基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003824

DExH-box解旋酶9 O-GlcNAc修饰对HBV相关肝癌细胞增殖能力的影响

罗慧敏，皮雨博，陈彦猛，汪　凯，唐　霓，黄爱龙
（重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室，重庆　400016）

【摘　要】目的：研究DExH-box解旋酶9（DExH-box helicase 9，DHX9）的氧连接-N-乙酰葡萄糖胺（O-linked N-acetylglucosamine，O-GlcNAc）修饰对乙型肝炎病毒（hepatitis B virus，HBV）相关肝癌细胞增殖能力的影响。**方法：**通过分子克隆构建pAdTrack-TO4-DHX9-3Flag重组腺病毒质粒，并将重组腺病毒质粒转染至HEK293细胞中，包装、扩增重组腺病毒Ad-DHX9。通过免疫共沉淀实验检测DHX9与O-GlcNAc转移酶（O-GlcNAc transferase，OGT）的相互作用，免疫荧光实验研究DHX9与OGT共定位情况。通过琥珀酰化小麦胚芽凝集素（succinylated wheat germ agglutinin，sWGA）和糖基化免疫沉淀实验（immunoprecipitation，IP）检测DHX9 O-GlcNAc修饰水平。通过克隆形成实验和细胞生长曲线探索DHX9 O-GlcNAc修饰对HBV相关肝癌细胞增殖能力的影响。**结果：**成功获得了重组腺病毒AdDHX9，经Western blot鉴定了DHX9的表达。DHX9与OGT相互作用，2者共定位于细胞核。sWGA和糖基化IP实验证实了DHX9能够发生O-GlcNAc修饰，并且HBV感染促进了DHX9 O-GlcNAc修饰水平。克隆形成实验显示，与AdGFP对照组（142.667±7.572）相比，AdDHX9组（386.667 ± 15.630）的细胞克隆数量增加（P<0.001）。细胞生长曲线结果显示，AdDHX9组（22.860±0.770）比AdGFP对照组（13.670 ± 0.517）的细胞整体生长速率增加（P<0.001）。**结论：**HBV感染促进DHX9 O-GlcNAc修饰；DHX9 O-GlcNAc修饰增强HBV相关肝癌细胞的增殖能力。

【关键词】DExH-box解旋酶9；氧连接-N-乙酰葡萄糖胺；肝细胞癌；细胞增殖
【中图分类号】R735.7　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2024-10-24

Effect of DExH-box helicase 9 O-GlcNAc modification on the proliferation of HBV-associated hepatoma cells

Luo Huimin，Pi Yubo，Chen Yanmeng，Wang Kai，Tang Ni，Huang Ailong
（*Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases，Ministry of Education，Chongqing Medical University*）

【Abstract】*Objective*：To investigate the effect of DExH-box helicase 9（DHX9）O-linked N-acetylglucosamine（O-GlcNAc）modification（O-GlcNAcylation）on the proliferation of hepatitis B virus（HBV）-associated hepatoma cells. ***Methods*：**The pAdTrack-TO4-DHX9-3Flag recombinant adenovirus plasmid was constructed by molecular cloning and transfected into HEK293 cells for packaging and amplification of the recombinant adenovirus AdDHX9. The interaction between DHX9 and O-GlcNAc transferase（OGT）was confirmed using co-immunoprecipitation. The co-localization between DHX9 and OGT was measured by immunofluorescence. The level of DHX9 O-GlcNAcylation was determined using succinylated wheat germ agglutinin（sWGA）and glycosylated immunoprecipitation（IP）. The effect of DHX9 O-GlcNAcylation on the proliferation of HBV-associated hepatoma cells was assessed using the colony-forming assay and cell growth curves. ***Results*：**The recombinant adenovirus AdDHX9 was successfully obtained，and DHX9 expression was confirmed by Western blot. DHX9 interacted with OGT，and the two proteins were co-localized on the nucleus. The sWGA and glycosylated IP experiments showed that DHX9 underwent O-GlcNAcylation，which was further enhanced by HBV infection. The colony-forming assay demonstrated that the number of cell clones was increased in the AdDHX9 group（386.667 ± 15.630）compared with the AdGFP control group（142.667 ± 7.572，P<0.001）. Moreover，cell growth curves demonstrated that the overall cell growth rate was enhanced in the AdDHX9 group（22.860 ± 0.770）compared with the AdGFP control group（13.670 ± 0.517，P<0.001）. ***Conclusion*：**HBV infection promotes DHX9 O-GlcNAcylation，which enhances the proliferation of HBV-associated hepatoma cells.

【Key words】DExH-box helicase 9；O-linked N-acetylglucosamine；hepatocellular carcinoma；cell proliferation

作者介绍：罗慧敏，Email：luohuimin@stu.cqmu.edu.cn，研究方向：乙型肝炎病毒复制的基础研究。
通信作者：黄爱龙，Email：ahuang@cqmu.edu.cn。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：U20A20392、82102377）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250408.1144.008（2025-04-08）

原发性肝癌是全球常见的恶性肿瘤之一，居恶性肿瘤发病率的第6位，其中肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）占75%~85%[1]。乙型肝炎病毒（hepatitis B virus，HBV）慢性感染是导致HCC的主要诱因，我国约84%的HCC患者罹患HBV感染[2]。相较于乙醇、黄曲霉素等因素导致的HCC，HBV相关HCC的发病更早、预后更差以及复发率更高[3]。近年来研究发现，细胞代谢重编程在HBV相关HCC的发生发展中具有重要作用[4]，但具体机制尚未完全阐明。

HBV相关HCC的细胞代谢重编程主要涉及糖酵解、核苷酸代谢和脂质合成等代谢途径[5-6]。己糖胺生物合成途径（hexosamine biosynthesis pathway，HBP）是葡萄糖代谢途径之一。葡萄糖进入细胞后被磷酸化为葡萄糖-6-磷酸，进一步代谢为果糖-6-磷酸，其中3%~5%的果糖-6-磷酸进入HBP，在限速酶谷氨酰胺果糖-6-磷酸氨基转移酶（glutamine fructose-6-phosphate aminotransferase，GFAT）及一系列酶的催化下转变为尿苷二磷酸-N-乙酰氨基葡萄糖胺（uridine diphosphate-N-acetylglucosamine，UDP-GlcNAc）[7]。UDP-GlcNAc是细胞内氧连接-N-乙酰葡萄糖胺（O-linked N-acetylglucosamine，O-GlcNAc）修饰的底物。O-GlcNAc修饰是一种将GlcNAc连接到蛋白质的丝氨酸和苏氨酸残基上的蛋白质翻译后修饰。O-GlcNAc修饰过程由O-GlcNAc转移酶（O-GlcNAc transferase，OGT）催化，而O-GlcNAc水解酶（O-GlcNAcase，OGA）则反向去除这一修饰[8]。O-GlcNAc修饰可以通过影响蛋白质稳定性、亚细胞定位、活性等促进肝癌细胞的增殖、侵袭、迁移[6,9]。例如，YTH结构域家族蛋白2 O-GlcNAc修饰增强了微型染色体维持蛋白2/5（mini-chromosome maintenance protein 2/5，MCM2/5）m6A修饰和MCM2/5 mRNA稳定性，从而促进HBV相关HCC细胞的增殖、侵袭和迁移[6]。斑点型锌指结构蛋白（speckle-type POZ protein，SPOP）O-GlcNAc修饰促进SPOP蛋白的核异位，促进HCC细胞增殖、侵袭和迁移[9]。此外，O-GlcNAc修饰参与血管生成、免疫逃逸、干细胞特性增强和耐药性形成，还可以通过调控蛋白质功能，影响细胞信号传导、基因组稳定性以及肿瘤微环境等关键生物学过程，在肿瘤的发生发展中发挥重要作用[10]。

