

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.05.003

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20191210.1816.006.html\(2019-12-11\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20191210.1816.006.html(2019-12-11))乙型肝炎病毒 X 蛋白和 p16 启动子甲基化
在弥漫大 B 细胞淋巴瘤中的作用*张文静,王利,陈莉,郭丽银,赵娟,邵菁,王红祥[△]

(华中科技大学同济医学院附属武汉市中心医院血液科 430014)

[摘要] **目的** 探讨乙型肝炎病毒 X(HBx)蛋白与抑癌基因 p16 启动子甲基化在弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)中的关系及其临床病理意义。**方法** 采用免疫组织化学法检测 60 例 DLBCL 组织及 15 例良性反应性增生淋巴组织中 HBx 蛋白表达情况;用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)法检测 p16 基因启动子甲基化状况,分析上述组织中 HBx 蛋白和抑癌基因 p16 甲基化的关系,并统计学分析 p16 基因启动子甲基化状态与临床资料间的关系。**结果** 60 例 DLBCL 组织中 HBx 阳性 14 例,HBx 阴性 46 例,15 例良性淋巴组织均为 HBx 阴性,MSP 分析显示,在 60 例 DLBCL 组织中 p16 基因启动子甲基化阳性率为 50.00%(30/60),良性淋巴组织为 0%,差异有统计学意义($P < 0.05$);HBx 阳性 DLBCL 组中 p16 基因甲基化阳性率为 85.71%(12/14),而 HBx 阴性 DLBCL 组中是 39.13%(18/46),两组间差异有统计学意义($P < 0.05$);p16 基因甲基化与 DLBCL 患者的体力状况、Ann Arbor 临床分期、B 症状和 IPI 评分有关($P < 0.05$)。**结论** HBx 蛋白可促进 p16 基因异常高甲基化,参与 DLBCL 形成;p16 基因甲基化状态与 DLBCL 患者的临床表现和预后相关。

[关键词] p16 基因;乙型肝炎病毒 X 蛋白;DNA 甲基化;弥漫大 B 细胞淋巴瘤**[中图分类号]** R552**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)05-0701-04

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Role of hepatitis B virus X protein and p16INK4A
methylation in diffuse large B-cell lymphoma*ZHANG Wenjing, WANG Li, CHEN Li, GUO Liyin, ZHAO Juan, SHAO Jing, WANG Hongxiang[△]

(Department of Hematology, The Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College,

Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430014, China)

[Abstract] **Objective** To explore the relationship between hepatitis B virus(HBV) X(HBx) protein and the tumor suppression gene p16 promoter methylation in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and its clinical pathologic significance. **Methods** The immunohistochemistry method was used to examine the HBx protein expression level in 60 cases of DLBCL frozen tissue and 15 cases of benign reactive hyperplasia lymph node tissue; the methylation state of p16 gene promoter was detected by methylation-specific polymerase chain reaction(MSP), then the relationship between HBx protein and tumor suppression gene p16 methylation. And the relationship between p16 promoter methylation state and clinical data was statistically analyzed. **Results** Among 60 cases of DLBCL tissue, there were 14 cases of HBx positive and 46 HBx negative, while 15 cases of benign lymph node tissue were HBx negative. The SP analysis indicated that in 60 cases of DLBCL tissue, the positive rate of p16 gene promoter methylation was 50% (30/60) in DLBCL tissues and 0% in the benign lymph node tissue, and the difference between the cancer tissue and normal tissue was statistically significant ($P < 0.05$). The positive rate of p16 gene methylation in the HBx protein positive DLBCL group was 85.71% (12/14), however, which in the HBx protein negative DLBCL group was 39.13% (18/46), and the difference between these two groups was statistically significant ($P < 0.05$). The p16 gene methylation was associated with ECOG, Ann Arbor clinical stage, B symptoms and IPI scores in DLBCL patients ($P < 0.05$). **Conclusion** HBx

* 基金项目:湖北省武汉市卫生和计划生育委员会基金项目(WX17Q06)。 作者简介:张文静(1985—),主治医师,硕士,主要从事表观遗传学的研究。

[△] 通信作者, E-mail: ljwhx@21cn.com。

protein may promote the abnormal hypermethylation of p16 gene, involved in of the DLBCL formation. The p16 gene methylation state is correlated with the clinical manifestations and prognosis of the patients with DLBCL.

