

乙型肝炎病毒cccDNA与HBx蛋白在肝细胞性肝癌中表达的关系及意义

潘爱萍, 黄古叶, 陈 晶, 何燕玲

■背景资料

HBV cccDNA是HBV复制的中间体, 是HBV mRNA和前基因组RNA的合成模板, 同时也是HBV持续感染的关键因素, 对HBV的复制和感染状态的建立具有十分重要的意义。HBx是HBV的X开放阅读框架(ORF)编码的一种具有反式激活作用的多功能蛋白质, 在调节基因转录、细胞信号转导、控制细胞增殖和转化中具有重要作用。但是两者间的关系及如何致癌的机制仍未清楚。

潘爱萍, 广西中医学院第一附属医院检验科 广西壮族自治区南宁市 530023

黄古叶, 广西中医学院第一附属医院肝病科 广西壮族自治区南宁市 530023

陈晶, 广西中医学院第一附属医院分子生物学实验室 广西壮族自治区南宁市 530023

何燕玲, 广西中医学院第一附属医院病理科 广西壮族自治区南宁市 530023

作者贡献分布: 本文由黄古叶, 潘爱萍及陈晶设计; 研究过程由潘爱萍, 陈晶及何燕玲操作完成; 数据分析由陈晶完成; 本论文写作由潘爱萍完成。

通讯作者: 潘爱萍, 530023, 广西壮族自治区南宁市, 广西中医学院第一附属医院检验科. ksfw1@163.com

收稿日期: 2008-08-19 修回日期: 2009-02-13

接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-08

Relationship between hepatitis B virus covalently closed circular DNA and HBx protein expression in hepatocellular carcinoma and its significance

Ai-Ping Pan, Gu-Ye Huang, Jing Chen, Yan-Ling He

Ai-Ping Pan, Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Medicine College, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Gu-Ye Huang, Department of Hepatology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Medicine College, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Jing Chen, Department of Biology Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Medicine College, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yan-Ling He, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Medicine College, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Ai-Ping Pan, Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Medicine College, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. ksfw1@163.com

Received: 2008-08-19 Revised: 2009-02-13

Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To explore relationship of hepatitis B virus covalently closed circular DNA (HBV cccDNA) expression to the expression of HBx protein within hepatocellular carcinoma and to

investigate their significance.

METHODS: The tumor tissues and their adjacent-tumor tissues of 42 HCC cases were selected. The expression of the HBx protein was detected by SABC immunohistochemistry and the expression levels of hepatitis B virus covalently closed circular DNA were measured by real time polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The expression of the HBx protein was negative in normal liver tissues while there were 31 positive cases (73.8%) in tumor tissues and 35 positive cases (83.3%) in adjacent-tumor tissues without significant difference. The levels of HBV cccDNA in the adjacent-tumor tissues were higher than those in HCC tissues but no significant difference was detected between them. The levels of HBV cccDNA in tumor tissues whose HBx proteins expression were positive were higher than those whose HBx proteins expression were negative ($P < 0.05$), and similar result existed in the adjacent-tumor tissues ($P < 0.05$). There was a positive correlation between HBx protein expression and the expression levels of HBV cccDNA ($r = 0.778$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: There is a positive correlation between the expression of the HBx protein and the level of HBV cccDNA, and their interaction might have a very important effect on emergence and development of HCC.

Key Words: Covalently closed circular DNA; Hepatitis B virus x protein; Hepatocellular carcinoma; Real time polymerase chain reaction

Pan AP, Huang GY, Chen J, He YL. Relationship between hepatitis B virus covalently closed circular DNA and HBx protein expression in hepatocellular carcinoma and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 712-715

摘要

目的: 探讨肝细胞性肝癌中乙型肝炎病毒(HBV)cccDNA与HBx蛋白表达的关系及其意义。

■同行评议者

张占卿, 主任医师, 上海市(复旦大学)公共卫生中心

方法: 取42例肝细胞性肝癌患者的癌和癌旁组织, 采用SABC法检测组织中的HBx蛋白; 采用RT-PCR法检测组织中的HBV cccDNA水平。

结果: HBx蛋白在癌及癌旁组织中的阳性例数分别为31例(73.8%)和35例(83.3%), 无显著性差异; 癌旁组织中cccDNA水平较癌组织中的高, 但是统计学检验无显著性差异; 癌组织和癌旁组织中HBx蛋白(+)者的cccDNA水平均明显高于HBx蛋白(-)者($P<0.05$)。HBx蛋白表达与cccDNA水平呈正相关($r=0.778, P<0.01$)。

结论: HBx蛋白的表达与cccDNA水平明显相关, 他们相互作用、相互影响并在肝癌的发生发展中起重要作用。

关键词: 共价闭环状DNA; 乙型肝炎病毒X蛋白; 肝细胞性肝癌; 适时聚合酶链反应

潘爱萍, 黄古叶, 陈晶, 何燕玲. 乙型肝炎病毒cccDNA与HBx蛋白在肝细胞性肝癌中表达的关系及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 712-715