DExH-box解旋酶9（DExH-box helicase 9，DHX9）是人类RNA解旋酶DExD/H-box家族的成员之一，编码基因定位于人类染色体1q25[11]，编码相对分子质量为140 kDa蛋白质[12]。DHX9具有解开DNA和RNA双链体的能力，也在调控DNA复制、RNA加工和转运以及转录过程中发挥重要功能[13]。此外，DHX9与多种肿瘤的发生发展相关，如肝癌、乳腺癌、肺癌、骨肉瘤、尤文肉瘤等[14]。目前研究发现，DHX9在HCC组织中的表达水平明显高于癌旁组织[15]；在HCC中，泛素样含PHD和环指域蛋白2（ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 2，UHRF2）抑制DHX9泛素化降解，稳定DHX9蛋白表达从而促进HCC的发展[16]。HBV感染增强肝细胞内DHX9蛋白水平[17]，还可增强细胞葡萄糖的摄取从而促进HBP途径的活化[18]，但DHX9是否发生O-GlcNAc修饰及其对HBV相关HCC细胞增殖能力的影响尚不清楚。本研究首次发现了DHX9的一种新型蛋白质翻译后修饰-O-GlcNAc修饰，并且HBV感染促进DHX9 O-GlcNAc修饰水平。进一步发现DHX9 O-GlcNAc修饰通过影响DHX9蛋白表达促进HCC的增殖，从而在HBV相关HCC的发生发展中发挥重要作用，为解析HBV相关HCC的发生发展机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞系Huh7、人胚肾细胞HEK293和HEK293T为本实验室保存，人肝癌细胞系HepAD38（货号：CRL-3561）购自美国ATCC公司；pAdTrack-TO4质粒为本实验室保存；pcDNA3.1-DHX9质粒由上海生工生物公司构建；DMEM培养基（货号：C11995500BT）购于美国Gibco公司；胎牛血清（货号：SFBE-B）购于阿根廷NTC公司；青霉素-链霉素（货号：HY-K1006）、Protein A/G Magnetic Beads（货号：HY-K0202）购于美国MCE公司；TMG（货号：T6056）、OSMI-1（货号：T16409）、蛋白酶抑制剂Cocktail（货号：C0001）购于上海陶术生物公司；限制性核酸内切酶*Bam*H Ⅰ（货号：1605）、*Not* Ⅰ（货号：1623）、*Xho* Ⅰ（货号：1635）、T4 DNA连接酶（货号：2011A）购于日本Takara公司；限制性核酸内切酶*Pac* Ⅰ（货号：15041ES）购于中国Yeasen公司；限制性核酸内切酶*Pme* Ⅰ（货号：R0560S）购于美国NEB公司；PNGase（货号：04169273）购于上海Admas life公司；PMSF（货号：WB-0181）购自北京鼎国昌盛生物公司；sWGA-conjugated agarose beads（货号：AL-1023S）购于美国Vector Laboratories公司；转染试剂Lipo8000（货号：C0533）、Western及IP细胞裂解液（货号：P0013）、BCA蛋白浓度测定试剂盒（货号：P0011）、免疫染色通透液Triton X-100（货号：P0096）、结晶紫染色液（货号：C0121）购于上海碧云天公司；DHX9抗体（货号：sc-137232）购于美国Santa公司；Flag抗体（货号：F3165）购于美国Sigma公司；HA抗体（货号：26183）购于美国Thermo Fisher公司；β-actin抗体（货号：TA-09）购于北京中杉金桥公司；O-GlcNAc抗体（货号：ab2739）、OGT抗体（货号：ab177941）购于英国Abcam公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 所有细胞均用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素及100 μg/mL链霉素的DMEM培养基中培养，置于37 ℃、5% CO_2的细胞培养箱中。HepAD38细胞培养时加入1 μg/mL四环素以抑制HBV转录。10 cm培养皿培养的Huh7细胞贴壁后加入2 μL AdHBV1.3及5 μg/mL polybrene，12 h换液后继续培养3 d即可得到AdHBV1.3感染的Huh7肝癌细胞模型，即为Huh7-HBV1.3。

1.2.2 pAdTrack-TO4-DHX9-3Flag重组质粒构建 以pcDNA3.1-DHX9质粒为模板，聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）扩增DHX9目的片段（前引物：ATTTGCGGCCGCACCATGGGAGATGTGAAAAATTTTC；后引物：CGCGGATCCGTAGCCGCCGCCGCCGCCGGCCC），胶回收目的片段，利用限制性核酸内切酶*Bam*H Ⅰ及*Not* Ⅰ对目的片段和pSEB-3Flag载体进行双酶切再用乙醇沉淀法纯化，利用T4 DNA连接酶连接16 h后，将连接产物转化入DH10B感受态细胞中，经过菌落PCR筛选、酶切鉴定和DNA测序鉴定pSEB-DHX9-3Flag重组质粒。利用相同的方法将pSEB-3Flag-DHX9重组质粒构建至pAdTrack-TO4载体上得到pAdTrack-TO4-DHX9-3Flag重组质粒，PCR扩增前引物：ATTTGCGGCCGCACCATGGGAGATGTGAAAAATTTTC；后引物CCGCTCGAGTTAAATCTTATCGTCGTCATCCT。限制性核酸内切酶为*Not* Ⅰ和*Xho* Ⅰ。

1.2.3 DHX9重组腺病毒构建 pAdTrack-TO4-DHX9-3Flag重组质粒经*Pme* Ⅰ酶切线性化，电转至AdEasy-1 BJ5183感受态细胞。挑取单菌落加于2 mL含50 μg/mL卡那霉素的LB溶液中，37 ℃，2 000 r/min摇床过夜培养后通过Mini法提取质粒，*Pac* Ⅰ酶切鉴定后电转至DH10B感受态细胞，加500 μL LB溶液，移取部分菌液涂于卡那霉素抗性的LB固体平板上，37 ℃培养过夜。次日挑取单菌落置于4 mL含卡那霉素的LB液中，37 ℃摇床孵育16 h后通过去内毒素试剂盒提取质粒，*Pac* Ⅰ酶切质粒后通过乙醇沉淀法纯化得到DHX9重组腺病毒质粒。将构建好的DHX9重组腺病毒质粒转染至HEK293细胞，当荧光产生彗星状后，细胞漂浮1/3时，收集腺病毒原液并继续扩增5轮至高滴度。

