocarcinoma cells, so BORIS has a positive regulatory effect on SOCS 3 protein expression in hepatocarcinoma cells. MSP - PCR experiments showed that the SOCS 3 promoter in

* 国家自然科学基金(No. 81172372)资助

△ 通信作者, E-mail: qin_1@sina.com

SMMC-7721 and HepG2 cells was unmethylated and knockdown of *BORIS* did not change the methylation status; the *SOCS3* promoter region of Huh7 cells was methylated; after overexpression of *BORIS*, the *SOCS3* promoter region was changed to an unmethylated state; the *SOCS3* promoter was unmethylated in HCCLM3, overexpression of *BORIS* did not alter the methylation status. The ChIP-qPCR assay demonstrated that *BORIS* specifically binds to the *SOCS3* promoter region in HCC cells with high expression of *BORIS*. Histone methylation assay indicated that knockdown of *BORIS* reduced *BORIS* enrichment in the *SOCS3* promoter region, with decreasing H3K4 me2 and increasing H3K27 me3 in the region of histone, whereas the overexpress *BORIS* in HCC cells showed the opposite situation. **Conclusion** *BORIS* plays a role of epigenetic regulation on *SOCS3* gene promoter methylation and histone methylation, modulating the expression of *SOCS3*, and then involved in the development of hepatocellular carcinoma.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma *BORIS* *SOCS3* Epigenetic

肝细胞肝癌(HCC)是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,在癌症导致的相关死亡中排名第三^[1],大约有一半左右的 HCC 出现在中国^[2]。现在认为肝癌的发生发展通常是多种因素参与的结果,如遗传、表观遗传和环境因素之间相互作用^[3],但其确切的分子机制尚不清晰。目前,许多研究发现表观遗传改变参与了肿瘤的发生与发展,特别是 DNA 甲基化状态和组蛋白修饰的改变。已有研究报道,异常的基因启动子甲基化和组蛋白乙酰化参与了肝癌的进程^[4-5]。

在许多肿瘤发生发展过程中,出现了 JAK 激酶与信号转导子和转录激活子(STAT)信号通路即 JAK-STAT 信号通路的异常。作为 JAK-STAT3 信号通路下游的靶基因,细胞因子信号传导抑制因子-3(*SOCS3*)能够负反馈调节信号因子通路,在防止 STAT3 过度激活中扮演着重要的角色^[6]。目前,许多研究发现,*SOCS3* 在肿瘤的发生中呈现抑癌基因的功能,包括乳腺癌、肝癌等^[7-8],但也有相反的研究发现^[9],*SOCS3* 在肾细胞癌中能够增加肿瘤的侵略性,表现出较差的预后。研究显示,在一些肿瘤中,*SOCS3* 基因启动子区域 CpG 岛频繁发生甲基化,导致 *SOCS3* 表达下调,进一步促使细胞过度增殖、抗凋亡、增加迁移和侵袭能力,导致患者预后较差^[10-12]。印记位点结合因子(*BORIS*)也称为 CCCTC 结合因子蛋白(CCCTC-binding factor-like, CTCFL),是一种锌指蛋白,与多功能转录因子(CTCF)同源,属于肿瘤-睾丸相关抗原(CAT)家族成员,通常在正常睾丸组织中高表达^[13],在其他正常组织中表达量极低或者不表达,但在多种肿瘤组织中有较高的表达量^[14-17],被认为是一种癌基因的候选者。*BORIS* 和 CTCF 在 11 个相似的锌指结构中存在较高的同源性(同源性超过 70%),表明它们之间能够结合相同或相似的靶基因序列;但二者在

N 端和 C 端的同源性较低(同源性小于 18%),表明它们靶向不同的蛋白从而表现出不同的生物学功能^[18]。有研究发现 *BORIS* 可以作为一个调控因子,调控肿瘤相关基因的表达,例如跨膜受体蛋白 NOTCH3^[19] 和上池蛋白 SBSN^[20] 等。

本研究通过检测在 *BORIS* 敲低和过表达的几种肝癌细胞株中 *SOCS3* 的表达状况,观察细胞中 *SOCS3* 近端启动子 DNA 甲基化状态和 *BORIS* 的表达变化对 *SOCS3* 启动子区域组蛋白甲基化修饰的影响,从而探索 *BORIS* 调控 *SOCS3* 表达的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株与主要试剂