[Key words] p16 gene; hepatitis B virus X protein; DNA methylation; diffuse large B-cell lymphoma;

弥漫大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)是非霍奇金淋巴瘤(NHL)中最常见的一种类型,研究^[1-3]显示,慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染会增加 NHL 的发病率,但具体机制尚不明确。HBV 的 X 基因是 HBV 基因组 4 个开放读码框中的最小一段,其表达乙型肝炎病毒 X (HBx)蛋白在 HBV 感染、复制及潜在致癌过程中发挥重要作用,有研究^[4]报道 HBx 与抑癌基因 p16 甲基化密切相关。众所周知,淋巴瘤的发生是由于基因变异逐步累积所致。染色体 9p21 是人类癌症基因组中变异最为频繁的一部分,该染色体区段包含 50 kb 片段,含有一组肿瘤抑癌基因:p14ARF、p15INK4b 和 p16INK4a。在 DLBCL 中,能观察到 p16INK4a 的失活,有研究^[5-6]证实是由于 p16 启动子区甲基化所导致的。在其他恶性肿瘤,如肝癌中 HBx 蛋白可以导致 p16 启动子区甲基化,从而在肝癌发生发展中发挥作用^[4]。但在 DLBCL 中,HBx 蛋白与 p16 启动子区甲基化间的关系尚不明确。本实验以 DLBCL 为研究对象,重点着眼于 HBx 蛋白作用的一个靶点——抑癌基因 p16,探讨 HBx 蛋白、p16 基因与 DLBCL 间的相互关系,探索 HBV 相关 DLBCL 新的诊断和治疗方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料

于 2008 年 1 月至 2015 年 6 月收集 DLBCL 组织 60 例,所有组织标本均经病理证实为 DLBCL,同时收集 15 例良性反应性增生淋巴组织作为正常对照,所有标本分析前保存于 -80 °C 冰箱中。60 例 DLBCL 患者中,男 34 例,女 26 例,年龄 30~80 岁。收集患者的如下资料:性别、年龄、体力状况(performance status,PS),PS 按照美国东部肿瘤协作组 ECOG 标准)、临床 Ann Arbor 分期、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、乳酸脱氢酶(LDH)水平、巨大包块(直径大于 10 cm)、骨髓浸润、结外病灶、B 症状,根据 IPI 进行评分。其中 HBsAg 阳性患者有 11 例,占 18.33%。所有标本取材后立即用甲醛固定、石蜡包埋,各例标本均得病理学证实,全部患者术前均未进行过任何治疗。鼠抗人 HBx 单克隆抗体、DAB 显色试剂盒和 SP 免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,DNA 提取试剂盒购自中国 Tiangen 公司;DNA 亚硫酸氢盐修饰试剂盒购自美国 Epi-

gentek 公司;Taq 酶及 PCR 相关试剂购自北京阅微基因技术有限公司;引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学试验

石蜡切片置入 70 °C 烘箱 3 h 后以二甲苯脱蜡,逐级乙醇入水,按照免疫组织化学试剂盒使用说明书,采用 SP 两步法,一抗(鼠抗人 HBx 单克隆抗体)4 °C 过夜,室温孵育 20 min,加入二抗(生物素化标记的山羊抗小鼠 IgG),室温孵育 30 min,免疫组织化学反应结束后使用 DAB 显色 3 min,苏木素复染 2 min,中性树胶封固。阳性对照为已知阳性的组织,磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 免疫组织化学试验结果的判定标准

免疫组织化学阳性反应物为淡黄、棕褐色颗粒,在细胞质或细胞核内呈淡黄、棕褐色染色为阳性细胞。具体判断标准一方面按照阳性细胞面积占切片总面积的百分比进行积分:0%~5%为 0 分;>5%~25%为 1 分;>25%~50%为 2 分;>50%~75%为 3 分;>75%~100%为 4 分。另一方面按阳性细胞中显色强度积分:弱阳性为 1 分;中等阳性为 2 分;强阳性为 3 分。将上述两项相乘,大于 4 的即判定为阳性标本,其余为阴性。

1.2.3 p16 基因启动子 CpG 岛甲基化检测

采用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)检测。按照上海生工生物有限公司 DNA 抽提纯化试剂盒操作方法,从两组淋巴标本中提取 DNA,采用 DNA 亚硫酸氢盐修饰试剂盒的说明书对提取的 DNA 进行亚硫酸氢盐修饰,甲基化特异性 p16-M 序列:上游 5'-TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC-3';下游 5'-GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA-3'。非甲基化特异性 p16-U 序列:上游 5'-TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT-3';下游 5'-CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A-3'。扩增条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环,72 °C 延伸 5 min。取 10 μL PCR 产物加入 2%琼脂糖凝胶进行电泳,用紫外线检测仪和 UVI 凝胶成像系统进行拍照和图像分析。结果判定:当甲基化引物进行扩增出现阳性条带,而非甲基化扩增无阳性条带为完全甲基化;甲基化引物和非甲基化引物扩