1.2.4 Western blot 细胞处理48 h后提取总蛋白，BCA定量细胞蛋白浓度。50 μg蛋白样本中加入6×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液煮沸变性，经电泳后转移至PVDF膜上，5%封闭液室温封闭1 h，4 ℃孵育一抗过夜。次日室温孵育相应的二抗1 h，1×TBST洗膜3次，加入ECL化学发光试剂显影。

1.2.5 免疫荧光实验 细胞处理后，以30%的密度铺于放有细胞爬片的12孔板中，24 h后移去培养基，1 mL 4%冷的多聚甲醛固定25 min。滴加0.1% Triton X-100通透处理15 min。滴加山羊血清封闭液室温封闭1 h。4 ℃孵育一抗过夜（置于湿盒中）。次日滴加适量的荧光二抗避光室温孵育2 h。DAPI处理5 min。防荧光淬灭封片剂封片后置于激光共聚焦显微镜下观察。采用Image J软件进行免疫荧光的定量和统计分析，采用Pearson相关系数r描述蛋白之间的共定位关系（当$0.49<r\leq1$时，表示2种蛋白存在强共定位关系）[19]。

1.2.6 免疫沉淀实验 细胞用IP细胞裂解液（含1×蛋白酶抑制剂Cocktail和1 mmol/L PMSF）冰上裂解10 min后刮下细胞。超声（30%功率，工作10 s，停10 s，一共3次）裂解细胞后，置于4 ℃离心机中13 000×g离心15 min。留取50 μL上清作为Input。余下蛋白加入20 μL已洗涤proteinA/G磁珠封闭，弃磁珠后加入5 μg Flag或HA抗体置于4 ℃旋转孵育过夜。然后加至40 μL已洗涤proteinA/G磁珠中室温旋转孵育4 h。收集磁珠，加入2×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液煮沸变性，Western blot检测蛋白表达情况。

1.2.7 琥珀酰化小麦胚芽凝集素（succinylated wheat germ agglutinin，sWGA）实验 细胞弃去培养基，加入300 μL含1×蛋白酶抑制剂Cocktail和1 mmol/L PMSF的细胞裂解液（50 mmol/L Tris-Cl，125 mmol/L NaCl，5 mmol/L EDTA，1% Triton X-100）冰上裂解30 min，每5 min振荡一次。置于4 ℃离心机中13 000×g离心15 min。取50 μL上清作为Input。采用Western blot调齐各孔的DHX9水平后，余下蛋白利用终浓度为1 250 U/mL的PNGase处理。设置阴性对照组及实验组。阴性对照组：20 μL已洗涤的sWGA琼脂糖珠中加入0.5 mol/L GlcNAc置于4 ℃封闭sWGA珠子2 h，最后加入PNGase处理后的组织蛋白样品，用细胞裂解液补齐到500 μL；实验组：PNGase处理后的组织蛋白样品加至20 μL已洗涤的sWGA琼脂糖珠中，用细胞裂解液补齐到500 μL。实验组及对照组均置于4 ℃旋转过夜。次日，过夜样本置于4 ℃离心机5 000×g离心1 min，弃上清。用500 μL预冷的细胞裂解液洗涤沉淀3次。在洗涤后的沉淀中加入适量2×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液，水浴煮沸变性10 min。Western blot检测蛋白含量。

1.2.8 细胞增殖实验 以每孔8×10^2个Huh7-HBV1.3细胞接种于96孔板中（设置3个复孔），37 ℃、5% CO_2条件下培养6 d。每隔48 h更换培养基，培养基中含相应药物（25 nmol/L DMSO或25 nmol/L OGT抑制剂OSMI-1）。通过细胞动态检测仪（ESCO，CCL-170T-8，Singapore）每24 h检测1次细胞增殖密度。

1.2.9 克隆形成实验 以每孔8×10^2个细胞的浓度将Huh7-HBV1.3细胞接种于6孔板中（设置3个复孔），置于37 ℃、5% CO_2条件下培养。每隔48 h更换培养基，培养基中含相应药物（25 nmol/L DMSO或25 nmol/L OSMI-1）。待6孔板中细胞形成细胞集落时（1~2周）去除培养基进行结晶紫染色。

1.3 统计学方法

使用GraphPad Prism 8.0软件进行作图及数据处理。计量资料的数据来自3次独立重复实验的结果，采用*Shapiro-Wilk*检验进行正态性检验，采用*Brown-Forsythe*检验方差齐性。正态分布的数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组比较采用单因素方差分析。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 DHX9重组腺病毒的构建与鉴定

pAdTrack-TO4-DHX9-3Flag重组质粒（图1A）经*Not* Ⅰ和*Xho* Ⅰ酶切鉴定正确（图1B），然后将2号pAdTrack-TO4-DHX9-3Flag重组质粒转染至HEK293细胞中包装、扩增为重组腺病毒AdDHX9。将DHX9重组腺病毒感染HEK293细胞，6 d后可见彗星状荧光（图1C），当细胞漂浮1/3时，收集

腺病毒并继续扩增 5 轮至高滴度。通过 Western blot 检测 AdDHX9 过表达效果：相较于 AdGFP 对照组（1.126 ± 0.239），AdDHX9 组（3.342 ± 0.476）中的蛋白表达水平升高（P<0.001，图 1D~E）。

2.2　DHX9 与 OGT 相互作用

本课题组前期通过 O-GlcNAc 修饰蛋白质组学在 O-GlcNAc 修饰蛋白复合物中筛选到了 DHX9 蛋白（图 2A）[18]，提示 DHX9 可能发生 O-GlcNAc 修饰。为了检测 DHX9 与 O-GlcNAc 修饰之间的关系，通过 Co-IP 技术检测了 DHX9 是否与 OGT 发生相互作用。结果显示，在 OGT 富集的蛋白复合物中检测到 DHX9 表达（图 2B），同时在 DHX9 富集的蛋白复合物中检测到 OGT 表达（图 2C），说明 DHX9 能够与 OGT 发生相互作用；免疫荧光实验显示，DHX9 与 OGT 存在共定位关系，且共定位于细胞核（图 2D~E）。以上结果提示，DHX9 与 OGT 存在相互作用。

2.3　DHX9 可以发生 O-GlcNAc 修饰

为了进一步检测 DHX9 是否能够发生 O-GlcNAc 修饰，本研究在 Huh7 细胞中通过 sWGA 实验在 O-GlcNAc 修饰蛋白复合物中检测到 DHX9 存在，并且在 OGT 抑制剂 OSMI-1 处理后 DHX9 O-GlcNAc 修饰水平下调，在 OGA 抑制剂 TMG 处理后上调（图 3A），糖基化 IP 实验得到了相似的结果（图 3B）。以上结果提示，DHX9 能够发生 O-GlcNAc 修饰。