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/712.asp>

0 引言

乙型肝炎是世界上流行最严重的病毒性疾病, 全球有约3.5亿乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者。慢性乙型肝炎是肝硬化和肝癌的高危因素。HBV复制的中间体, 是HBV mRNA和前基因组RNA的合成模板, 同时也是HBV持续感染的关键因素^[1], 对HBV的复制和感染状态的建立具有十分重要的意义^[2]。HBx是HBV的X开放阅读框架(ORF)编码的一种具有反式激活作用的多功能蛋白质, 在调节基因转录、细胞信号转导、控制细胞增殖和转化中具有重要作用^[3]。为探讨HBV cccDNA的复制与HBx蛋白表达间的关系, 选取我院42例肝癌患者的组织进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2002-04/2008-06本院手术切除的肝细胞性肝癌患者42例, 其中男35例, 女7例, 年龄28-71(中位年龄46)岁。每例肝癌患者取癌组织和癌旁组织, 所有标本均经100 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μ m连续切片。肿瘤均经术后病理证实, 肝癌患者经血清学检查均呈HBsAg阳性。所有标本另取一小份立即放入液氮内保存, 转移至-80℃冰箱备用。兔抗HBx蛋白多克隆抗体购自武汉晶美生物工程有限公司, 免疫组

化SABC试剂盒购自武汉博士得生物工程有限公司。Taq酶、dNTP、氯化镁溶液、超纯水和DNA分子量标准等购自大连宝生物公司。DNA提取试剂盒购自美国Promega公司。Plasmid-Safe™ ATP依赖性DNA酶购自美国Epicentre公司。乙型肝炎病毒cccDNA核酸荧光PCR检测试剂盒购于上海之江生物科技有限公司。PCR仪为美国伯乐公司生产的MJ-1型荧光定量PCR仪。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化实验: 石蜡切片经二甲苯脱蜡后, 逐级酒精入水。按照免疫组化SABC试剂盒使用说明, 采用SABC法, 抗原热修复用微波修复15 min, 一抗4℃过夜, 生物素标记的二抗(通用型, 即可用于抗兔又可用于抗鼠)37℃孵育1 h, SABC复合物37℃孵育30 min, DAB显色, 苏木素复染, 中性树胶封固。设阳性对照和阴性对照。阳性对照为经重复实验证实为阳性的切片; 在阳性切片上分别用PBS替代一抗和用正常兔血清IgG代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 免疫组化实验结果的判定标准: 免疫组化阳性反应物为棕黄色颗粒, 在细胞的胞质或胞核内呈棕黄色染色为阳性细胞。参照判定标准^[2], 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: 设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染色的强度积分: 设弱阳性为1分; 中等阳性为2分; 强阳性为3分。将上述两项相加, 之和大于1的即判定为阳性标本。

1.2.3 RT-PCR: (1)肝组织中DNA及cccDNA的提取: 按照DNA提取试剂盒说明书提取肝癌组织及癌旁组织的总DNA。提取肝组织中HBV cccDNA: 取1 μ g总DNA用Plasmid-Safe™ ATP依赖性DNA酶常规酶切, 于70℃水浴30 min以灭活该酶。(2)cccDNA引物与探针: 上游引物: 5'-ATACGGGTCAATGTCCATGC-3'(nt 1551-1571); 下游引物: 5'-CCGTCTGTG CCTTCTCATCT-3'(nt 1991-2011)。探针: 5'-FAM-CCGTCTGTG CCTTCTCATCT-TAMRA-3'(nt 1880-1900)。扩增片段大小为370 bp。(3)cccDNA定量扩增反应: PCR系统包括10 \times Buffer 2.5 μ L, Mg²⁺ 6 μ L, 6 mmol/L, dNTP 2 mL, 200 μ mol/L, 引物1 μ L, 400 μ mol/L, 探针1 μ L, 200 μ mol/L, ROX 0.5 μ L, Taq酶0.2 μ L, 1 U, 标本0.5 μ g, 加双蒸水至25 μ L。循环条件为94℃ 2 min, 1个循环, 90℃ 20 s至60℃ 1 min, 45个循

■ 研发前沿

HBV感染后, 病毒基因组常整合入宿主细胞基因组造成宿主细胞染色体不稳定。X基因是最常被整合的基因, 整合形式的HBx蛋白在体内和体外都具有反式激活作用。HBx蛋白是一种多功能蛋白质, 可促进肝细胞转化, 亦与HBV感染后HCC的发生密切相关。

