

[文章编号] 1000-2200(2009)09-0665-03

· 临床医学 ·

原发性肝癌患者及慢性乙肝病毒携带者 肝组织中乙型肝炎病毒 X 基因的变异

刘传苗, 李 伟, 赵守松

[摘要] **目的:** 探讨乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV) X 基因及其变异与原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生、发展的关系。**方法:** 采用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)方法, 检测 22 例乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)阳性的 HCC 患者及 15 例慢性乙肝病毒携带者(chronic asymptomatic carrier, CAC)患者肝组织中 HBV X 基因, 并对 PCR 产物进行基因测序, 同时检测 5 例无 HBV 携带者正常肝脏组织中 HBV X 基因。**结果:** 22 例 HCC 患者癌组织及 15 例 CAC 患者肝组织中 HBV X 基因检出率分别为 68.18% 和 46.67%, 5 例正常肝脏组织中均未检测到 HBV X 基因, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。肝癌组织及 HBV 携带者肝组织中 HBV X 基因检出率差异无统计学意义($P > 0.05$)。肝癌组织及携带者肝组织中 HBV X 基因发生 1 762T/1 764A 双突变率分别为 93.33% 和 2/7, 肝癌组织中双突变率高于携带者肝组织($P = 0.004 3$), 未发现 1 762T 及 1 764A 单独发生突变。**结论:** HCC 患者肝组织中 HBV X 基因检出率高, 肝癌组织中发生 1762T/1764A 双突变的频率高, HBV X 基因及 1762T/1764A 双突变与 HCC 的发生可能有重要关系。

[关键词] 肝肿瘤; 乙型肝炎病毒; 乙型肝炎病毒 X 基因; 变异

[中国图书资料分类法分类号] R 735.7 **[文献标识码]** A

Variation of hepatitis B virus X gene in liver tissues of hepatocellular carcinoma patient and chronic asymptomatic carrier

LIU Chuan-miao, LI Wei, ZHAO Shou-song

(Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the association of hepatitis B virus (HBV) X gene and its mutation with hepatocellular carcinogenesis (HCC). **Methods:** HBV X gene in the liver tissues of 22 HCC patients whose hepatitis B surface antigen (HBsAg) was positive and 15 chronic asymptomatic carriers (CAC) patients were detected with polymerase chain reaction (PCR); the PCR product was sequenced and analyzed; 5 normal liver tissues with negative HBsAg acted as control. **Results:** The detection rate of HBV X gene in the carcinoma tissues of 22 HCC patients and 15 CAC patients was 68.18% and 46.67%, respectively. HBV X gene was not detected in the 5 normal liver tissues. The difference was significant between them ($P < 0.05$). The detection rate of HBV X gene in carcinoma tissues and CAC liver tissues had no statistical difference ($P > 0.05$). The double mutation rate of 1 762T/1 764A in carcinoma tissues and CAC liver tissues was 93.33% and 2/7, respectively. And the former was higher than the latter ($P = 0.004 3$). There was no detection of mutation of 1 762T or 1 764A alone. **Conclusions:** There is a high detection rate of HBV X gene and a high double mutation rate of 1762T/1764A in the carcinoma tissues of HCC patients. HBV X gene and double mutations may play an important role in the carcinogenesis of HCC.

[Key words] liver neoplasms; hepatitis B virus; hepatitis B virus X gene; variation

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种严重危害人类健康的恶性肿瘤,其死亡率在消化系统恶性肿瘤中列第三位^[1]。其中大约 60% 的 HCC 与乙型肝炎病毒(HBV)感染有关。HBV 基因组 X 基因编码产生的蛋白 HBx 是一种反式作用因子,能与细胞内多种与转录、基因调控有关的因子结合,广泛激活病毒与细胞的启动子,参与基因调控,在 HCC 形成过程中有重要作用^[2]。流行病

学调查表明,在 HCC 患者中经常发生 HBx 蛋白读码框的点突变和缺失突变。突变的 HBx 改变了全长 HBx 蛋白的反式激活作用,影响其在控制细胞增殖、生长和转化方面的功能,与 HCC 的形成密切相关^[3]。在 HBx 点突变中最常见的是核苷酸 1 762 位腺嘌呤转换为胸腺嘧啶即 A-T 突变,以及 1 764 位鸟嘌呤转换为腺嘌呤即 G-A 突变。本实验通过聚合酶链反应(PCR),检测 HCC 患者及慢性乙型肝炎病毒携带者(chronic asymptomatic carrier, CAC)患者肝组织中的 HBV X 基因,并对其常见变异位点 1 762 位及 1 764 位进行基因测序分析,进一步探讨 HBV X 基因及其变异与 HCC 发生、发展的关系。