2.4　DHX9 O-GlcNAc 修饰增加 DHX9 蛋白水平

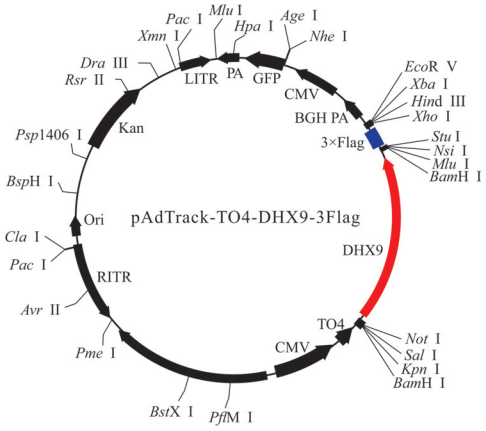
随后，在 HepAD38 细胞中检测了 DHX9 O-GlcNAc 修饰对自身蛋白水平的影响。Western blot 结果显示，TMG 处理可以上调 DHX9 蛋白水平，而 OSMI-1 处理会下调 DHX9 蛋白水平（图 4A），说明 DHX9 O-GlcNAc 修饰增强 DHX9 蛋白水平。在 Huh7 细胞中，也得到了类似的结果（图 4B）。

2.5　HBV 增强 DHX9 O-GlcNAc 修饰水平

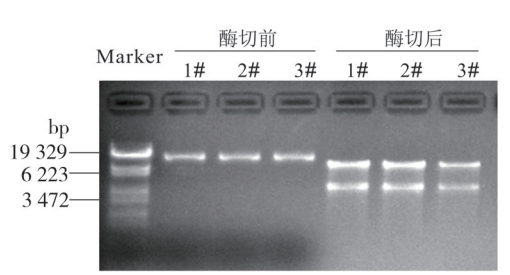
然后，本课题组研究了 HBV 感染对 DHX9 O-GlcNAc 修饰的影响。在 HepAD38 细胞中，外源性 sWGA 实验发现 HBV 复制后 sWGA 可以富集更多的 DHX9，表明 HBV 复制增强了 DHX9 O-GlcNAc 修饰水平（图 5A），内源性 sWGA 得到了相同的结果（图 5C）。进一步通过 Huh7-HBV1.3 细胞发现 OSMI-1 处理下调 DHX9 O-GlcNAc 水平，而 TMG 处理上调 DHX9 O-GlcNAc 水平（图 5B）。内源性 sWGA 得到了相同的结果（图 5D）。糖基化 IP 实验发现，在 HBV 复制样本中，Flag 抗体富集的蛋白复合物内可以检测到更多的 DHX9 O-GlcNAc 蛋白（图 5E），并且在 OSMI-1 处理后 DHX9 O-GlcNAc 修饰减少，而 TMG 处理后 DHX9 O-GlcNAc 增加（图 5F）。以上研究结果表明，HBV 复制增强 DHX9 O-GlcNAc 修饰。

2.6　DHX9 O-GlcNAc 修饰促进 HBV 相关 HCC 细胞的增殖能力

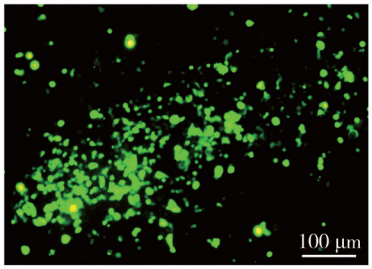
最后，本课题组检测了 DHX9 O-GlcNAc 修饰对 HBV 相关 HCC 细胞增殖能力的影响。克隆形成实验显示，与 AdGFP 对照组（142.667 ± 7.572）相比，AdDHX9 组（386.667 ± 15.630）的细胞克隆数量增加（P<0.001），而 OSMI-1 处理后，AdDHX9 组（163.333 ± 10.260）细胞的细胞克隆数量降低（P<0.001）（图 6A~B）。细胞生长曲线结果显示，AdDHX9 组（22.860 ± 0.770）比 AdGFP 对照组（13.670 ± 0.517）的细胞整体生长速率增加（P<0.001），而 OSMI-1 处理后，AdDHX9 组（15.240 ± 0.480）细胞的细胞整体生长速率减慢（P<0.000，图 6C）。以上研究结果说明 DHX9 的 O-GlcNAc 修饰促进 HBV 相关 HCC 细胞增殖能力。



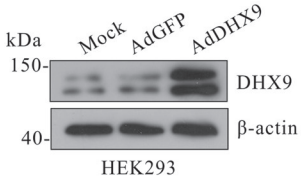
A. pAdTrack-TO4-DHX9-3Flag重组质粒图谱



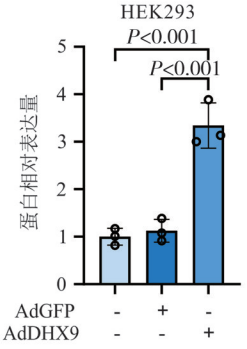
B. pAdTrack-TO4-DHX9-3Flag重组质粒经*Not* Ⅰ和*Xho* Ⅰ酶切后进行琼脂糖凝胶电泳



C. HEK293细胞中包装DHX9重组腺病毒6 d出现彗星状荧光

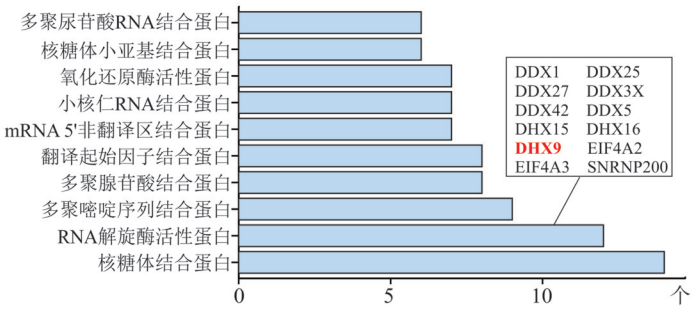


D. Western blot检测DHX9蛋白表达情况

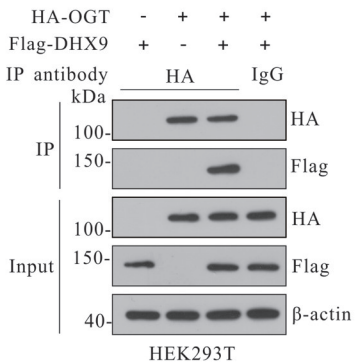


E. DHX9蛋白的相对表达量

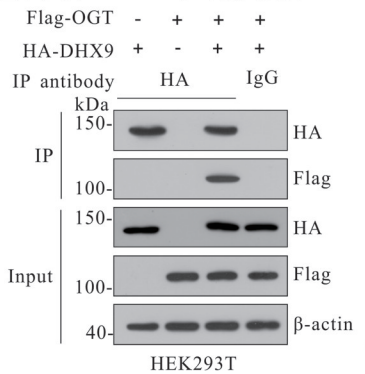
图 1　AdDHX9 重组腺病毒的构建与鉴定



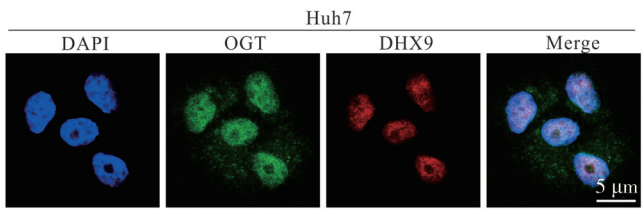
A. 在HepAD38细胞中，O-GlcNAc修饰蛋白质组学检测O-GlcNAc修饰相关蛋白