A 组:人肝癌细胞株 SMMC-7721、HepG2、Huh7、HCCLM3 均购于中科院上海细胞库;B 组:稳定性敲低 *BORIS* mRNA (*shBORIS1*、*shBORIS2*、质粒对照 *shCtrl*)的 SMMC-7721 和 HepG2 细胞株(各两株),以及过表达 *BORIS*(*overBORIS*、质粒对照 *over-Ctrl*)的 Huh7 和 HCCLM3 细胞株均为本实验室前期研究建立并保种。健康人胎盘组织来自四川大学华西第二医院妇产科。DMEM 培养基购于 Gibco 公司;胰酶购于 Hyclone 公司;RNA 提取试剂盒购于 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒购于 TaKaRa;EvaGreen 2 × qPCR MasterMix 购于 Abm 公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 Protein A+G Agarose 均购于 Beyotime 公司;兔抗 *SOCS3* 抗体、兔抗 *BORIS* 抗体、兔抗 H3K4 me2 抗体和鼠抗 H3K27 me3 抗体均购于 Abcam 公司;基因组 DNA 提取试剂盒购于 TIANGEN 公司;甲基化修饰试剂盒购于 ZYMO RESEARCH 公司。

1.2 方法

1.2.1 人肝癌细胞株的培养 常规复苏培养细胞,

并消化传代,待细胞生长状况良好并处于对数期时,进行后续相关实验。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测肝癌细胞 SOCS3 mRNA 水平 收集培养的 A 组肝癌细胞, Trizol 法提取细胞总 RNA,检测 RNA 纯度与浓度。用逆转录试剂盒逆转录得到 cDNA,与 EvaGreen 2 × qPCR MasterMix 混合,并在 Real-Time PCR 检测系统上进行扩增。SOCS3 引物, F: 5'-TCTGTCGGAAGACCGTCAAC-3', R: 5'-GGTCCAGGAAGTCCCAGTATG-3', 扩增产物长度为 84 bp^[21]。内参 GAPDH 引物, F: 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3', R: 5'-TTGATTTTGAGGGATCTCG-3', 扩增产物长度为 238 bp。引物由上海生物工程有限公司合成。PCR 扩增反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 次循环, 72 °C 延伸 5 min。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 相对表达量。

1.2.3 Western blot 检测肝癌细胞 SOCS3 蛋白的表达 采用 RIPA 裂解液处理培养的 B 组肝癌细胞,提取细胞总蛋白,用 BCA 法检测蛋白含量。常规 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳法检测蛋白,最后用 ELC 化学曝光法在凝胶成像系统中显影成像并分析,以目的蛋白与内参蛋白 α -Tubulin 灰度值的比值为目的蛋白的相对表达量。

1.2.4 肝癌细胞 DNA 提取与亚硫酸氢盐修饰 使用基因组 DNA 提取试剂盒提取 A 组和 B 组细胞基因组 DNA,电泳检测 DNA 质量,并用 NanoDrop 对其进行定量。使用甲基化试剂盒对 DNA 模板进行亚硫酸氢盐修饰,含 500 ng DNA 的溶液 20 μ L 与 130 μ L 的反应试剂混匀,置于 PCR 仪上修饰,反应条件为 98 °C 10 min, 64 °C 2.5 h。将产物按照说明书进行洗脱回收,最后用 15 μ L 洗脱液溶解产物,保存于 -20 °C,并用于后续甲基化特异性 PCR(MSP-PCR)试验。

1.2.5 MSP-PCR 检测 CpG 岛甲基化变化 我们推测 BORIS 对 SOCS3 基因表达的调控是通过表观遗传修饰的方式进行,通过 MSP-PCR 检测稳定细胞株 DNA 上 SOCS3 近端启动子 CpG 岛的甲基状态进行验证。甲基化引物和相应的非甲基化引物(上海生工合成)序列见附表。以修饰过的 A 组、B 组细胞 DNA 和胎盘 DNA 作为模板,进行 PCR 扩增,反应条件为: 95 °C 预变性 5 min, 然后 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 40 个循环, 最终

72 °C 再延伸 5 min。PCR 产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,用凝胶成像系统记录实验结果。本实验用胎盘组织作为阳性对照, H₂O 作为阴性对照。