[收稿日期] 2009-02-26

[基金项目] 安徽省卫生厅自然科学基金资助项目(06B080)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 感染病科,安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 刘传苗(1967-),男,硕士,副主任医师,副教授。

1 材料与方

1.1 实验标本 22 例 HBsAg 阳性的 HCC 患者肝癌组织及 15 例 CAC 肝组织收集自蚌埠医学院第一附属医院,均经病理学证实,并排除合并其它病毒感染。其中肝癌组男 12 例,女 10 例;年龄 36~72 岁。CAC 组男 9 例,女 6 例;年龄 19~35 岁。5 例正常肝脏组织系收集自胆囊结石伴肝活检患者(男 3 例,女 2 例;年龄 52~68 岁,血清 HBV 标志物检测结果均为阴性)。所有标本离体后迅速放到液氮罐中快速降温,然后转移到 -80 °C 冰箱中保存。

1.2 主要试剂 蛋白酶 K 购自 Amerson 公司;PCR 扩增试剂包括 TaqDNA 聚合酶、dNTPs、PCR 反应缓冲液购自上海生工公司;DL2000 DNA Marker 购自大连宝生物公司。

1.3 DNA 提取 采用传统的酚-氯仿-异戊醇提取法,DNA 提取后取少量于紫外线分光光度仪测定 DNA 纯度,剩余 DNA 置 -20 °C 冰箱保存。

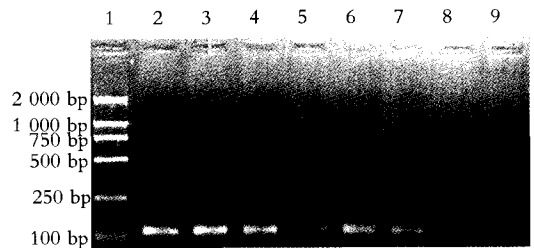
1.4 PCR 扩增 利用 Primer Premier 5.0 引物设计软件,设计针对 HBV X 基因序列特异的引物,HBV X 基因序列来源于 PubMed GenBank,ayr 基因型,序列号为 X 04615。5' 端引物 (Sense):5'-AAC GAC CGA CCT TGA GGC ATA CT-3'; 3' 端引物 (Antisense):5'-GAC CAA TTT ATG CCT ACA GCC TCC-3'。引物由上海生工公司合成,PCR 扩增产物为 115 bp。PCR 反应体系:去离子水 39 μl,PCR 反应缓冲液 5 μl,dNTPs 0.5 μl,DNA 模板 3 μl,上下游引物各 1 μl,TaqDNA 聚合酶 0.5 μl;反应条件:95 °C 预变性 5 min,在 95 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 25 s,进行 35 个循环,72 °C 延伸 10 min。

1.5 产物测序 取 20 μl PCR 反应产物送至上海申友生物公司进行测序,测序用引物为 5' 端引物。

1.6 统计学方法 采用秩和检验和四格表 Fisher 确切概率法。

2 结果

2.1 PCR 反应产物电泳 PCR 反应产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后与 DNA Marker 对照,确定出现 115 bp 大小的目的条带为阳性条带(见图 1)。



1:Marker;2~7:PCR 反应产物;8:阴性对照;9:空白对照

图 1 PCR 反应产物电泳图

2.2 不同肝组织中 HBV X 基因的检出 22 例 HCC 患者癌组织 HBV X 基因检出 15 例 (68.18%),15 例 CAC 患者肝组织中 HBV X 基因检出 7 例 (46.67%)。5 例正常肝脏组织中均未检测到 HBV X 基因,差异有统计学意义 ($H_c = 7.71, P < 0.05$);其中,癌组织与正常组织阳性率差异有统计学意义 ($P = 0.0148$),癌组织与携带者肝组织阳性率差异无统计学意义 ($P > 0.05$),携带者肝组织的阳性率与正常组织差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 不同患者肝组织中 1762T/1764A 双突变的检出 15 例 HCC 患者癌组织 HBV X 基因阳性者 1762T/1764A 双突变 14 例 (93.33%),7 例 CAC 患者肝组织 HBV X 基因阳性者双突变 2 例 (2/7)。未发现 1762T 及 1764A 单独发生突变。癌组织中双突变率明显高于携带者肝组织 ($P = 0.0043$)。