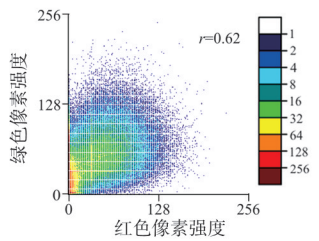
B. 在HEK293T细胞中共转染Flag-DHX9和HA-OGT重组质粒，采用HA抗体进行Co-IP实验检测DHX9与OGT的相互作用



C. 在HEK293T细胞中共转染Flag-OGT和HA-DHX9重组质粒，采用HA抗体进行Co-IP实验检测DHX9与OGT的相互作用

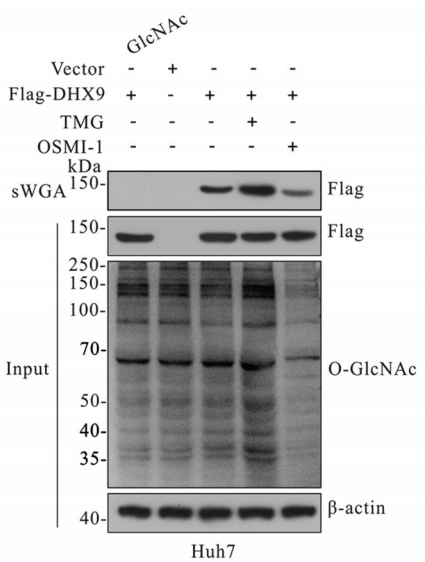


D. 在Huh7细胞中，免疫荧光实验检测DHX9与OGT的细胞定位

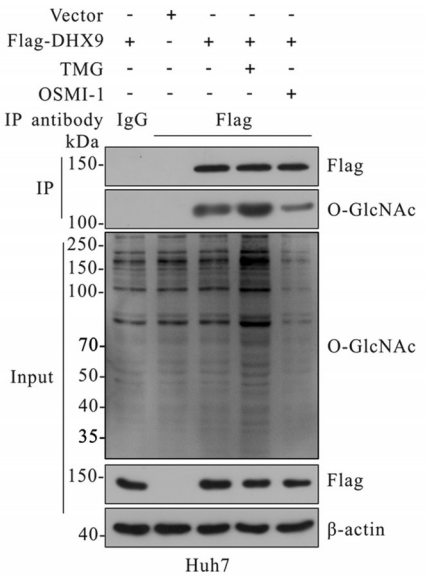


E. 在Huh7细胞中，免疫荧光检测DHX9与OGT共定位的定量图

图2　DHX9与OGT相互作用

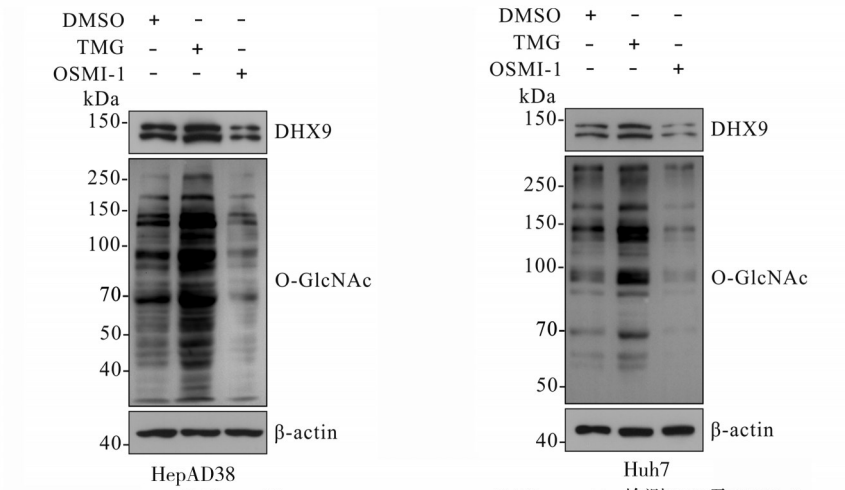


A. 在Huh7细胞中，sWGA实验检测DHX90-GlcNAc修饰水平



B. 在Huh7细胞中，糖基化IP实验检测DHX90-GlcNAc修饰水平

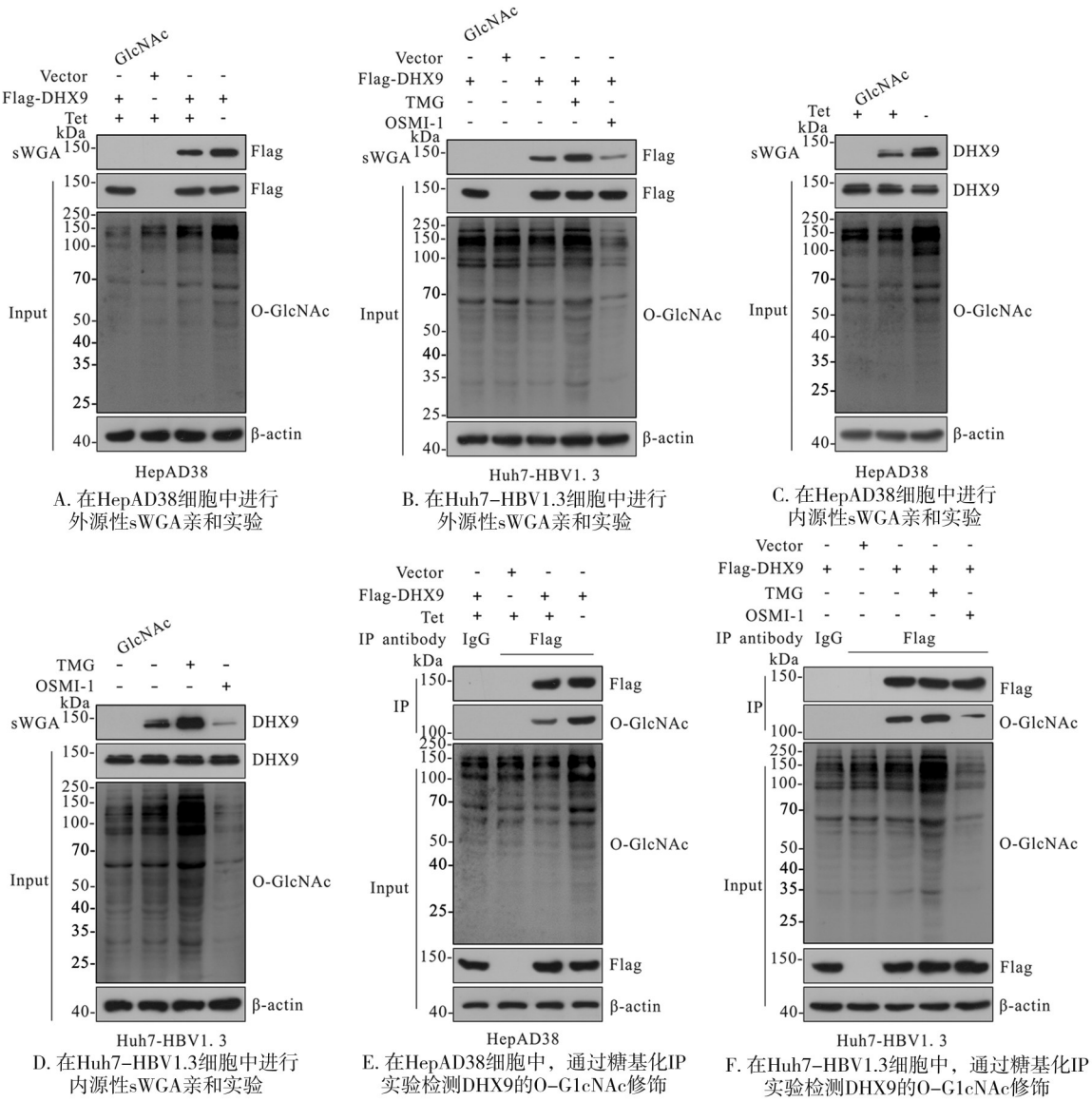
图3　DHX9 O-GlcNAc修饰检测



A. Western blot检测TMG及OMSI-1对HepAD38细胞中DHX9蛋白水平的影响

B. Western blot检测TMG及OMSI-1对Huh7细胞中DHX9蛋白水平的影响

图4　DHX9 O-GlcNAc修饰对DHX9蛋白水平的影响



A. 在HepAD38细胞中进行外源性sWGA亲和实验

B. 在Huh7-HBV1.3细胞中进行外源性sWGA亲和实验

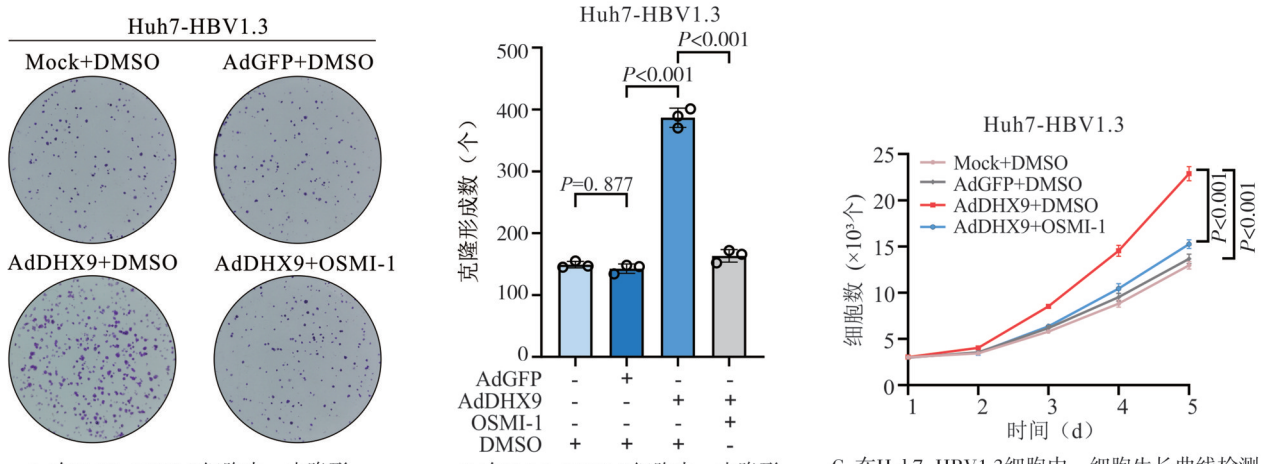
C. 在HepAD38细胞中进行内源性sWGA亲和实验

D. 在Huh7-HBV1.3细胞中进行内源性sWGA亲和实验

