

乙型肝炎病毒基因的整合机制及对宿主的影响

哈明昊, 魏来

哈明昊, 北京大学肝病研究所、北京大学人民医院 北京市 100044

哈明昊, 男, 1976-02-09生, 江苏省徐州市人, 北京大学医学部博士, 主治医师, 主要从事病毒性肝炎、肝纤维化的临床研究。

通讯作者: 魏来, 100044, 北京市西直门南大街11号, 北京大学肝病研究所, 北京大学人民医院. weelai@163.com

电话: 010-68314422-5730 传真: 010-68322662

收稿日期: 2006-01-20 接受日期: 2006-02-09

摘要

乙型肝炎病毒是导致慢性肝炎、肝纤维化、肝细胞癌的主要病因, 目前认为乙型肝炎病毒基因整合在其致病机制中具有重要作用, 本文试就该领域内目前研究成果做一综述。

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因整合; 肝癌

哈明昊, 魏来. 乙型肝炎病毒基因的整合机制及对宿主的影响.

世界华人消化杂志 2006;14(8):743-746

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/743.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒是导致慢性肝炎、肝纤维化、肝细胞癌的主要病因^[1], 乙型肝炎病毒整合入肝细胞基因组被认为是肝细胞癌发生过程中的重要步骤. 本文将对乙型肝炎病毒不同感染阶段的整合、整合的方式、整合中HBV基因的状态、整合的机制、整合对宿主的影响, 分别进行一一阐述。

1 乙型肝炎病毒基因的整合

1.1 不同感染阶段的整合 乙型肝炎病毒整合入肝细胞基因组可见于大量的乙型肝炎病毒相关肝细胞癌标本中^[2-4]. 这一发现极大的推动了对于乙型肝炎病毒基因整合在肝细胞癌发病机制中地位的研究. 但是与逆转录病毒的感染不同, 乙型肝炎病毒的整合非病毒复制之必须, 因此在乙型肝炎病毒的自然史中, 其基因整合不是常规事件^[5]. 大多数的乙型肝炎病毒基因整合都发生于乙型肝炎病毒感染的晚期, 而在这一阶段往往已发生肝细胞的恶性转化^[6-7]. 在乙型肝炎感染的不同阶段均可检测到HBV DNA的整

合. Murakami *et al*^[8]以Alu-PCR法分别检测了19例急性乙肝患者、12例HBV相关慢性活动性肝炎患者、10例HCV相关慢性活动性肝炎患者的肝脏和PBMC标本. 在3例急性乙肝患者、全部12例HBV相关慢性活动性肝炎患者肝脏标本中发现病毒整合; 在4例HBV相关慢性活动性肝炎患者PBMC中发现病毒整合; 在一例急性乙肝患者的肝脏标本中, 发现HBV DNA整合于TNF诱导蛋白基因的内含子序列中. 这些结果提示在HBV急性感染的早期即存在HBV DNA的整合。

1.2 整合的方式 HBV基因整合方式分为I, II, III, IV. I起始于DR1向负链3'端延伸, II起始于DR1向负链5'端延伸, III起始于DR2向负链3'端延伸, IV起始于DR2向负链5'端延伸. 病毒与细胞连接序列丛集于DR1附近的I, II种方式比连接序列丛集于DR2附近的III, IV种方式更为常见, 大约是后者的3倍. 其中II种方式最常见, 大约见于46.6%的肝细胞癌标本中. DR1与DR2之间的序列也是病毒一病毒连接时最常选择的序列. 另外, preS-S也是病毒重组的常见序列. 这些序列对应于亚基因组HBV mRNA的转录起始序列, HBV mRNA的逆转录也有助于这些位点的基因整合. Tsuei *et al*^[9]以DR1、DR2序列设计引物检测了5例儿童HCC患者HBV整合序列及邻近整合序列的肝细胞基因序列. 发现在10个克隆株中有9株定位于DR1序列, 属I型整合方式; Southern blot分析显示5例肝癌组织标本中有2例含有人类长散布DNA功能元件(LINE-1)同源序列; 1例发现HBV整合于人类Y染色体RNA结合区基因序列(RBMY). RBMY基因通常见于成年人类精子细胞, 而在所有患者HCC周围正常肝细胞中均未检测到RBMY基因表达. 该研究结果提示HBV的整合及RBMY基因的激活可能与儿童HCC的发生过程有关。

