第15卷第3期 2000年9月 中 国 病 毒 学 VIROLOGICA SINICA Vol. 15 No. 3

Sep. 2000

243-24k

(7)

R735.7

肝癌组织中 HBV 核心基因启动子突变的研究*

方钟燎¹,杨进业¹,王学燕¹,庄辉²
Roger Ling³, Tim J Harrison³

¹(广西壮族自治区卫生防疫站, 南宁市 530021) ²(北京医科大学, 北京 100083)

³(Royal Free Hospital School of Medicine, University of London, Rowland Hill St., London NW3 2PF, UK)

摘要:为深入了解乙肝病毒(HBV)致癌机理,用套式 PCR 对广西 14 例血清 HBV DNA 阳性的原发性肝癌患者癌组织、10 例乙型病毒性肝炎患者血清及 10 例乙肝病毒无症状携带者血清 HBV 核心基因启动子进行扩增,阳性者用 Sanger 氏双脱氧法做序列分析,发现肝癌组织 10 例 PCR 阳性,阳性率 71.4%,所有 PCR 阳性标本的整合体均有乙肝病毒核心基因启动子双突变序列(nt 1 762 A→T, 1 764 G→A),并且在其周围各序列都有不同部位的点突变,标本 C14 核苷酸的缺失突变高达 10 个。乙肝患者 6 例 PCR 阳性,其中 3 例乙肝病毒核心基因启动子发生双突变。无症状携带者中 4 例 PCR 阳性,其中仅 1 例发生双突变。结果提示乙肝病毒核心基因启动子双突变在肝癌患者中较常见,肝炎患者次之,无症状携带者居最后。

关键词:乙肝病毒;核心基因启动子;突变;原发性肝癌;整合

中围分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1003 - 5125(2000)03 - 0243 - 06

乙肝病毒(HBV)的感染是原发性肝细胞癌的主要病因、在 HBV 感染率较高的地区、这种关系更为显著[1]。尽管如此、至今对其致癌机理尚未充分了解、主要的研究障碍是原代肝细胞难以在培养基中生长,且用 HBV 体外培养也未获成功。研究 HBV DNA 与人类染色体DNA 的整合,将有助于阐明 HBV 的致癌机理。HBV 核心基因启动子 T¹⁷⁶²A¹⁷⁹⁴突变株是最新报道的乙肝病毒变异株,这种突变虽可减少 e 抗原的产生,但增加病毒的复制^[2]。因此,研究这种突变序列是否整合到人类染色体 DNA 中对认识 HBV 致癌机理将具有重要意义。本研究对 14 例原发性肝细胞癌组织中 HBV 核心基因启动子及其序列进行了测定,为了对比分析,同时分析 10 例乙型病毒性肝炎患者及 10 例乙肝病毒无症状携带者。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 **肝癌组织标本** 采自南宁市各大医院外科手术切除的肝细胞癌组织,其中男性 8 例,女性 6 例,详见表 1。这 14 例原发性肝癌患者血清 HBV DNA 均阳性^[3]。乙型肝炎患者及其无症状携带者采自广西医科大学第一附属医院住院病人及健康体检者,分别为 10 例及 10 例,详见表 2。

收稿日期:1999-09-07、修回日期:2000-01-07

^{*} 广西科技厅(桂科回字 9817136)和卫生厅资助课题(9836) 作者简介:方钟燎(1963 年 -)、男, 牡族、广西省人, 副主任医师, 医学硕士、研究方向: HBV 的分子生物学。