增均有阳性条带为部分甲基化;甲基化引物进行扩增无阳性条带而非甲基化引物扩增有阳性条带为无甲基化。完全和部分甲基化判定为甲基化阳性,无甲基化为甲基化阴性。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 t 检验,计数资料以百分率表示,两组间比较采用 χ^2 检验和 Fisher 精确检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HBx 蛋白在 DLBCL 组织标本中的表达

HBx 主要在细胞质中表达,呈淡黄、棕黄或褐色颗粒状。在 60 例 DLBCL 组织中有 14 例 HBx 阳性表达,阳性表达率为 23.33% (14/60),根据 DLBCL 中 HBx 的表达情况,分为 HBx 阳性组和 HBx 阴性组,HBx 阳性有 14 例,HBx 阴性有 46 例。其中,HBx 阳性组中有 11 例 HBsAg 阳性,HBx 阴性组无 HBsAg 阳性。

2.2 抑癌基因 p16 异常甲基化的检测结果

本实验中共检测了 60 例 DLBCL 组织和 15 例对照淋巴组织中 p16 基因启动子区甲基化情况。DLBCL 组织 30 例甲基化阳性,阳性率 50.00%,其中,完全甲基化 11 例,部分甲基化 19 例;15 例淋巴对照组织均未检测到甲基化阳性。DLBCL 组织与对照淋巴组织比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 HBx 与 p16 基因启动子甲基化关系

在 14 例 HBx 阳性组 DLBCL 组织中,有 12 例甲基化阳性表现,阳性率 85.71% (12/14),而在 46 例 HBx 阴性组有 18 例出现甲基化阳性,其阳性率 39.13% 远低于 HBx 阳性 DLBCL 组,二者差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 60 例 DLBCL p16 基因甲基化与临床预后相关性分析

项目	n	P16 基因甲基化		P
		例数(n)	占比(%)	
性别				
男	34	18	52.94	0.237
女	26	12	46.15	
年龄(岁)				
≤60	20	9	45.00	0.468
>60	40	21	52.50	
LDH				
正常	29	13	44.83	0.469
升高	31	17	54.84	

续表 1 60 例 DLBCL p16 基因甲基化与临床预后相关性分析

项目	n	P16 基因甲基化		P
		例数(n)	占比(%)	
PS				0.029
≤2	34	11	32.35	
>2	26	19	73.08	
Ann Arbor 临床分期				0.031
I~II	24	8	33.33	
III~IV	36	22	61.11	
巨大包块(直径大于 10 cm)				0.612
无	51	24	47.06	
有	9	6	66.67	
B 症状				0.039
无	48	19	39.58	
有	12	11	91.67	
IPI 评分(分)				0.019
≤2	40	14	35.00	
>2	20	16	80.00	
骨髓浸润				0.547
无	54	25	46.30	
有	6	5	83.33	
结外病灶(个)				0.382
≤2	48	25	52.08	
>2	12	5	41.67	

2.4 p16 基因甲基化的表达与 DLBCL 患者临床病理特征的关系

p16 基因甲基化与 DLBCL 患者的性别、年龄(≤60 岁和>60 岁)、LDH 水平、巨大包块(>10 cm)、骨髓浸润、结外病灶均无关 ($P > 0.05$),而与 DLBCL 患者的体力状态、Ann Arbor 临床分期、B 症状和 IPI 评分有关 ($P < 0.05$),见表 1。

3 讨 论

NHL 为起源于淋巴造血组织的恶性肿瘤,发病率逐年上升。现已有研究证实 HBV 感染与 NHL 存在因果关系,2010 年韩国一项大规模临床试验(共 1 284 586 个参与者入选)结果表明 HBV 感染患者 NHL 发病率明显增高^[1]。2015 年日本历时 16 年的大规模队列研究显示 HBsAg 阳性与 NHL ($HR = 3.56, 95\% CI: 1.37 \sim 9.18$),特别是与 DLBCL ($HR = 7.22, 95\% CI: 2.34 \sim 22.29$)密切相关^[2]。一项通过对 1997—2013 年台湾健康保险研究数据库的分析发现,在小于 20 岁的人群中,乙型肝炎疫苗全面接种前出生的人群 NHL 的发病率要高于全面接种后出生的人群^[7]。越来越多的研究表明 HBV 感染可能在 NHL 的发生发展中起到重要作用^[8]。