1.3 整合中HBV基因的状态 整合入肝细胞基因组的均为乙型肝炎病毒基因组的部分序列, 在各个肝细胞癌标本中检测到的插入序列也各不相同^[10]. 由乙型肝炎病毒基因整合导致的肝细胞基因序列变异相应也出现极大的差异^[11]. 乙

■背景资料

近年来, 乙型肝炎病毒基因整合与原发性肝癌的相关性已经引起人们的重视, 已经有许多研究证明乙型肝炎病毒感染的原发性肝癌标本中存在广泛的基因整合现象, 提示乙型肝炎病毒整合在此类肝癌的发生中可能起重要作用, 本文对此具体的机制进行全面的综述。

■研发前沿

乙型肝炎病毒是导致慢性肝炎、肝纤维化、肝细胞癌的主要病因, 乙型肝炎病毒整合入肝细胞基因组被认为是肝细胞癌发生过程中的重要步骤. 本文对乙型肝炎病毒不同感染阶段的整合、整合的方式、整合中HBV基因的状态、整合的机制、整合对宿主的影响, 进行了——阐述。

■应用要点

对HBV不同感染阶段的整合、整合的方式、整合的机制等方面的研究将有助于人们阐明肝细胞恶性转化的具体机制,并为治疗提供依据。

型肝炎病毒以线性方式整合入人类肝细胞基因组,插入的序列通常包括经过重排的几个连续的读码框^[12]。靠近HBV DR1与DR2之间部分双链的序列是最常整合入肝细胞基因组的序列,大概占整合序列的2/3。通常整合入宿主肝细胞基因组的HBV序列包括:BCP, Enh II, X启动子及HBx序列。但是,大多数与HBV整合的宿主序列不是与肿瘤起源密切相关的癌基因家族或抑癌基因^[13]。Paterlini *et al*^[14]以Alu-PCR法检测了9例HCC患者中的9个HBV DNA整合位点,这9个位点分别为嗜神经性酪氨酸受体蛋白激酶2(NTRK2)基因、IL-1R相关激酶2(IRAK2)基因、P42有丝分裂激活蛋白激酶1(P42MAPK1)、环己六醇1, 4, 5磷酸酶受体基因(IP3R2)、IP3R1基因、SITA基因、甲状腺素激素不相配蛋白(TRUP)基因、及hTERT基因。Ferber *et al*^[15]在其研究中发现两例HBV整合入hTERT序列,有4个整合位点位于hTERT的启动子及上游调节序列,有5个整合位点位于hTERT的内含子3。所有HBV的整合均未改变hTERT的编码序列,但均发现HBV增强子并排于hTERT序列,该研究提示HBV的基因整合可能通过hTERT功能的改变发挥致癌作用。

1.4 整合的机制 Nagaya *et al*^[16]和Shih *et al*^[17]认为DR1和DR2是起始HBV负链和正链合成以及前基因组HBV DNA模板链转换的必须序列,病毒-病毒及病毒-细胞HBV DNA的整合丛集于DR1和DR2序列附近说明病毒复制的中间物即是病毒整合的底物。起始整合即是单股线性HBV DNA侵入宿主单链序列。整合序列丛集于HBV DNA黏性末端说明HBV DNA单链的5'端对于侵入细胞DNA序列具有重要作用。I和II两种方式更为常见则指明了HBV DNA负链对于HBV整合的重要作用。Wang *et al*^[18]认为可以用拓扑异构酶 I 对细胞和部分双链HBV DNA的切割来解释HBV DNA的整合。拓扑异构酶 I 是细胞内一类丰富的酶类,其作用是在DNA复制过程中松弛DNA的超螺旋结构。拓扑异构酶 I 调控的单链切割序列正位于HBV的黏性末端,因此设想通过拓扑异构酶 I 的作用使HBV DNA的部分双链结构得以松弛,并产生线性的HBV DNA以适于和异源细胞DNA结合。另外,拓扑异构酶 I 对HBV DNA的切割也会导致HBV DNA形成对细胞内核酸酶敏感的单链末端突出序列。这也有助于解释在HBV整合子中常见核酸序列的缺失。HBV家族中其他嗜肝病毒基因整合机制