■应用要点

本研究结果表明, 深入探讨cccDNA与HBx蛋白的关系, 可能会为阐明HBV相关性HCC的发生和发展提供有益线索。

表 1 HBx蛋白在癌组织、癌旁组织中的表达 $n(\%)$

分组	HBx蛋白表达	
	+	-
癌组织	31(73.8)	11(26.2)
癌旁组织	35(83.3)	7(16.7)

表 2 HBx蛋白表达与cccDNA水平的关系 (mean \pm SD, log)

HBx蛋白表达	cccDNA水平(copies/mg)	
	癌组织	癌旁组织
+	6.25 \pm 1.31 ^a	6.15 \pm 1.36
-	4.64 \pm 1.25	5.64 \pm 1.45

^a $P < 0.05$ vs HBx蛋白表达(-)。

环。阳性标准品为cccDNA标准质粒。取标准质粒 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 作标准曲线。样本及标准品均做3复管, 结果取其均值。每次扩增均设阳性对照及阴性对照。

统计学处理 用SPSS13.0进行统计处理。率的比较用 χ^2 检验, cccDNA水平的比较用 t 检验。HBx蛋白表达与cccDNA水平的关系用相关性分析。 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 HBx蛋白表达 HBx蛋白在癌及癌旁组织中的阳性例数分别为31例和35例, 阳性率分别为73.8%和83.3%, 无显著性差异($P > 0.05$, 表1); HBx蛋白阳性反应物主要位于胞质(图1A-B), HBx蛋白阳性反应细胞多呈弥漫性分布。阳性对照为阳性结果; 阴性对照, 即阳性切片用PBS及正常兔血清代替一抗, 结果均为阴性(图1C)。

2.2 肝组织中cccDNA的表达 癌旁组织中cccDNA水平(5.72 ± 1.23 copy/mg)较癌组织中(5.31 ± 1.21 copy/mg)的高, 但是统计学检验无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3 HBx蛋白表达情况与cccDNA表达水平的关系 癌组织和癌旁组织中HBx蛋白(+)者的cccDNA水平均明显高于HBx蛋白(-)者($P < 0.05$, 表2)。HBx蛋白表达与cccDNA水平呈正相关($r = 0.778$, $P < 0.01$)。

3 讨论

乙型肝炎病毒共价闭环状DNA(hepatitis B virus covalently closed circular DNA, HBV cccDNA)是HBV复制的中间体, 是HBV mRNA和前基因组RNA的合成模板, 也是HBV持续感染的关键因素^[4-5], 是病毒活跃复制状态的重要指标, 是HBV生活周期的核心部分^[6]。最近有报道HBV病毒负荷和活跃复制与HCC的发生相关^[7-8]。HBV病毒活跃复制通过增加病毒DNA整合到癌基因、抑癌基因或细胞DNA调控元件附近直接启动恶性转化, 导致基因组不稳定, 还增加转录活化蛋白HBVx蛋白的产生, 通过与p53

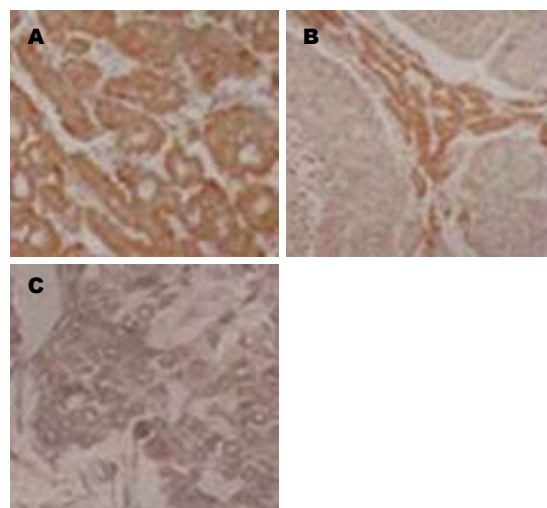


图 1 免疫组化染色结果。A: 肝癌组织中HBxAg阳性; B: 癌旁组织中HBxAg阳性; C: 阴性对照: 肝癌组织阴性。

抑制基因的结合阻断其诱导的凋亡, 从而诱导癌变。HBV病毒活跃复制还通过引起肝脏坏死炎症反应间接诱导癌变^[9]。

HBV感染后, 病毒基因组常整合入宿主细胞基因组造成宿主细胞染色体不稳定。X基因是最常被整合的基因, 整合形式的X基因产生的HBx蛋白在体内和体外都具有反式激活作用^[3]。HBx蛋白是一种多功能蛋白质^[3]促进肝细胞转化^[10], 亦与HBV感染后HCC的发生密切相关^[11]。

虽然研究发现cccDNA和HBx蛋白均可能与HBV感染后HCC的发生有着密切关系^[7-8, 11], 但是他们的之间的关系以及他们如何致癌的机制仍未清楚。因此深入探讨cccDNA和HBx蛋白的表达及他们在HCC发生发展中的作用是本研究的重点。