1.2.6 染色质免疫共沉淀(ChIP)-定量 PCR(qPCR)检测 BORIS 对 SOCS3 启动子区甲基化修饰的影响 BORIS 作为转录因子 CTCF 唯一的同源物,可以与相同的 CTCF 结合的 DNA 序列结合。通过 UCSC Genome Browser 数据库对 SOCS3 基因序列进行分析,发现 CTCF 基因启动子区上有两个预测的结合位点,因此,可进一步分析 BORIS 是否能够结合在该位点。本实验在预测位点处设计合适的引物,通过 ChIP 来检测它们之间的关系。以 BORIS 抗体沉淀的 DNA 为模板,进行 qPCR 扩增,以 β -actin 外显子序列作为阴性对照,以 Myc 启动子序列作为阳性对照^[22]。为进一步研究 BORIS 表达变化是否能够对 SOCS3 启动子区域组蛋白甲基化修饰产生影响,本研究通过 ChIP 实验检测稳定细胞株中组蛋白 H3K4 me2 和 H3K27 me3 状态。ChIP 实验过程: ①将对数生长期的 B 组细胞消化并接种于培养皿上,次日用 10 mL/L 甲醛固定细胞, 37 °C 反应 10 min,用终浓度 0.125 mol/L 甘氨酸室温孵育 5 min,终止交联反应; ②用预冷 PBS 洗涤细胞 3 次,加入含蛋白酶抑制剂的 Western 及 IP 细胞裂解液,冰上静置 10 min。③用细胞刮刀将细胞收集于离心管内,冰上超声破碎,离心并收集上清液,并按 100 μ L/管分装,留取 10 μ L 作阳性对照,其余加入 0.2 mol/L NaCl 于 65 °C 交联 3 h; ④样品中加入 900 μ L Western 和 IP 细胞裂解液,再加入 80 μ L Protein A + G Agarose 和 2 μ g 鱼精 DNA, 4 °C 慢摇 3 min, 然后 4 °C 5 000 r/min 离心 3 min,转移上清至干净离心管中; ⑤分别加入兔抗 BORIS、鼠抗 H3K27 me3、兔抗 H3K4 me2、兔 IgG 和鼠 IgG 各 2 μ L, 4 °C 慢摇孵育过夜; ⑥分别加入 Protein A + G Agarose 40 μ L, 4 °C 慢摇孵育 3 h,离心并去上清,沉淀依次用低盐、高盐、LiCl、1 × TE 溶液洗涤,去上清,最后用 500 μ L 洗脱液洗脱,室温慢摇 15 min,离心并收集上清; ⑦每管加入 5 mol/L NaCl 20 μ L,混匀后 65 °C 水浴过夜进行解交联反应; ⑧每管加入 RNase, 37 °C 孵育 30 min,加入 EDTA、Tris-HCl、蛋白酶 K,于 45 °C 处理 2 h; ⑨加入等体积酚/氯仿(25 : 24, V : V),震荡混匀离心并收集水相,加 0.1 倍体积醋酸钠和 2.5 倍体积无水乙醇,混匀后 -20 °C 过夜沉淀 DNA; ⑩ 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min,用 750 mL/L 预冷乙醇

洗涤沉淀, 室温干燥后用双蒸水溶解沉淀, 存于 -70°C 备用。qPCR: 将前面纯化的 DNA 作为模板, 对 SOCS3 启动子区、Myc 启动子区(抗体结合的阳性对照)^[22] 和 β -actin 外显子区(抗体结合的阴

性对照)进行定量 PCR, 每个样品设 3 复孔, 其引物序列、退火温度和产物大小见附表。实验重复 3 次, 最后计算产物相对于对照 IgG 抗体的富集倍数。

1.3 统计学方法

附表 SOCS3 基因甲基化特异性 PCR 引物和 ChIP-qPCR 引物

Table Primers for methylation-specific PCR of SOCS3 and ChIP-qPCR

Gene	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature/ $^{\circ}\text{C}$	Product length/bp
MSP-PCR	UF; GTTGGAGATTTTAGGTTTGGAAATATTT	60.0	148
	UR; AAACCCCAAAACTACCTAAACACCA		
	MF; GGAGATTTTAGGTTTTCGGAATATTT	60.0	142
	MR; CCCCAGAACTACCTAAACGCCG		
ChIP-qPCR	F; ATCCCTGGCGTGCTATTC	60.8	121
	R; TCGAGGTGGAACGATGGC		
	F; GTTTTAAGGAACCGCTGTCCTTC	60.8	276
	R; GGATTGCAAATTACTCTGCCTCC		
β -actin	F; TCATCACCATGGCAATGAG	59.0	250
	R; CACTGTGTTGGGTACAGGT		