与嗜人类HBV DNA基因整合机制有明显不同。Bruni *et al*^[19]发现在大约50%土拨鼠肝炎病毒(WHV)相关的土拨鼠HCC组织标本中,WHV的基因整合位点位于c-myc和N-myc等原癌基因序列内。WHV与myc基因的整合位点是多种多样的,常位于myc编码序列的上、下游。WHV的基因整合可能是通过增强子插入或整合于距离较远的win, b3n非编码序列而发挥激活N-myc2原癌基因活性。Bruni *et al*^[20]发现在win, b3n序列中均存在S/MAR调控元件,说明WHV的整合可能通过使S/MAR调控元件失活进而间接影响位于S/MAR上游的N-myc2基因的表达而发挥致癌作用。

2 整合对宿主的影响

Wang *et al*^[21]在一例患者中发现,在细胞周期蛋白A基因的第2内含子序列中有HBV的整合。细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶和细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制因子之间相互作用,在调控细胞分裂中具有重要作用。在这例患者中,细胞周期蛋白的前152个氨基酸被HBV的preS2/S的156个氨基酸置换,这一HBV与细胞周期蛋白A的融合蛋白显示出致肝细胞癌的活性。Dejean *et al*^[22]和Garcia *et al*^[23]发现HBV整合于类维生素受体(RAR) β 基因。RARs属于配体调控转录因子家族,其对于调控细胞分化和增殖具有重要作用。在HBV相关的HCC患者中,发现包括DR2、C基因、preS1基因在内的(第III种整合方式)HBV序列插入RAR β 基因序列中。这样产生的病毒-宿主融合蛋白包含了preS1的前29个密码子及RAR β 基因的上游DNA结合区。由于HBV整合子包含有preS1启动子,因此preS1启动子即可以起始preS1-RAR β 融合蛋白的转录翻译。该研究结果提示,HBV preS1序列与RAR β 序列的融合导致该融合蛋白的过量表达并提高了RAR β 致肝细胞癌的活性。

近来一些学者研究乙型肝炎病毒基因整合对端粒酶转式激活作用的影响。Izumi *et al*^[24]认为正常细胞的恶性转化与端粒酶的活性及端粒活性的稳定密切相关。对端粒酶活性的调控主要是通过对端粒酶催化亚基因组序列及人类端粒逆转录酶(hTERT)的转录调控。包括原癌基因产物(如C-myc)、肿瘤抑制基因产物(如WT1和P53)在内的转录因子,其过量表达时都能够调控hTERT的转录。hTERT也是HBV的常见整合位点。由于目前对乙型肝炎病毒感染研究手段的欠缺,

除对HCC患者手术标本和肝活检标本的研究外, 一些学者试图通过对HBV整合细胞株的研究来阐明HBV整合的机制。

Maura *et al*^[25]以Southern blot方法分析整合了HBV DNA的HepG₂ 2.2.15细胞株的亚克隆基因组DNA. 发现经过4代连续培养后, 在HepG₂ 2.2.15细胞株中可观察到新增10%的HBV整合位点, 而原来的HBV DNA整合位点没有丢失; 以增加细胞DNA损伤的H₂O₂处理HepG₂ 2.2.15细胞株后, 可观察到新增的HBV整合位点达到50%; 以通过抑制ADP核糖基磷酸化进而处理抑制细胞DNA损伤修复HepG₂ 2.2.15细胞株后, 亦可观察到新增的HBV整合位点达到50%. 这些研究结果提示: 在HBV持续感染过程中, 由于氧化作用导致细胞DNA链的损伤可能增加HBV DNA的整合。

Livezey *et al*^[26]检测亲代不分泌HBV的HepG₂、已转染了HBV的HepG₂ 2.2.15(HBV复制)和HepG₂ T14.1(无HBV复制)细胞株在病毒压力下的活性改变. 经比较发现, HepG₂ T14.1细胞株生长最快, HepG₂ 2.2.15细胞株生长最慢. 在转染了HBV的两株细胞中均有HBV DNA的整合, RT-PCR亦可见HBX蛋白表达. 将三株细胞分别接种裸鼠, 三周后接种HepG₂ 2.2.15和HepG₂ T14.1细胞株的裸鼠形成肝细胞癌, 接种HepG₂细胞株的裸鼠无肿瘤形成. 接种HepG₂ 2.2.15的裸鼠肝脏中检测到一个新的HBV DNA整合位点, 接种HepG₂ T14.1的裸鼠肝脏中无新的HBV DNA整合位点. 从裸鼠体内重新提取获得的HepG₂ 2.2.15细胞株可以继续复制HBV DNA, 并保留了新的HBV DNA整合位点, 及细胞基因组重排和p53等位基因LOH的缺失. Western blot分析显示在该细胞株中存在P21/Waf1蛋白表达上调。