E. 在HepAD38细胞中，通过糖基化IP实验检测DHX9的O-GlcNAc修饰

F. 在Huh7-HBV1.3细胞中，通过糖基化IP实验检测DHX9的O-GlcNAc修饰

图5　HBV增强DHX9 O-GlcNAc修饰水平



A. 在Huh7-HBV1.3细胞中，克隆形成实验检测肝癌细胞增殖情况

B. 在Huh7-HBV1.3细胞中，克隆形成实验检测肝癌细胞增殖的定量图

C. 在Huh7-HBV1.3细胞中，细胞生长曲线检测肝癌细胞增殖情况，细胞贴壁当天记为1 d

图6　DHX9 O-GlcNAc修饰促进HBV相关HCC细胞增殖能力

3　讨　论

DHX9蛋白翻译后修饰在多种疾病如肝癌[16]、乳腺癌[20]、食管鳞状细胞癌[21]的发生发展中扮演着重要角色。研究发现，LINC01016可抑制DHX9泛素化修饰和降解，增强DHX9蛋白稳定性，激活PI3K/AKT信号通路，促进三阴性乳腺癌细胞的增殖和侵袭[20]。DHX9 SUMO化修饰可调节细胞R环平衡，DHX9 K120位点上的SUMO化修饰可导致细胞R环失调，引起DNA损伤和诱发细胞凋亡[22]；DHX9的磷酸化促进其与RNA结合蛋白的相互作用从而调控R环平衡，DHX9 S321位点去磷酸化抑制DHX9与RNA结合蛋白的相互作用，导致细胞对DNA损伤的敏感性增加和细胞凋亡[23]。本研究中，本课题组首次鉴定了DHX9蛋白的一种新型翻译后修饰-O-GlcNAc修饰，并在HBV相关HCC细胞中发现HBV复制增强DHX9的O-GlcNAc修饰水平。首先通过免疫共沉淀证实了DHX9与OGT的相互作用，免疫荧光实验进一步发现DHX9与OGT共定位于细胞核；然后通过sWGA实验及糖基化IP实验证实DHX9能够发生O-GlcNAc修饰，并利用TMG及OSMI-1处理证实DHX9 O-GlcNAc修饰可以调控DHX9蛋白水平；进一步在HepAD38细胞及Huh7-HBV1.3细胞中证实了HBV感染能够促进DHX9的O-GlcNAc修饰。