2.4 测序结果 PCR 产物测序结果见图 2。

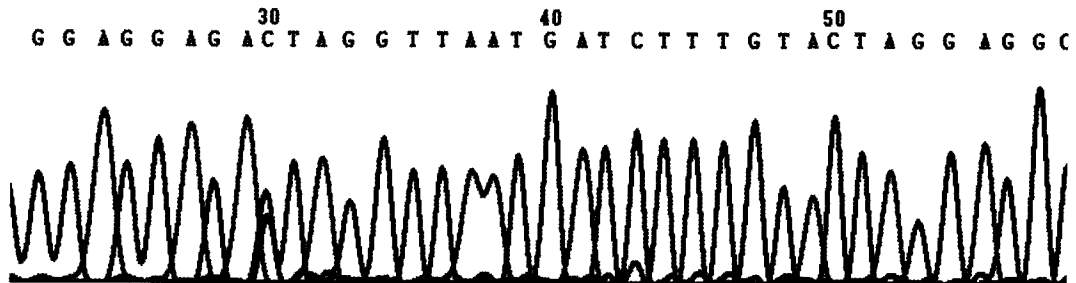


图 2 PCR 产物测序结果(图中碱基下划横线者为 1762T/1764A 双突变位点)

3 讨论

一些慢性 HBV 感染进展到 HCC 的原因目前尚不清楚,宿主因素,如对 HBV 的免疫反应、遗传倾向、高 HBV 复制率以及 HBV 基因组的变异均与

HCC 的发生有关。目前,众多研究均提示 HBV X 基因及其变异与 HCC 的发生密切相关,但是关于 HBV X 基因与 HCC 发生关系的确切分子机制还不是很清楚。

3.1 HBx 蛋白在肝癌组织中的表达 Su 等^[4]用免

疫组织化学方法研究 39 例受 HBV 感染的慢性肝病和肝癌组织,在 16/30 例肝硬化和 10/18 例肝癌组织中存在 HBx 过表达,同时在癌前病变的局灶性和结节性增生的肝实质细胞中也存在 HBx 过表达。人群调查发现,85% HCC 患者的肝组织中含有特异性的 HBx 蛋白^[5]。本文检测了 22 例 HBsAg 阳性 HCC 患者的癌组织及 15 例 CAC 肝组织,HBV X 基因的检出率分别为 68.18% 和 46.67%,仅癌组织高于正常组织,而癌组织与携带者肝组织差异无统计学意义,与文献报道相近。

3.2 HBV X 基因的点突变 HBV X 基因 1 762T/1 764A 双突变使 X 基因编码蛋白 HBx 的 130 及 131 位氨基酸分别从赖氨酸转化为甲硫氨酸(1762, A-T, AAG-ATG, K-M)及缬氨酸转化为异亮氨酸(1764, G-A, GTC-ATC, V-I)。Kuang 等^[6]和 Liu 等^[7]均发现 1 762T/1 764A 双突变与 HCC 的发生有密切的关系。Marina 等^[8]研究发现,南部非洲人中 HBV X 基因与 BCP 区重叠区域中最常发现的错义突变就是 1 762T/1 764A 双突变。这个双突变已在无症状携带者、慢性肝炎患者、暴发性肝炎和 HCC 患者中^[9]发现。并且,1 762T/1 764A 双突变的频率在 HCC 患者中比无症状携带者要明显升高($P=0.0043$)。同样有研究^[10]发现,从慢性乙型肝炎、乙肝肝硬化到 HCC 患者,随病情的变化,1 762T/1 764A 的变异率逐渐升高。这些突变在转录激活必须区(132~148 位密码子)之外,在 61 位半胱氨酸与 137 位半胱氨酸间二硫键形成的环之内^[11]。由这些突变引起的氨基酸改变在 1 809/1 812 位核苷酸突变形成的丝氨酸/丝氨酸存在下,进而改变 HBx 蛋白的结构而促进肝癌的形成。本研究发现,在 22 例 HBsAg 阳性 HCC 患者肝组织及 15 例 CAC 肝组织中,HBx 检出率相近,但是癌组织中 1 762T/1 764A 双突变率要比携带者肝组织要高,而没有发现 1 762T 或者 1 764A 单独突变,进一步表明,1 762 T/1 764A 双突变在 HBV 诱导的肝癌形成中可能起重要作用。