总之, 目前, 各方学者对HBV DNA与肝细胞基因整合的课题进行了大量研究, 取得了相当的进展, 基本弄清了HBV DNA整合的方式, 最常见的与之整合的肝细胞基因序列, 并初步探讨了HBV DNA基因整合与致肝细胞癌之间的关系. 但目前还存在以下问题. 首先, 嗜人类的HBV DNA的基因整合与WHV DNA的基因整合有很大不同, 多数并未与原癌基因及抑癌基因整合, 因此其致肝细胞癌的机制亟待阐明. 但是人类对其自身基因组结构及功能的研究尚未完善, 是否还有其他与肿瘤发生密切相关的基因组未被发现? 因此不应忽视最常见的与HBV

DNA整合的肝细胞基因功能的研究. 第二, HBV DNA整合后常见肝细胞基因的突变, 同时整合后HBV序列表达的蛋白亦为缺陷型, 对于突变后肝细胞基因表达产物及缺陷型HBV功能蛋白的研究所见报道不多, 而对此两种蛋白的研究对HBV致肝细胞癌的机制及宿主肝细胞功能活性的研究较有帮助. 第三, 目前对HBV DNA在抗病毒药物压力作用下整合机制有无改变的研究所见不多. 第四, 目前HBV DNA基因整合研究所用的实验模型多为HCC组织标本或HepG₂细胞株, 这两种模型中HBV DNA已稳定的整合入肝细胞基因组, 是一种静态的结果; 我们所要了解的HBV DNA基因整合是一种动态的过程. 因此, 理想的HBV DNA整合模型的欠缺是当前研究阶段最大的瓶颈. 所以, 下一阶段我们还有很多工作要做。

3 参考文献

- 1 Ljumovic D, Diamantis I, Alegakis AK, Kouroumalis EA. Differential expression of matrix metalloproteinases in viral and non-viral chronic liver diseases. *Clin Chim Acta* 2004; 349: 203-211
- 2 Cougot D, Neuveut C, Buendia MA. HBV induced carcinogenesis. *J Clin Virol* 2005; 34: S75-S78
- 3 Tamori A, Nishiguchi S, Kubo S, Narimatsu T, Habu D, Takeda T, Hirohashi K, Shiomi S. HBV DNA integration and HBV-transcript expression in non-B, non-C hepatocellular carcinoma in Japan. *J Med Virol* 2003; 71: 492-498
- 4 Paterlini-Brechot P, Saigo K, Murakami Y, Chami M, Gozuacik D, Mugnier C, Lagorce D, Brechot C. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene* 2003; 22: 3911-3916
- 5 Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanoue T, Brechot C, Paterlini-Brechot P. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut* 2005; 54: 1162-1168
- 6 Tamori A, Yamanishi Y, Kawashima S, Kanehisa M, Enomoto M, Tanaka H, Kubo S, Shiomi S, Nishiguchi S. Alteration of gene expression in human hepatocellular carcinoma with integrated hepatitis B virus DNA. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5821-5826
- 7 Hassoun Z, Gores GJ. What surgeons should know about viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2003; 12: 1-11
- 8 Murakami Y, Minami M, Daimon Y, Okanoue T. Hepatitis B virus DNA in liver, serum, and peripheral blood mononuclear cells after the clearance of serum hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol* 2004; 72: 203-214
- 9 Tsuei DJ, Chang MH, Chen PJ, Hsu TY, Ni YH. Characterization of integration patterns and flanking cellular sequences of hepatitis B virus in childhood hepatocellular carcinomas. *J Med Virol*

■名词解释

HBV基因整合方式分为I, II, III, IV. I起始于DR1向负链3'端延伸, II起始于DR1向负链5'端延伸, III起始于DR2向负链3'端延伸, IV起始于DR2向负链5'端延伸. 病毒与细胞连接序列丛集于DR1附近的I, II种方式比连接序列丛集于DR2附近的III, IV种方式更为常见, 大约是后者的3倍. 其中II种方式最常见, 大约见于46.6%的肝细胞癌标本中. DR1与DR2之间的序列也是病毒-病毒连接时最常选择的序列. 另外, preS-S也是病毒重组的常见序列. 这些序列对应于亚基因组的HBV mRNA的转录起始序列, HBV mRNA的逆转录也有助于这些位点的基因整合。