UF: Unmethylation forward primer; UR: Unmethylation reverse primer; MF: Methylation forward primer; MR: Methylation reverse primer

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间比较采用独立样本 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌细胞系中 SOCS3 mRNA 的表达

见图 1。SOCS3 mRNA 在 SMMC-7721 和 HepG2 中表达较高, 在 Huh7 细胞中表达最低, 相对于前 3 种细胞, SOCS3 mRNA 在 HCCLM3 中表达中等。

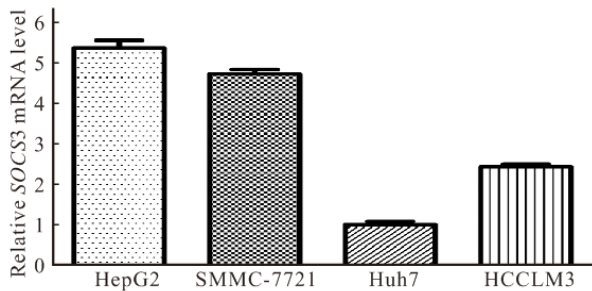


图 1 SOCS3 在肝癌细胞中的 mRNA 表达水平

Fig 1 Expression of SOCS3 mRNA in hepatocellular carcinoma

2.2 肝癌细胞中敲低或过表达 BORIS 对 SOCS3 蛋白表达的影响

见图 2。结果显示, 在 SMMC-7721 和 HepG2 肝癌细胞中, 敲低 BORIS mRNA 的 *shBORIS1*、*shBORIS2* 质粒组细胞, 与质粒对照组细胞比较, SOCS3 蛋白表达下调(图 2A); 而 HCCLM3 和

Huh7 细胞中过表达 BORIS mRNA 的 over-BORIS 质粒组细胞, 与质粒对照组细胞比较, 则上调 SOCS3 蛋白表达(图 2B)。实验结果表明 BORIS 对 SOCS3 蛋白表达具有正相调控的作用。

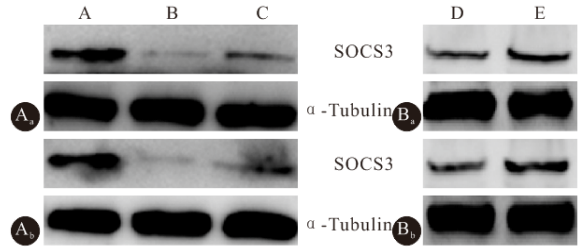


图 2 敲低 BORIS 或过表达 BORIS 对 SOCS3 蛋白表达的影响
Fig 2 Effects of knockdown of BORIS or overexpression of BORIS on SOCS3 protein expression in HCC cells

A_a(SMMC-7721), A_b(HepG2): The level of SOCS3 protein in knockdown BORIS mRNA cells; B_a(Huh7), B_b(HCCLM3): The level of SOCS3 protein in overexpressed BORIS mRNA cells; A: shCtrl; B: *shBORIS1*; C: *shBORIS2*; D: over-Ctrl; E: over-BORIS

2.3 BORIS 对 SOCS3 启动子 CpG 岛甲基化状态的影响

见图 3。在 SMMC-7721 和 HepG2 细胞中, SOCS3 启动子 DNA 呈现非甲基化状态, 敲低 BORIS mRNA 并未影响 SOCS3 启动子 DNA 非甲基化状态(图 3A)。在 Huh7 细胞中, SOCS3 启动子 DNA 为甲基化状态, 在过表达 BORIS mRNA 的 Huh7 细胞中, SOCS3 启动子 DNA 却呈现为非

甲基化状态;然而,对于 HCCLM3 细胞,SOCS3 启动子 DNA 为非甲基化状态,过表达 BORIS mRNA 并未影响 SOCS3 启动子的非甲基化状态(图 3B)。

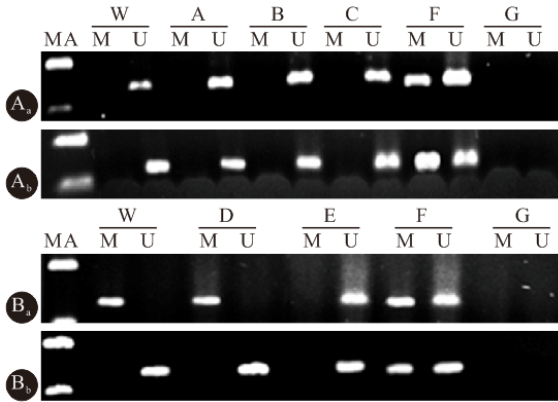


图 3 甲基化分析肝癌细胞中 BORIS 表达变化对 SOCS3 启动子甲基化的影响

Fig 3 Effect of BORIS expression on methylation status of SOCS3 promoter in hepatocellular carcinoma cells by MSP analysis