- 1.2 试剂 PCR 试剂购自 Promega 公司; 载体及感受态细胞购自 Invitrogen 公司; 克隆 DNA 的提取试剂盒 QIAspin prep 购自 Qiagen 公司; 测序反应试剂盒购自 Amersham International P/C, Buckinghamshire, U.K.
- 1.3 肝癌组织标本的处理及 PCR 扩增 取 1 cm³ 的癌组织在液氮中磨成粉沫, 加 1 mg/mL 链酶蛋白酶及 0.5% SDS, 于 37 ℃消化过夜, 用酚、氯仿抽提 DNA, 离心速度为 2000 r/min, 20 min。取 5 μL DNA 溶液作套式 PCR(nested PCR), 反应体积为 50 μL。每份标本平行做 2 个 PCR。第一轮扩增引物为 B935(nt 1240~1260 5′ GCGCTGCAGAAGGTTTGTGGCTCCTCTG 3′)和 MDC1(nt 2304~2324 5′ TTGATAAGATAGGGGCATTTTG 3′), 反应条件为 94 ℃变性 1.5 min、50 ℃退火 45 s、72 ℃延伸 4 min, 30 个循环后继续循环 1(72 ℃ 10 min, 22 ℃ 5 min);第二轮扩增引物; XSEQ1(nt 1547~1564 5′ CCCCGTCTGTGCCTTCTCATCTG 3′)和 HDB2(nt 2134~2152 5′ GCGAAGCTTAGATCTCTGGATGCTGGA 3′), 反应条件:94 ℃变性 45 s、50 ℃退火 45 s、72 ℃延伸 2 min, 30 个循环后继续上述循环 1。血清标本的处理及 PCR 扩增参见^[3]。
- 1.4 **载体的连接及克隆的筛选** 取第二轮扩增产物 2 μL 连接到 PCR2.1 载体,在 4 ℃ 下过夜,次日转染感受态细胞,第 3 日携选克隆并培养过夜,第 4 日用 EcoRI 酶消化,筛选阳性克隆,阳性克隆的剩余培养液用 QI-Aspin prep 试剂盒提取 DNA 用于测序。每份标本取 3 个克隆。
- 1.5 **测序** 纯化的 DNA 5 μ L 在 1 μ L NaOH 和 2 μ L 引物 XSEQ3 (nt 1653 ~ 1672 5′ CATAAGAG-GACTCTTGGACT 3′)中变性 40 min, 随后在 2 μ L 测序酶缓冲被, 1 μ L HCl 及 1 μ L Tris. HCl 溶液中中和 25 min, 测序反应按试剂盒说明书进行。电泳: 测序反应混合物在变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 电压 80 伏, 时间 3.5 h, 在 10% 醋酸中固定凝胶后, 在 80 ℃ 真空下烘干胶块, 然后将凝胶与 X 光片一起放入暗盒, 次日洗片、读片。

2 结果

2.1 PCR 由表 1 和表 2 可见, 14 例原发性肝细胞癌患者的癌组织经套式 PCR 扩增后, 10 例 HBV DNA 阳性, 阳性率为 71.4%。乙型肝炎患者及其无症状携带者血清 HBV DNA 阳性率分别为 60%、40%。

表 1 14 例原发性肝细胞癌息者 HBeAg/抗-Hbe 检出情况及 PCR 结果

Table 1	HBeAg/Anti-HBe Status and HCC DNA PCR of 14 Patients with Hepatocellular Carcinoma
---------	--

				•
病例号 Patient No.	性别 Sex	年齡(岁) Age(yrs)	HBeAg/抗-HBe HBeAg/Anti-HBe	核心基因启动子 PCR Core promoter PCR
C2	男(M)	60	-/+	+
C3	女(F)	38	-/+	-
C4	男(M)	38	-/+	+
C5	女(F)	46	-/+	+
C7	女(F)	34	-/+	+
C8	男(M)	54	-/+	+
Clo	女(F)	45	-/+	-
C11	男(M)	5 0	-/+	_
C12	男(M)	37	-/+	+
C13	男(M)	31	-/+	+
C14	女(F)	40	-/+	+
C15 *	女(F)	41	-/-	+
C23	男(M)	33	+/-	-
C24	男(M)	42	-/-	+

^{*}病例 C15"两对半"均阴性。* Patient C15 tested negative for HBV markers.

表 2 10 例非肝癌 HBV DNA 配性者临床诊断情况

Table 2 The clinical diagnosis of 10 HBV DNA positive carriers without Hepatocellular Carcinoma

病例 Patient	性别 Sex	年龄(岁) Age(years)	HBeAg/抗-HBe HBeAg/Anti-HBe	诊 断 * Diagnosis
В3	男(M)	23	-/+	CAH
B4	女(W)	44	-/-	CAH
B8	男(M)	57	+/-	HC
B18	男(M)	46	-/+	CAH
B19	女(w)	56	+/-	CAH
B21	男(M)	31	-/-	СРН
A7	男(M)	18	+/-	ASC
A13	女(w)	60	-/+	ASC
A15	男(M)	33	-/-	ASC
A17	女(W)	43	-/+	ASC

* CAH(慢性活动性肝炎): Chronic active hepatitis; CPH(慢性迁延性肝炎): Chronic persistent hepatitis; HC(肝硬化): Hepatocirrhosis; ASC(无症状携带者): Asymptomatic carriers

2.2 序列测定 图1表示整合到人类染色体 DNA 中 HBV DNA 核心基因启动子的序列与 HBV 野毒株相应序列的比较(位于 nt 1741~1789), "-"表示与野毒株具相同的序列, "/"表示缺失突变, 扩号内的数字表示用于测序的克隆数, "+"号表示克隆来自不同 PCR 产物, "↓ ↓"表示双突变所在的位置(第 1762 及 1764 位核苷酸)。由该图可见, 所有 PCR 阳性标本