在淋巴瘤发生发展过程中 HBV 感染可能起着一定的作用,目前其发病机制尚待研究。一方面,HBV 可以在外周血中感染单核细胞,导致慢性的免疫介导反应,从而促进淋巴细胞的异常增殖;另一方面,HBV DNA 也可以整合到淋巴细胞的基因组中,影响癌基因及抑癌基因的稳定性,抑制抑癌基因,激活原癌基因,引起淋巴细胞的克隆性增殖,最终导致恶性淋巴瘤的发生^[9-10]。近年来,研究者对 HBV 感染引起抑癌基因启动子甲基化的机制进行了不断探索^[11]。当 HBV DNA 感染机体后,病毒 DNA 与宿主基因发生整合,在病毒基因自身甲基化同时,可能诱发宿主基因特定区域甲基化增加,促使抑癌基因启动子失活。此外,在 HBV 感染引起抑癌基因启动子甲基化失活的机制中,HBx 蛋白的作用越来越受到人们的关注。值得一提的是 HBx 可以通过表观遗传学调节基因的转录活性,进而在肿瘤的发生发展中起到促进作用^[4]。研究证实 DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)通常在 DLBCL 中过表达,可能是诱导多个淋巴瘤相关抑癌基因如 p16 甲基化的重要途径^[12]。HBx 蛋白通过激活 DNMT1,使肿瘤抑癌基因 p16INK4a 和钙黏蛋白 E(E-cadherin)启动子区甲基化,从而抑制其表达,而使用甲基化转移酶抑制剂 5-氮杂-2'-脱氧胞苷处理后,上述抑制作用得到逆转^[13-14]。有研究指出 HBx 蛋白可能通过下调 microRNA 表达使 DNMT1 表达增加,从而促进了抑癌基因高甲基化^[15-16]。上述实验表明,HBx 可能是通过影响 p16 抑癌基因的甲基化及其表达,参与肿瘤的发生发展。

既往多研究 HBx 蛋白与肝癌的相关性,与淋巴瘤的相关研究较少。p16INK4a 启动子甲基化已经成为 DLBCL 发生发展中的频发事件,同时在 DLBCL 中,HBx 阳性组 p16 甲基化率远高于 HBx 阴性组,表明 HBx 对 p16 抑癌基因甲基化有促进作用。本研究还分析了 p16 基因甲基化与 DLBCL 患者的临床资料间的关系。Ann Arbor 临床分期、ECOG、B 症状和 IPI 评分与 p16 基因甲基化有相关性,提示 p16 甲基化与 DLBCL 患者的临床表现及预后相关,通过对其早期检测,对于 DLBCL 病情评估、预后判断具有重要的意义,甚至也可能会影响该类患者化疗方案的选择^[16]。

本研究表明,在 DLBCL 中抑癌基因 p16 甲基化是一个频发事件,HBx 蛋白能促进抑癌基因 p16 甲基化,从而在 DLBCL 发生发展中发挥作用,并且 p16 甲基化与患者临床预后密切相关。但由于本实验纳入病例较少,故在 DLBCL 患者中 p16 甲基化是否可作为有价值的预后因素还需要大样本量的前瞻性研究。

参考文献

- [1] ENGELS E A, CHO E R, JEE S H. Hepatitis B virus infection and risk of non-Hodgkin lymphoma in South Korea: a cohort study [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(9): 827-834.
- [2] ABE S K, INOUE M, SAWADA N, et al. Hepatitis B and C virus infection and risk of lymphoid malignancies: population-based cohort study (JPHC Study) [J]. *Cancer Epidemiol*, 2015, 39(4): 562-566.
- [3] WANG C, XIA B, NING Q, et al. High prevalence of hepatitis B virus infection in patients with aggressive B cell non-Hodgkin's lymphoma in China [J]. *Ann Hematol*, 2018, 97(3): 453-457.
- [4] 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.
- [5] RAN Z, BU Y, CHOI M H, et al. Implications of genetic and epigenetic alterations of CDKN2A (p16INK4a) in cancer [J]. *Ebio Med*, 2016(8): 30-39.
- [6] CHAMBWE N, KORMAKSSON M, GENG H, et al. Variability in DNA methylation defines novel epigenetic subgroups of DLBCL associated with different clinical outcomes [J]. *Blood*, 2014, 123(11): 1699-1708.
- [7] HUANG C E, YANG Y H, CHEN Y Y, et al. The impact of hepatitis B virus infection and vaccination on the development of non-Hodgkin lymphoma [J]. *J Viral Hepat*, 2017, 24(10): 885-894.
- [8] KLEINSTERN G, SEIR R A, PERLMAN R, et al. Associations between B-cell non-Hodgkin lymphoma and exposure, persistence and immune response to hepatitis B [J]. *Haematologica*, 2016, 101(7): 303-305.
- [9] JI D, CAO J, HONG X, et al. Low incidence of hepatitis B virus reactivation during chemotherapy among diffuse large B-cell lymphoma patients who are HBsAg-negative/HBcAb-positive: a multicenter retrospective study [J]. *Rur J haematol*, 2010, 85(3): 243-250.
- [10] DAVIS R E, NGO V N, LENA (下转第 708 页)