MA; Marker; M; Methylation; U; Unmethylation; W; Wild type; A_a, A_b, B_a, B_b, A, B, C, D, E: Note the same as the fig 2; F; Placenta(positive control); G; Water (negative control)

2.4 内源性高表达 BORIS 细胞 BORIS 与 SOCS3 启动子区的结合

见图 4。ChIP-qPCR 结果表明:在内源性高表达 BORIS 的 HepG2 和 SMMC-7721 细胞中, BORIS 不与 β-actin 序列结合,但能够特异性的与 SOCS3 和 c-Myc 启动子区结合;并且 SOCS3 在 SMMC-7721 细胞中的富集量远高于 HepG2 细胞。

2.5 BORIS 的表达对 SOCS3 启动子区组蛋白甲基化的影响

见图 5。由图 5A 可见,在 SMMC-7721 和 HepG2 细胞中, BORIS 基因的敲低减少了 BORIS 在 SOCS3 启动子区域的富集,同时也使 SOCS3 启动子区域的 H3K27 me3 增加, H3K4 me2 减少 (P<0.05)。由图 5B 可见,在过表达 BORIS 的 Huh7 和 HCCLM3 中,高表达的 BORIS 能够促进 BORIS 与 SOCS3 启动子结合,同时使 SOCS3 启动子区域的 H3K27 me3 减少, H3K4 me2 增加 (P<0.05)。

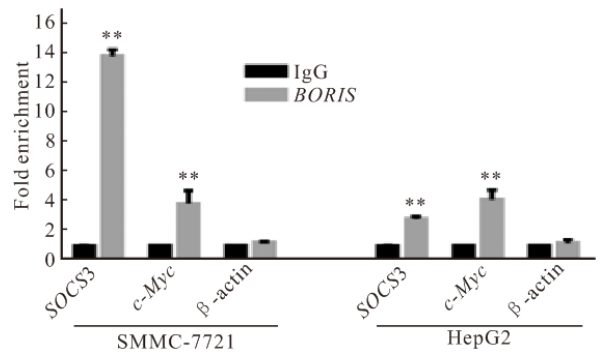


图 4 内源性高表达 BORIS 的细胞中 BORIS 在 SOCS3 启动子区的富集

Fig 4 The enrichment of BORIS in SOCS3 promoter region in endogenous high expression BORIS of HCC cells

** P<0.01, vs. negative control group (IgG) in the same cells

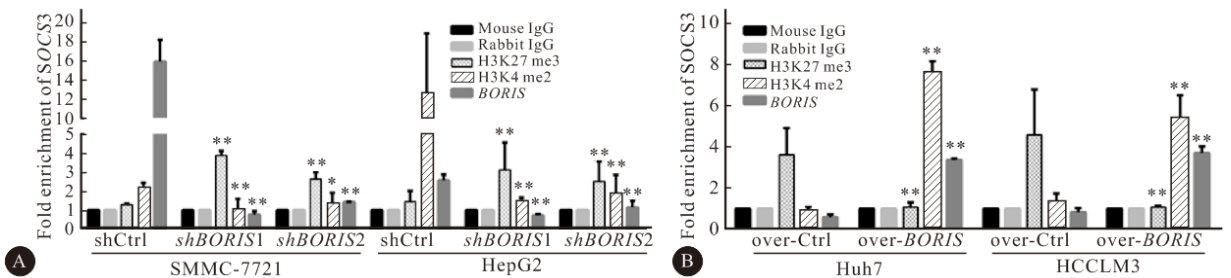


图 5 BORIS 表达变化对 SOCS3 启动子区组蛋白甲基化修饰的影响

Fig 5 Effects of BORIS expression on methylation status of SOCS3 promoter region histone

A; SOCS3 methylation status of promoter histone in knockdown-BORIS HCC cells; B; SOCS3 methylation status of promoter histone in overexpressed-BORIS HCC cells. * P<0.05, ** P<0.01, vs. control (shCtrl or over-Ctrl) group