■同行评价

本文将近年来国内外"乙型肝炎病毒基因整合的机制及对宿主的影响"等方面的研究进展进行综述,选题热门,学术价值较高,文字质量良好,文献引用广泛,有一定的学术价值和新颖性。

- 2002; 68: 513-521
- 10 Tamori A, Nishiguchi S, Kubo S, Enomoto M, Koh N, Takeda T, Shiomi S, Hirohashi K, Kinoshita H, Otani S. Sequencing of human-viral DNA junctions in hepatocellular carcinoma from patients with HCV and occult HBV infection. *J Med Virol* 2003; 69: 475-481
- 11 Jayshree RS, Sridhar H, Devi GM. Surface, core, and X genes of hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma: an in situ hybridization study. *Cancer* 2003; 99: 63-67
- 12 Kimbi GC, Kramvis A, Kew MC. Integration of hepatitis B virus DNA into chromosomal DNA during acute hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6416-6421
- 13 Huang TH, Zhang QJ, Xie QD, Zeng LP, Zeng XF. Presence and integration of HBV DNA in mouse oocytes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2869-2873
- 14 Paterlini-Brechot P, Saigo K, Murakami Y, Chami M, Gozuacik D, Mugnier C, Lagorce D, Brechot C. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene* 2003; 22: 3911-3916
- 15 Ferber MJ, Montoya DP, Yu C, Aderca I, McGee A, Thorland EC, Nagorney DM, Gostout BS, Burgart LJ, Boix L, Bruix J, McMahon BJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI, Roberts LR. Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers. *Oncogene* 2003; 22: 3813-3820
- 16 Nagaya T, Nakamura T, Tokino T, Tsurimoto T, Imai M, Mayumi T, Kamino K, Yamamura K, Matsubara K. The mode of hepatitis B virus DNA integration in chromosomes of human hepatocellular carcinoma. *Genes Dev* 1987; 1: 773-782
- 17 Shih C, Burke K, Chou MJ, Zeldis JB, Yang CS, Lee CS, Isselbacher KJ, Wands JR, Goodman HM. Tight clustering of human hepatitis B virus integration sites in hepatomas near a triple-stranded region. *J Virol* 1987; 61: 3491-3498
- 18 Wang HP, Rogler CE. Topoisomerase I-mediated integration of hepadnavirus DNA in vitro. *J Virol* 1991; 65: 2381-2392
- 19 Bruni R, D'Ugo E, Villano U, Fourel G, Buendia MA, Rapicetta M. The win locus involved in activation of the distal N-myc2 gene upon WHV integration in woodchuck liver tumors harbors S/MAR elements. *Virology* 2004; 329: 1-10
- 20 Bruni R, D'Ugo E, Argentini C, Giuseppetti R, Rapicetta M. Scaffold attachment region located in a locus targeted by hepadnavirus integration in hepatocellular carcinomas. *Cancer Detect Prev* 2003; 27: 175-181
- 21 Wang J, Chenivresse X, Henglein B, Brechot C. Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1990; 343: 555-557
- 22 Dejean A, Bougueleret L, Grzeschik KH, Tiollais P. Hepatitis B virus DNA integration in a sequence homologous to v-erb-A and steroid receptor genes in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 1986; 322: 70-72
- 23 Garcia M, de The H, Tiollais P, Samarut J, Dejean A. A hepatitis B virus pre-S-retinoic acid receptor beta chimera transforms erythrocytic progenitor cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 89-93
- 24 Izumi H, Carl Barrett, J. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1167-1176
- 25 Maura Dandri, Martin R. Increase in De Novo HBV DNA integrations in response to oxidative DNA damage or inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation. *Hepatology* 2002; 35: 217-223
- 26 Livezey KW, Negorev D, Simon D. Hepatitis B virus-transfected Hep G2 cells demonstrate genetic alterations and de novo viral integration in cells replicating HBV. *Mutat Res* 2000; 452: 163-178

电编 李琪 编辑 潘伯荣