- [4] ZHANG J, CAO R, CAI T, et al. The role of autophagy dysregulation in manganese-induced dopaminergic neurodegeneration [J]. *Neurotox Res*, 2013, 24(4): 478-490.
- [5] HABETS R A, de BOCK C E, SERNEELS L, et al. Safe targeting of T cell acute lymphoblastic leukemia by pathology-specific NOTCH inhibition [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11(494): e6246.
- [6] HABETS R A, de BOCK C E, SERNEELS L, et al. Notch and mTOR signaling pathways promote human gastric cancer cell proliferation [J]. *Neoplasia*, 2019, 21(7): 702-712.
- [7] YOU M S, WANG W P, WANG J Y, et al. Sun1 mediates interkinetic nuclear migration and Notch signaling in the neurogenesis of zebrafish [J]. *Stem Cells Dev*, 2019(29): 63.
- [8] WEI W, LI Z P, BIAN Z X, et al. Astragalus polysaccharide RAP induces macrophage phenotype polarization to M1 via the notch signaling pathway [J]. *Molecules*, 2019, 24(10): 2016-2020.
- [9] CHEKNEVA E E, GORUGANTHU M U, UZHACHENKO R V, et al. Correction to: Determinant roles of dendritic cell-expressed Notch Delta-like and Jagged ligands on anti-tumor T-cell immunity [J]. *J Immunother Cancer*, 2019, 7(1): 124-129.
- [10] MA L, WANG Y, HUI Y, et al. WNT/NOTCH pathway is essential for the maintenance and expansion of human MGE progenitors [J]. *Stem Cell Reports*, 2019, 12(5): 934-949.
- [11] HIEMSTRA P S. Macrophage function in chronic obstructive pulmonary disease: the many faces of notch signalling [J]. *EBio Medicine*, 2019(43): 22-23.
- [12] WISZNIAK S, SCHWARZ Q. Notch signalling defines dorsal root ganglia neuroglial fate choice during early neural crest cell migration [J]. *BMC Neurosci*, 2019, 20(1): 21.
- [13] GUO L, YU H, GU W, et al. Autophagy negatively regulates transmissible gastroenteritis virus replication [J]. *Sci Rep*, 2016(6): 23864.
- [14] ROMERO M, ZORZANO A. Role of autophagy in the regulation of adipose tissue biology [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(13): 1435-1445.
- [15] RUSSELL K L, GORGULHO C M, ALLEN A, et al. Inhibiting autophagy in renal cell cancer and the associated tumor endothelium [J]. *Cancer J*, 2019, 25(3): 165-177.

(收稿日期: 2019-05-31 修回日期: 2019-11-12)

(上接第 704 页)

- G, et al. Chronic active B-cell-receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Nature*, 2010, 463(7277): 88-92.
- [11] JIANG Y, HATZI K, SHAKNOVICH R. Mechanisms of epigenetic deregulation in lymphoid neoplasms [J]. *Blood*, 2013, 121(21): 4271-4279.
- [12] LOO S K, HAMID S S, MUSA M. DNMT1 is associated with cell cycle and DNA replication gene sets in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(1): 134-143.
- [13] JUNG J K, ARORA P, PAGANO J S, et al. Expression of DNA methyltransferase 1 is activated by hepatitis B virus X protein via a regulatory circuit involving the p16INK4a-cyclin D1-CDK 4/6-pRb-E2F1 pathway [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(12): 5771-5778.
- [14] HE D, ZHANG Y W, ZHANG N N, et al. Aberrant gene promoter methylation of p16, FHIT, CRBP1, WWOX, and DLC-1 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas [J]. *Med Oncol*, 2015, 32(4): 92.
- [15] HUANG J, WANG Y, GUO Y, et al. Down-regulated microRNA-152 induces aberrant DNA methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting DNA methyltransferase 1 [J]. *Hepatology*, 2010, 52(1): 60-70.
- [16] JIANG Y, HATZI K, SHAKNOVICH R, et al. Mechanisms of epigenetic deregulation in lymphoid neoplasms [J]. *Blood*, 2013(21): 4271-4279.

(收稿日期: 2019-08-10 修回日期: 2019-12-03)