3 讨论

大量基础与临床研究也表明肝癌的发生发展与慢性炎症密切相关^[23-25]。炎症相关信号通路 JAK-STAT 通路在这一进程中发挥着重要的作用。

SOCS3 作为经典的 JAK-STAT 信号通路负反馈调节因子之一,其通过负性调节信号通路及下游靶基因的表达,抑制细胞的持续增殖和分化^[26]。而在 HCC 的发生发展中,常发现 SOCS3 沉默,而 JAK-STAT 信号通路持续性激活^[27]。因此,本研究选取

SOCS3 基因进行探索,进一步研究 SOCS3 在 HCC 进展中分子机制。

本研究通过对 SOCS3 蛋白在肝癌细胞中的表达检测,发现 4 种肝癌细胞中 HepG2 和 SMMC-7721 细胞 SOCS3 蛋白表达相对较高,而 Huh7 细胞中表达最低。数据库分析发现与 BORIS 同源的 CTCF 在 SOCS3 启动子区有潜在的结合位点,因而 BORIS 和 SOCS3 基因可能具有一定的相关性。本结果发现,在敲低 BORIS 的 SMMC-7721 和 HepG2 细胞中,SOCS3 的蛋白水平相比于对照均降低($P < 0.05$),而在过表达 BORIS 的 Huh7 和 HCCLM3 细胞中,SOCS3 蛋白表达升高($P < 0.05$),表明 BORIS 能够正向调控 SOCS3 基因的表达。在细胞实验中,具有癌基因性质 BORIS 能够正相调控抑癌基因 SOCS3,提示可能是 BORIS 的表达变化引起细胞内信号通路间交错变化的结果,这些需要进一步的探索。

目前,表观遗传参与调控肝癌进程已有相关报道,通过改变基因启动子区甲基化状态或组蛋白修饰等方式,影响相关基因的激活或抑制进而影响肝癌的发生发展^[4,28-29]。为了研究 BORIS 对人肝癌细胞 SOCS3 表观遗传学调控机制,我们首先探讨 BORIS 是否通过靶向 SOCS3 基因启动子序列,进而改变这一区域 DNA 甲基化状态,从而调控 SOCS3 基因的表达。本研究通过 MSP-PCR 实验发现,在野生型细胞 SMMC-7721 和 HepG2 细胞中,SOCS3 启动子呈现非甲基化状态,SOCS3 表现为高表达,可能这两个细胞野生状态下主要是因为 SOCS3 启动子的非甲基化导致了 SOCS3 基因的高表达;在这两个细胞中敲低 BORIS 虽然下调了 SOCS3 表达,但不改变甲基化状态,表明 BORIS 对 SOCS3 下调并不是通过改变 DNA 甲基化实现的。同样野生型 HCCLM3 细胞的 SOCS3 启动子呈非甲基化,SOCS3 呈现中等表达,表明野生型状态下 SOCS3 表达可能通过 DNA 甲基化调控;当在细胞中过表达 BORIS 时,虽然上调 SOCS3,但没有改变 SOCS3 启动子非甲基化状态,表明 BORIS 对 SOCS3 的调控也不是通过 DNA 甲基化调控,而是其他机制。而对于 Huh7 细胞,在野生型细胞中,SOCS3 呈现甲基化,伴随 SOCS3 的低表达,过表达 BORIS,上调 SOCS3 表达并伴随 SOCS3 启动子非甲基化,表明在 Huh7 细胞,野生型和 BORIS 过表达都可能通过改变启动子 DNA 甲基化状态调控 SOCS3 表达。这些结果表明,BORIS 在某些细胞