本研究表明, 癌旁组织HBx蛋白的表达略高于癌组织中HBx蛋白的表达, 但是没有显著性差异($P > 0.05$)。说明HBx蛋白本身可能未直接参与肝癌的发生发展。同时也发现癌旁组织中cccDNA水平较癌组织中的高, 但是亦无显著性差异($P > 0.05$)。这也表明, 虽然文献报道, cccDNA的表达水平反映HBV复制状态的活跃程度, 同时

HBV活跃复制状态与肝癌的发生密切相关^[2],但是本研究未能证实cccDNA在HCC发生中的直接的显著作用. Zhang *et al*^[12]提出cccDNA在肝脏中的分布是不均匀的, 本研究也发现cccDNA在癌旁组织中的水平高于癌组织中的水平, 虽然无显著性差异($P>0.05$), 但这一结果支持上述观点.

在癌及癌旁组织中, HBx蛋白表达阳性者cccDNA水平均明显高于HBx蛋白表达阴性者($P<0.05$), 同时发现HBx蛋白的表达与cccDNA水平呈正相关($r = 0.778, P<0.01$). 张涛 *et al*^[2]认为, HBV病毒活跃复制可增加HBVx蛋白的产生, 并通过与p53结合诱导癌变. 而cccDNA水平可以反映HBV病毒复制的活跃程度, 因此我们的数据似乎表明, 活跃复制的HBV感染是通过HBVx蛋白的作用而致癌的. 但是, Chou *et al*^[1]在研究HBV cccDNA的转录能力时发现, 细胞内转录因子可以被HBx蛋白激活, HBV cccDNA的转录活性很大程度上被HBx蛋白调控, HBx蛋白可看作一种潜在的转录激活子, 推测HBx可通过提高细胞内转录因子的表达而改变HBV cccDNA的转录能力, 缺乏X蛋白的表达导致源自HBV cccDNA的病毒转录物产量降低, 由于X蛋白的缺乏引起病毒pgRNA的表达下调, 基因组进入细胞核及HBV cccDNA库的扩增或被间接终止. 因此, 在乙肝相关性HCC中, cccDNA与HBx蛋白相互作用, 相互影响, cccDNA可能通过增加HBx蛋白的表达并通过其作用而致癌, 而HBx蛋白也调控着cccDNA的转录, 使得HBV的复制处于活跃状态. 虽然两者在肝癌发生发展中的确切机制尚未阐明, 但是本研究的结果提示, 深入探讨cccDNA与HBx蛋白的关系, 可能会为阐明HBV相关性HCC的发生和发展提供有益线索, 值得深入研究.

4 参考文献

- 1 Chou YC, Jeng KS, Chen ML, Liu HH, Liu TL, Chen YL, Liu YC, Hu CP, Chang C. Evaluation of transcriptional efficiency of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by reverse transcription-PCR combined with the restriction enzyme digestion method. *J Virol* 2005; 79: 1813-1823
- 2 张涛, 韩涛, 高英堂, 陈浩, 杜智, 王毅军. 乙型肝炎病毒感染的肝癌患者肝组织中乙型肝炎病毒cccDNA的检测. *中华肝脏病杂志* 2007; 15: 232-233
- 3 Wu CG, Salvay DM, Forgues M, Valerie K, Farnsworth J, Markin RS, Wang XW. Distinctive gene expression profiles associated with Hepatitis B virus x protein. *Oncogene* 2001; 20: 3674-3682
- 4 Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 51-68
- 5 Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. *J Hepatol* 2006; 44: S71-S76
- 6 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129
- 7 Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, Hsiao CK, Chen PJ, Chen DS, Chen CJ. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002; 347: 168-174
- 8 Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, Liaw YF, Lin CL, Liu CJ, Shih WL, Kao JH, Chen DS, Chen CJ. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 265-272
- 9 张峰, 邵永孚, 许杨, 高纪东, 刘国亭, 徐立斌, 孙宗棠. 乙肝病毒活跃复制与肝细胞癌发生的相关性研究. *中华普通外科杂志* 2006; 21: 1-3
- 10 Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 25858-25864
- 11 Chen GG, Li MY, Ho RL, Chak EC, Lau WY, Lai PB. Identification of hepatitis B virus X gene mutation in Hong Kong patients with hepatocellular carcinoma. *J Clin Virol* 2005; 34: 7-12
- 12 Zhang YY, Zhang BH, Theele D, Litwin S, Toll E, Summers J. Single-cell analysis of covalently closed circular DNA copy numbers in a hepadnavirus-infected liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 12372-12377

■同行评价

本文设计合理, 结论可靠, 具有一定学术价值, 但新颖性一般.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. (常务副总编辑: 张海宁 2009-03-08)