蛋白质翻译后修饰（如磷酸化、泛素化、甲基化、乙酰化等）可能存在相互串扰，共同参与蛋白质功能的调控。例如，跨膜和泛素样结构域蛋白1可以与PD-L1相互作用，抑制PD-L1 K281的泛素化，增强PD-L1 N-GlcNAc修饰和蛋白稳定性，从而促进肿瘤免疫逃逸[24]。p21活化激酶与雄激素受体（androgen receptor，AR）发生相互作用，增强AR S578位点的磷酸化水平进而促进AR泛素化降解最终抑制前列腺癌细胞的迁移[25]。研究报道，在HBV相关HCC中，HBx诱导UHRF2 S643磷酸化，抑制UHRF2的E3泛素连接酶活性，导致DHX9经泛素-蛋白酶体途径的降解减少，提高了DHX9蛋白水平，从而增强HBV的复制并促进肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力[16]；此外，HBx与DHX9发生相互作用，抑制鼠双微体基因2介导的DHX9泛素化修饰，从而上调DHX9蛋白水平[17]。本研究中发现HBV感染可以增强DHX9 O-GlcNAc修饰水平。因此，推测HBV可能通过抑制HBx介导的DHX9泛素化修饰，增加DHX9 O-GlcNAc修饰，增强DHX9蛋白的稳定性和水平，这将在本课题组今后研究中进一步探讨。

DHX9与多种肿瘤的发生相关，在不同肿瘤中发挥促癌或抗癌的功能[21,26-28]。在结直肠癌中，DHX9通过激活NF-κB信号通路促进结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭，抑制细胞凋亡[26]。在食管鳞状细胞癌（oesophageal squamous carcinoma cells，ESCC）中，小核仁RNA42与DHX9相互作用抑制DHX9泛素化降解，同时触发DHX9/p65轴促进ESCC细胞增殖、迁移和侵袭[21]。DHX9也是一种肿瘤抑制因子。例如，DHX9可通过STAT3抑制肺腺癌上皮-间充质转化从而抑制肺腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的能力[27-28]。本研究首次鉴定了DHX9 O-GlcNAc修饰

对HBV相关HCC细胞增殖能力的影响。在Huh7-HBV1.3细胞中通过克隆形成实验、细胞生长曲线发现DHX9 O-GlcNAc修饰促进HBV相关HCC细胞增殖能力，而OSMI-1处理后减弱了DHX9促进肝癌细胞增殖的效应，说明DHX9 O-GlcNAc修饰可增强HBV相关HCC细胞的增殖能力，这与现有文献报道的结果一致[15-16,29-30]。研究发现，DHX9通过抑制肝癌细胞凋亡和促使上皮间质转化，从而调控肝癌细胞增殖、侵袭、迁移等恶性生物学行为[15]。引起细胞凋亡的因素可以分为内源性和外源性两大类，其中DNA损伤是细胞凋亡的重要的内源性诱导因素之一[31]。DNA损伤的研究中，R环对基因组稳定性具有重要的调控作用。R环是基因转录过程中形成的一种由单链DNA和DNA：RNA杂交体组成的三链核酸结构，其广泛参与肿瘤的发生发展过程[32]。DHX9作为一种解旋酶，其在消除R环、维持基因正常转录过程中发挥了重要作用[33]。例如，研究报道DHX9能够被组蛋白修饰阅读器TDRD3招募至靶基因的启动子处，以解旋酶活性依赖的方式解除TDRD3靶基因启动子处的“R环[34]。因此，DHX9 O-GlcNAc修饰可能通过消除R环以维持基因正常转录，从而减少DNA损伤和抑制肝癌细胞凋亡，增强HBV相关HCC细胞的增殖，这也是未来研究中需要深入探究的内容。

O-GlcNAc修饰在肝癌的发生发展中扮演着重要角色。例如，磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶1的缺失增强细胞周期检测点激酶CHK2蛋白的O-GlcNAc修饰，导致肝癌细胞增殖[35]。S期激酶相关蛋白2 O-GlcNAc修饰可促进细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子p27和p21的泛素化修饰和蛋白质降解，调控细胞周期G_1~S期进而促进肝癌细胞增殖[36]。以上研究均表明，靶向干预O-GlcNAc修饰是一种潜在的肝癌治疗新策略。本研究首次鉴定了DHX9蛋白也能发生O-GlcNAc修饰，并且HBV感染可以增强DHX9 O-GlcNAc修饰水平，这些研究结果可为靶向干预DHX9 O-GlcNAc修饰治疗HBV相关HCC提供了新的靶点和理论支持。

本研究也存在一定的局限性，主要体现在尚未对DHX9的O-GlcNAc修饰位点进行详细鉴定，采用TMG和OSMI-1处理细胞可能存在一定的实验偏差；DHX9 O-GlcNAc修饰如何影响HBV相关HCC的其他恶性生物学功能仍需进一步探讨；DHX9的完整O-GlcNAc修饰位点图谱及O-GlcNAc修饰对DHX9蛋白质亚细胞定位、活性等需要深入研究。

综上所述，本研究发现HBV感染可以增强DHX9 O-GlcNAc修饰水平，促进HBV相关HCC细胞的增殖，这些结果为研究HBV相关HCC发生发展的机制提供了理论支持。

参 考 文 献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] 黄 罡, 谢 青, 贺 佳, 等. 乙型肝炎病毒相关肝细胞癌抗病毒治疗中国专家共识(2023年版)[J]. 肝脏, 2023, 28(1): 1-10.
Huang G, Xie Q, He J, et al. Chinese expert consensus on antiviral therapy for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma (2023 edition)[J]. Chin Hepatol, 2023, 28(1): 1-10.

[3] Xue X, Liao W, Xing Y. Comparison of clinical features and outcomes between HBV-related and non-B non-C hepatocellular carcinoma[J]. Infect Agent Cancer, 2020, 15: 11.

[4] Du DY, Liu C, Qin MY, et al. Metabolic dysregulation and emerging therapeutical targets for hepatocellular carcinoma[J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(2): 558-580.

[5] Zhu Y, Zhao Y, Ning Z, et al. Metabolic self-feeding in HBV-associated hepatocarcinoma centered on feedback between circulation lipids and the cellular MAPK/mTOR axis[J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1): 280.

[6] Yang Y, Yan Y, Yin JX, et al. O-GlcNAcylation of YTHDF2 promotes HBV-related hepatocellular carcinoma progression in an N6-methyladenosine-dependent manner[J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8: 63.

[7] Paneque A, Fortus H, Zheng J, et al. The hexosamine biosynthesis pathway: regulation and function[J]. Genes (Basel), 2023, 14(4): 933.