中可以作为影响 SOCS3 启动子 DNA 甲基化状态的调控因子。

研究发现 BORIS 可结合在 *Myc* 启动子区,并影响该区域的组蛋白甲基化状态,进而对基因表达进行调控^[30]。另一研究发现,BORIS 通过结合于 *Nocth3* 启动子并上调组蛋白 H3K4 me3/H3K27 me3 比值,使得 *Nocth3* 表达异常增加^[19]。这些研究表明 BORIS 可作为一个表观遗传调控因子,调控靶基因染色质结构(激活或沉默)。UCSC 数据库分析发现转录因子 BORIS 在 SOCS3 启动子区有潜在的结合位点,因而 BORIS 可能对 SOCS3 基因具有调控作用。我们进一步做了 ChIP 实验,发现 BORIS 特异性结合于 SOCS3 启动子区,通过对 SOCS3 启动子区 H3K4 me2(开放/激活型染色质)和 H3K27 me3(关闭/抑制型染色质)状态的检测,发现过表达 BORIS 促进 BORIS 与 SOCS3 启动子结合,同时使得该启动子区域的 H3K4 me2 增加, H3K27 me3 减少,而敲低 BORIS 产生相反的结果。综合这些结果表明,在肝癌细胞 SMMC-7721、HepG2 和 HCCLM3 中,BORIS 对 SOCS3 表达调控主要是通过组蛋白甲基化修饰的机制进行的,而在 Huh7 细胞中通过启动子区甲基化和组蛋白修饰双重机制进行。BORIS 对 SOCS3 基因的表达调控可能因细胞不同而存在差异。通过 MSP-PCR 和 ChIP-qPCR 等方法,本研究首次发现了肝癌中 BORIS 通过表观修饰作用,改变 SOCS3 基因启动子区 DNA 的甲基化和组蛋白的甲基化状态,进而调控 SOCS3 的表达,影响了肝癌细胞的生理生化过程。后续须进一步在组织和动物模型上深入研究该调控过程。

综上所述,本研究发现了在肝癌中 BORIS 作为一个表观遗传调控因子,可特异性结合在 SOCS3 启动子区,通过改变 SOCS3 基因近端启动子区 DNA 甲基化和组蛋白甲基化修饰来调控该基因的表达,进而影响 HCC 的发生发展进程。这为进一步研究 BORIS 的功能和 SOCS3 的调控方式提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] FORNER A, LLOVET JM, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 2012, 379(9822): 1245-1255.
- [2] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, *et al.* Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [3] SHI YH, DING WX, ZHOU J, *et al.* Expression of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein in hepatocellular carcinoma promotes metastasis and tumor recurrence. *Hepatology*, 2008, 48(2): 497-507.