3.3 HBx 蛋白的缺失突变 在相关病例的研究中,HBx 蛋白还存在相当程度的缺失突变。Hoare 等^[12]发现,在 18 例肝癌患者中有 10 例存在 HBx 蛋白的缺失突变,在慢性 HBV 感染患者中检出率为 69%。在 HCC 发生过程中,HBV X 基因是肝细胞中最常见的 HBV DNA 整合部分,并且从 HCC 患者中分离出来的 HBV DNA 的 X 基因绝大多数有缺失突变^[13]。来自肿瘤组织的 HBx 蛋白的缺失突变体能

够抑制野生型 HBx 蛋白抗增殖和反式激活能力,其羧基端缺失突变体能增强癌基因 ras 和 myc 的转化能力。与全长的 HBx 蛋白相比,这些羧基端缺失的蛋白丧失了转录活性和抑制细胞增殖和转化的能力,因此截短的 HBx 蛋白反式激活功能的改变可能导致肿瘤的发生^[14]。

[参 考 文 献]

- [1] 詹必江. 原发性肝癌三维适形放疗 35 例疗效分析[J]. 蚌埠医学院学报, 2009, 34(2): 131-132.
- [2] Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, et al. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression[J]. EMBO J, 2003, 22(11): 2729-2740.
- [3] 王力, 朱明华. 乙肝病毒 X 蛋白突变在肝癌发生中的作用[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2006, 26(4): 305-308.
- [4] Su Q, Schroder CH, Hofmann WJ, et al. Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas[J]. Hepatology, 1998, 27(4): 1109-1120.
- [5] Hwang GY, Lin CY, Huang LM, et al. Detection of the hepatitis B virus X protein (HBx) antigen and anti-HBx antibodies in cases of human hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Microb, 2003, 41(12): 5598-5603.
- [6] Kuang SY, Jackson PE, Wang JB. Specific mutations of hepatitis B virus in plasma predict liver cancer development[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(10): 3575-3580.
- [7] Liu CJ, Chen BF, Chen PJ, et al. Role of hepatitis B viral load and basal core promoter mutation in hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers[J]. J Infect Dis, 2006, 193(9): 1258-1265.
- [8] Marina B, Anna K, Michael CK. High prevalence of 1762T 1764A mutations in the basic core promoter of hepatitis B virus isolated from black africans with hepatocellular carcinoma compared with asymptomatic carriers[J]. Hepatology, 1999, 29(3): 946-953.
- [9] Takahashi K, Aoyama K, Ohno N, et al. The precore/core promoter mutant (T1762A1764) of hepatitis B virus: clinical significance and an easy method for detection[J]. J Gen Virol, 1995, 76(Pt 12): 3159-3164.
- [10] 陈敏, 王永忠, 杭双荣, 等. 乙型肝炎病毒特定变异位点的结果分析[J]. 宁夏医学杂志, 2006, 28(4): 296-297.
- [11] Gupta A, Mai TK, Jayasuryan N, et al. Assignment of disulphide bonds in the X protein (HBx) of hepatitis B virus[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 212(3): 919-924.
- [12] Hoare J, Henkler F, Dowling JJ, et al. Subcellular localisation of the X protein in HBV infected hepatocytes[J]. J Med Virol, 2001, 64(4): 419-426.
- [13] Rui E, Moura PR, Goncalves KA, et al. Expression and spectroscopic analysis of a mutant hepatitis B virus onco-protein HBx without cysteine residues[J]. J Virol Methods, 2005, 126(1/2): 65-74.
- [14] Njhara R, Jana SS, Goswami SK, et al. Sustained activation of mitogen-activated protein kinases and activator protein 1 by the hepatitis B virus X protein in mouse hepatocytes *in vivo*[J]. J Virol, 2001, 75(21): 10348-10358.