[8] Zhang J, Xun M, Li CJ, et al. The O-GlcNAcylation and its promotion to hepatocellular carcinoma[J]. Biochim Biophys Acta BBA Rev Cancer, 2022, 1877(6): 188806.

[9] Zhou P, Chang WY, Gong DA, et al. O-GlcNAcylation of SPOP promotes carcinogenesis in hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 2023, 42: 725-736.

[10] 彭佳欣, 张自辉, 刘婧纯, 等. O-GlcNAc糖基化修饰在恶性肿瘤中作用的研究进展[J]. 山东医药, 2024, 64(13): 98-102.
Peng JX, Zhang ZH, Liu JC, et al. Research progress of O-GlcNAc glycosylation modification in malignant tumors[J]. Shandong Med J, 2024, 64(13): 98-102.

[11] Lee CG, Eki T, Okumura K, et al. The human RNA helicase A (DDX9) gene maps to the prostate cancer susceptibility locus at chromosome band 1q25 and its pseudogene (DDX9P) to 13q22, respectively [J]. Somat Cell Mol Genet, 1999, 25(1): 33-39.

[12] Zhang S, Grosse F. Domain structure of human nuclear DNA helicase Ⅱ (RNA helicase A)[J]. J Biol Chem, 1997, 272(17): 11487-11494.

[13] Gulliver C, Hoffmann R, Baillie GS. The enigmatic helicase DHX9 and its association with the hallmarks of cancer[J]. Future Sci OA, 2020, 7(2): FSO650.

[14] 吴源兵，吴新强，何良梅，等. DHX9：恶性肿瘤治疗的新靶点[J]. 赣南医学院学报，2017，37(4)：620-625.
Wu YB, Wu XQ, He LM, et al. DHX9: a new therapeutic target on the treatment of cancer[J]. J Gannan Med Univ, 2017, 37(4): 620-625.

[15] Shi F, Cao S, Zhu Y, et al. High expression of DHX9 promotes the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Lab Anal, 2021, 35(12): e24052.

[16] Wu KJ, Zhang YQ, Liu YX, et al. Phosphorylation of UHRF2 affects malignant phenotypes of HCC and HBV replication by blocking DHX9 ubiquitylation[J]. Cell Death Discov, 2023, 9: 27.

[17] Shen B, Chen Y, Hu J, et al. Hepatitis B virus X protein modulates upregulation of DHX9 to promote viral DNA replication[J]. Cell Microbiol, 2020, 22(3): e13148.

[18] Hu J, Gao Q, Yang Y, et al. Hexosamine biosynthetic pathway promotes the antiviral activity of SAMHD1 by enhancing O-GlcNAc transferase-mediated protein O-GlcNAcylation[J]. Theranostics, 2021, 11(2): 805-823.

[19] Zinchuk V, Wu Y, Grossenbacher-Zinchuk O. Bridging the gap between qualitative and quantitative colocalization results in fluorescence microscopy studies[J]. Sci Rep, 2013, 3: 1365.

[20] Sun Y, Zhang H, Ma RR, et al. ETS-1-activated LINC01016 over-expression promotes tumor progression *via* suppression of RFFL-mediated DHX9 ubiquitination degradation in breast cancers[J]. Cell Death Dis, 2023, 14: 507.

[21] Shan YN, Wei SS, Xiang XH, et al. SNORA42 promotes oesophageal squamous cell carcinoma development through triggering the DHX9/p65 axis[J]. Genomics, 2021, 113(5): 3015-3029.

[22] Yang BZ, Liu MY, Chiu KL, et al. DHX9 SUMOylation is required for the suppression of R-loop-associated genome instability[J]. Nat Commun, 2024, 15: 6009.

[23] Liu MY, Lin KR, Chien YL, et al. ATR phosphorylates DHX9 at serine 321 to suppress R-loop accumulation upon genotoxic stress[J]. Nucleic Acids Res, 2024, 52(1): 204-222.

[24] Shi CY, Wang Y, Wu MJ, et al. Promoting anti-tumor immunity by targeting TMUB1 to modulate PD-L1 polyubiquitination and glycosylation[J]. Nat Commun, 2022, 13: 6951.

[25] Liu T, Li Y, Gu H, et al. p21-Activated kinase 6(PAK6) inhibits prostate cancer growth *via* phosphorylation of androgen receptor and tumorigenic E3 ligase murine double minute-2(Mdm2)[J]. J Biol Chem, 2013, 288(5): 3359-3369.

[26] Liu SL, He LM, Wu JH, et al. DHX9 contributes to the malignant phenotypes of colorectal cancer *via* activating NF-κB signaling pathway[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(24): 8261-8281.

[27] Yan X, Chang J, Sun R, et al. DHX9 inhibits epithelial-mesenchymal transition in human lung adenocarcinoma cells by regulating STAT3[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(8): 4881-4894.

[28] Wang WP, Sun Y, Lu Q, et al. Gankyrin promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in NSCLC through forming a closed circle with IL-6/STAT3 and TGF-β/SMAD3 signaling pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(4): 5909-5923.

[29] Zhu G, Luo L, He Y, et al. AURKB targets DHX9 to promote hepatocellular carcinoma progression via PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Mol Carcinog, 2024, 63(9): 1814-1826.

[30] Yu J, Xu QG, Wang ZG, et al. Circular RNA cSMARCA5 inhibits growth and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2018, 68(6): 1214-1227.

[31] Mustafa M, Ahmad R, Tantry IQ, et al. Apoptosis: a comprehensive overview of signaling pathways, morphological changes, and physiological significance and therapeutic implications[J]. Cells, 2024, 13(22): 1838.

[32] Allison DF, Wang GG. R-loops: formation, function, and relevance to cell stress[J]. Cell Stress, 2019, 3(2): 38-46.

[33] Cristini A, Groh M, Kristiansen MS, et al. RNA/DNA hybrid interactome identifies DXH9 as a molecular player in transcriptional termination and R-loop-associated DNA damage[J]. Cell Rep, 2018, 23(6): 1891-1905.

[34] Yuan W, Al-Hadid Q, Wang ZH, et al. TDRD3 promotes DHX9 chromatin recruitment and R-loop resolution[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(15): 8573-8591.

[35] Xiang J, Chen C, Liu R, et al. Gluconeogenic enzyme PCK1 deficiency promotes CHK2 O-GlcNAcylation and hepatocellular carcinoma growth upon glucose deprivation[J]. J Clin Invest, 2021, 131(8): 144703.

[36] Feng ZQ, Yin JX, Zhang ZR, et al. O-GlcNAcylation of E3 ubiquitin ligase SKP2 promotes hepatocellular carcinoma proliferation[J]. Oncogene, 2024, 43: 1149-1159.

（责任编辑：周一青）

本文引用格式：
罗慧敏，皮雨博，陈彦猛，等. DExH-box 解旋酶 9 O-GlcNAc 修饰对 HBV 相关肝癌细胞增殖能力的影响[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(6)：799-807.