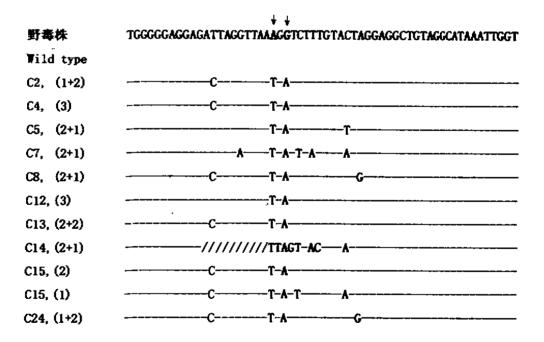


图 1 14 例原发性肝细胞癌患者癌组织 HBV-DNA 核心基因启动子序列分析

Fig. 1 Sequence analysis of the core promoter region in tumor tissues from 14 patients with hepatocellular carcinoma

均有双突变(nt 1762 A→T, 1764 G→A),并且其周围各序列均有不同部位的点突变,标本 C14 有更广泛的突变,包扩 10 个核苷酸的缺失突变。图 2 表示乙型病毒性肝炎患者及乙肝病毒无症状携带者血清 HBV DNA 核心基因启动子的序列与 HBV 野毒株相应序列的比较(位置同上),由图可见乙肝患者 6 例 PCR 阳性中有 3 例发生双突变,其周围各序列也有不同部位的点突变。无症状携带者 4 例 PCR 阳性中仅 1 例发生双突变。

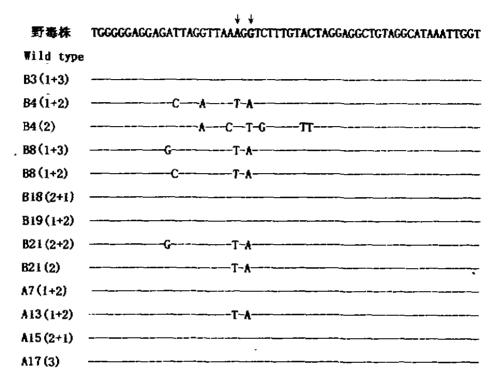


图 2 10 例非非癌乙肝病毒携带者血清 HBV-DNA 核心基因启动子序列分析 Fig. 2 Sequence analysis of the core promoter region of HBV in sera from 10 HBV carriers without Hepatocellular Carcinoma

3 讨论

尽管 HBV 的感染在肝细胞癌的发生中起到病因学作用已无可非议,但是对其致癌机理仍不清楚。研究肝脏内的 HBV DNA 存在状况可以提供 HBV 致癌的分子机理。目前已有不少学者从不同角度研究 HBV DNA 和细胞染色体 DNA 的整合情况,并已从人、土拔鼠、地松鼠和鸭的肝癌组织中发现 HBV DNA 整合到细胞染色体 DNA 中^[4-7],在癌组织和肿瘤细胞系中整合的 HBV DNA 及其毗邻细胞 DNA 的序列已被克隆,其特性已被认识^[8,9]。研究结果表明,整合是多发、随机、非特异性的、常发生病毒和宿主 DNA 的缺失和重排^[10]。HBV 整合的确切作用机制仍未阐明,多数支持 HBV DNA 的整合促使肝脏癌变的所谓插入诱变假说,他们认为整合的 HBV DNA 随宿主 DNA 的复制而复制、同时,还可激活或者抑制调节细胞生长及繁殖的基因^[9]。本研究发现 71% (10/14) 肝癌患者的肝癌组织有 HBV DNA 整合体。我们仅

扩增 1/3 HBV 基因,由于整合是完全随机的,如果用其它区段的引物去扩增,也许会发现更多的阳性者。

Tabor 研究小组^[11]发现江苏启东县 85% (17/20)原发性肝细胞癌组织有乙肝病毒 T¹⁷⁶² A¹⁷⁶⁴双突变序列,而同样的突变序列仅见于 11% (2/18)非肝癌的慢性乙肝病毒感染者血清。本研究发现所有整合体均有 T¹⁷⁶² A¹⁷⁶⁴ 双突变序列,并在其周围各序列均有不同部位的点突变。标本 C14 有更广泛的突变,包扩 10 个核苷酸的缺失突变。乙肝患者 6 例 PCR 阳性中有 3 例发生双突变,其周围各序列也有不同部位的点突变。无症状携带者 4 例 PCR 阳性中仅 1 例发生双突变。本研究提示乙肝病毒核心基因启动子双突变在肝癌患者中较常见,肝炎患者次之,无症状携带者居最后。