- [4] HLADY RA, ZHOU D, PUSZYK W, *et al.* Initiation of aberrant DNA methylation patterns and heterogeneity in precancerous lesions of human hepatocellular cancer. *Epigenetics*, 2017, 12(3): 215-225.
- [5] WANG J, TANG X, WENG W, *et al.* The membrane protein melanoma cell adhesion molecule (MCAM) is a novel tumor marker that stimulates tumorigenesis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2015, 34(47): 5781-5795.
- [6] HANDLE F, ERB HH, LUEF B, *et al.* SOCS3 modulates the response to enzalutamide and is regulated by androgen receptor signaling and CpG methylation in prostate cancer cells. *Mol Cancer Res*, 2016, 14(6): 574-585.
- [7] GAO Y, CIMICA V, REICH NC. Suppressor of cytokine signaling 3 inhibits breast tumor kinase activation of STAT3. *J Biol Chem*, 2012, 287(25): 20904-20912.
- [8] WU WY, KIM H, ZHANG CL, *et al.* Loss of suppressors of cytokine signaling 3 promotes aggressiveness in hepatocellular carcinoma. *J Invest Surg*, 2014, 27(4): 197-204.
- [9] STOFAS A, LEVIDOU G, PIPERI C, *et al.* The role of CXC-chemokine receptor CXCR2 and suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) in renal cell carcinoma. *BMC Cancer*, 2014, 14: 149 [2017-02-21]. <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-14-149>. doi: 10.1186/1471-2407-14-149.
- [10] HOAN NX, VAN TONG H, GIANG DP, *et al.* SOCS3 genetic variants and promoter hypermethylation in patients with chronic hepatitis B. *Oncotarget*, 2017, 8: 17127-17139 [2017-09-21]. <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&oP=view&path%5b%5d=15083>. doi: 10.18632/oncotarget.15083.
- [11] ALI O, CERJAK D, KENT JW Jr, *et al.* Methylation of SOCS3 is inversely associated with metabolic syndrome in an epigenome-wide association study of obesity. *Epigenetics*, 2016, 11(9): 699-707.
- [12] HUANG L, HU B, NI J, *et al.* Transcriptional repression of SOCS3 mediated by IL-6/STAT3 signaling via DNMT1 promotes pancreatic cancer growth and metastasis. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35: 27 [2017-02-21]. <https://jccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-016-0301-7>. doi: 10.1186/s13046-016-0301-7.
- [13] LOUKINOV DI, PUGACHEVA E, VATOLIN S, *et al.* BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(10): 6806-6811.
- [14] DE NECOCHEA-CAMPION R, GHOCHIKYAN A, JOSEPHS SF, *et al.* Expression of the epigenetic factor BORIS (CTCF) in the human genome. *J Transl Med*, 2011, 9: 213 [2017-02-21]. <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-9-213>. doi: 10.1186/1479-5876-9-213.
- [15] VELÁZQUEZ-HERNÁNDEZ N, REYES-ROMERO MA, BARRAGÁN-HERNÁNDEZ M, *et al.* BORIS and CTCF are overexpressed in squamous intraepithelial lesions and cervical cancer. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2): 6094-6100.
- [16] JOOSSE SA, MÜLLER V, STEINBACH B, *et al.* Circulating cell-free cancer-testis MAGE-A RNA, BORIS RNA, let-7b and miR-202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases. *Br J Cancer*, 2014, 111(5): 909-917.
- [17] YOON SL, ROH YG, CHU IS, *et al.* A polymorphic minisatellite region of BORIS regulates gene expression and its rare variants correlate with lung cancer susceptibility. *Exp Mol Med*, 2016, 48(7): e246 [2017-02-21]. <http://www.nature.com/emmm/journal/v48/n7/full/emmm201650a.html>. doi: 10.1038/emmm.2016.50.
- [18] TIFFEN JC, BAILEY CG, MARSHALL AD, *et al.* The cancer-testis antigen BORIS phenocopies the tumor suppressor CTCF in normal and neoplastic cells. *Int J Cancer*, 2013, 133(7): 1603-1613.
- [19] ZAMPIERI M, CICCARONE F, PALERMO R, *et al.* The epigenetic factor BORIS/CTCF regulates the NOTCH3 gene expression in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1839(9): 813-825.
- [20] GAYKALOVA D, VATAPALLI R, GLAZER CA, *et al.* Dose-dependent activation of putative oncogene SBSN by BORIS. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40389 [2017-02-21]. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040389>.
- [21] LI Y, DEURING J, PEPPELENBOSCH MP, *et al.* IL-6-induced DNMT1 activity mediates SOCS3 promoter hypermethylation in ulcerative colitis-related colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 2012, 33(10): 1889-1896.
- [22] NGUYEN P, BAR-SELA G, SUN L, *et al.* BAT3 and SET1A form a complex with CTCFL/BORIS to modulate H3K4 histone dimethylation and gene expression. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(21): 6720-6729.
- [23] TAKEDA H, TAKAI A, INUZUKA T, *et al.* Genetic basis of hepatitis virus-associated hepatocellular carcinoma: linkage between infection, inflammation, and tumorigenesis. *J Gastroenterol*, 2017, 52(1): 26-38.
- [24] POTIKHA T, STOYANOV E, PAPPO O, *et al.* Interstrain differences in chronic hepatitis and tumor development in a murine model of inflammation-mediated hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 2013, 58(1): 192-204.
- [25] BISHAYEE A. The role of inflammation and liver cancer. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 816: 401-435 [2017-02-21]. https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-0348-0837-8_16. doi: 10.1007/978-3-0348-0837-8_16.
- [26] INAGAKI-OHARA K, KONDO T, ITO M, *et al.* SOCS, inflammation, and cancer. *JAKSTAT*, 2013, 2(3): e24053 [2017-02-21]. <http://dx.doi.org/10.4161/jkst.24053>.
- [27] NIWA Y, KANDA H, SHIKAUCHI Y, *et al.* Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2005, 24(42): 6406-6417.
- [28] MARTINEZ-QUETGLAS I, PINYOL R, DAUCH D, *et al.* IGF2 is up-regulated by epigenetic mechanisms in hepatocellular carcinomas and is an actionable oncogene product in experimental models. *Gastroenterology*, 2016, 151(6): 1192-1205.
- [29] GAI X, TU K, LI C, *et al.* Histone acetyltransferase PCAF accelerates apoptosis by repressing a GIL1/BCL2/BAX axis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e1712 [2017-02-21]. <http://www.nature.com/cddis/journal/v6/n4/full/cddis201576a.html>. doi: 10.1038/cddis.2015.76.
- [30] MONK M, HITCHINS M, HAWES S. Differential expression of the embryo/cancer gene ECSA (DPPA2), the cancer/testis gene BORIS and the pluripotency structural gene OCT4, in human preimplantation development. *Mol Hum Reprod*, 2008, 14(6): 347-355.