为什么这种双突变在原发性肝癌患者中较常见? HBV DNA 核心基因启动子第 1762 位核苷酸 A→T、第 1764 位 G→A 的点突变、将减少前核心(Precore) mRNA 的转录,从而降低 e 抗原的表达,但可增加前基因组(Pregenomic) mRNA 的转录,增加 HBV 复制^[2]。不难推测,由于病毒大量复制,而机体免疫清除作用降低,从而导致机体产生更多的 HBV DNA,并使更多的 HBV DNA 整合到人类染色体 DNA,随着人类染色体复制而复制,肝脏中这些癌前细胞的积累可以增加人类基因突变的机会,也许在黄曲霉毒素等因素的协同作用下,这种突变的机会更大,突变的结果将导致肿瘤的发生。

目前尚不清楚病毒基因何时发生突变及何时发生整合,突变之前有无病毒基因整合发生。 因此,研究儿童期 HBV DNA 的整合情况,可能有助于阐明 HBV 的致癌机理。

参 考 文 献

- [1] Robinson WS. Hepadnaviruses and hepatocellular carcinoma (HCC) [1]. Cancer Detect Prev. 1989, 14:245 252
- [2] Buckwold V, Xu Z, Chen M, et al. Effects of a naturally occuring mutation in the hepatitis B virus basel core promoter on precore gene expression and viral replication [J]. J Virol, 1996, 5845 5851
- [3] 方钟燦,王树声,麦戚、等.广西原发性肝癌患者 HBV DNA 核心基因启动子突变的研究[J].广西预防医学、1997,3 (4):197-200
- [4] Koshy R. Maupas PH. Muller R. et al. Detection of hepatitis B virus-specific DNA in the genome of human hepatocellular carcinoma and liver circhosis tissue [3]. 3 Gene Virol, 1981, 57:95 102
- [5] Ogston CW, Jonak GJ, Rogler CE, et al. Cloning and structural analysis of integrated woodchuck hepatitis virus sequences from hepatocellular carcinomas of woodchucks [1]. Cell, 1982, 29:385 – 394
- [6] Marion PC, Pavelaar MJ, Knight SS, et al. Hepatocellular carcinoma in groud squirrels persistently infected with groud squirrel hepatitis virus [J]. Proceedings of National Academy of Sciences USA, 1986, 83;4543
- [7] Yokosuka O, Omata M, Zhou YZ, et al. Duck hepatitis B virus DNA in liver and serum of Chinese ducks: Integration of viral DNA in hepatocellular carcinoma [J]. Proceedings of National Academy Sciences USA, 1985, 82:5180
- [8] Koshy R, Koch S, Kahmann R, et al. Integration of hepatitis B virus DNA: Evidence for integration in the single-stranded gap. Cell. 1983, 34:21
- [9] Mizusawa H, Taira M, Yaginuma K, et al. Inversely repeating integrated hepatitis B virus DNA and cellular flanking sequences in the human hepatoma-derived cell line huSP. Proceedings of National Academy Sciences USA, 1985, 82:208 212
- [10] Tim Harrison, Arie Zucketman. The Molecular Medicine of Viral Hepatitis [M] England: John Wiley & Sons Ltd. 1997, 99 103
- [11] Chu Chieh Hsia, Hao Yuwen, Edward Tabor Hor-spot mutations in hepatitis B virus x gene in hepatocellular carcinoma [11]. The Lancet, 1996.348:625 626

The Discovery of HBV Core Promoter Mutations in Tumour Tissue of Patients with Hepatocellular Carcinoma

FANG Zhong-liao¹, YANG Jin-ye¹, WANG Xue-yan¹, ZHUANG Hui² Roger Ling³, Tim J Harrison³

¹(Health and Antiepidemic Station of Guangxi, Nanning 530021, China)

²(Beijing Medical University, Beijing 100083, China)

³(Royal Free Hospital School of Medicine, University of London,

Rowland Hill St., London NW3 2PF, UK)

Abstract: In order to understand the mechanisms of hepatitis B virus (HBV) in the development of hepatocellular carcinoma, the nested PCR was used to amplify HBV core promoter from tumour tissues of 14 HBV DNA positive patients with hepatocellular carcinoma, and 10 serum samples of hepatitis B patients and asymptomatic carriers respectively. The positive samples were sequenced by Sanger method. Ten of the fourteen tumour tissue samples (71.4%) were positive for HBV core promoter. Each sequence of all positive samples had the double mutations at nt 1762(A → T), 1764(G → A) in HBV core promoter and some point mutations around them. The case C14 had more extensive mutations, including deletion of 10 nucleotides. 6 of 10 serum samples of hepatitis B patients were positive for HBV core promoter and 3 of them had the double mutations. four of the ten serum samples of asymptomatic carriers were PCR positive while only 1 of them had the double mutations. These data implicate that the double mutations is most common in HCC patients, the next is hepatitis B patients and the last is asymptomatic carriers.

Key words: Hepatitis B virus; Core promoter; Mutation; Hepatocellular carcinoma; Integration