

应用 HBV-Alu-PCR 研究肝癌细胞株中乙型肝炎病毒整合

赵杨静^{1,2} 李国力³ 张恒辉² 谢兴旺² 贺改霞² 闫琳琳^{1,2} 李明珍⁴ 魏来² 曾辉³
邵启祥¹ 陈红松²

【摘要】目的 探讨常见肝癌细胞株中整合的乙型肝炎病毒 (HBV) 序列和整合位点。**方法** 分别将来源于HBV感染者的肝癌细胞株 (MHCC97H、MHCC97L、MHCCLM3和PLC/PRF/5), 稳定转染HBV的肝癌细胞株 (HepG2.2.15、HepAD38和DE19), 和无HBV感染者来源的肝癌细胞株 (HepG2、HuH-7) 培养72 h, 检测培养上清中乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)、乙型肝炎病毒E抗原 (HBeAg) 及HBV DNA滴度。采用HBV-Alu-PCR方法, 扩增肝癌细胞株中整合的HBV基因X/C/S片段及其侧翼的人基因组DNA片段, 对扩增片段进行测序确定HBV整合在人类染色体的精确位置, 并用生物信息学分析确定其上下游基因。**结果** MHCC97H、MHCC97L和MHCCLM3未检出HBsAg和HBeAg, 但HBV DNA滴度为 $2.00 \times 10^5 \sim 4.00 \times 10^5$ IU/ml; HepG2.2.15、HepAD38、DE19和PLC/PRF/5 HBsAg阳性, 且HBV DNA滴度 $> 5.00 \times 10^5$ IU/ml, 其中HepG2.2.15、HepAD38 HBeAg阳性; HepG2、HuH-7 HBsAg、HBeAg和HBV DNA均低于检测下限。除HepG2和HuH-7未检测到整合外, 其余细胞株中可检测到1个或多个整合的不同HBV 亚基因组片段: HepG2.2.15检测到5个HBx和HBc整合片段, HepAD38和PLC/PRF/5各检测到2个HBx整合片段, DE19检测到一个HBc整合片段。3个MHCC97的衍生细胞株: MHCC97L (低转移潜能肝癌细胞)、MHCC97H (高转移潜能肝癌细胞) 和MHCCLM3 (MHCC97H肺转移肝癌细胞) 检测到完全相同的HBc片段整合在16q13上IRX3和IRX5基因之间的非编码区。此外, 各细胞株HBV整合位点上下游的基因主要包括肿瘤相关基因, 核糖体蛋白编码基因和钙信号相关基因。**结论** HBV感染者来源和稳定转染HBV的肝癌细胞株存在HBV整合; HBV基因X/C片段比S片段有更高的整合频率; 同一个克隆来源的肝癌细胞株的HBV整合位点稳定, 提示HBV整合分析可能对肝细胞癌原发灶和转移灶癌细胞克隆来源的鉴定提供参考。

【关键词】 肝炎病毒; 乙型; 肝癌细胞株; 病毒整合

Identification of hepatitis B virus integration in human hepatocellular carcinoma cell lines by HBV-Alu-PCR Zhao Yangjing^{1,2}, Li Guoli³, Zhang Henghui², Xie Xingwang², He Gaixia², Yan Linlin^{1,2}, Li Mingzhen⁴, Wei Lai², Zeng Hui³, Shao Qixiang¹, Chen Hongsong². ¹School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang Jiangsu 212013, China; ²Peking University People's Hospital, Peking University Hepatology Institute, Beijing Key Laboratory of Hepatitis C and Immunotherapy for Liver Diseases, Beijing 100044, China; ³Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China; ⁴Beijing Center for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100089, China
Corresponding author: Chen Hongsong, Email: chenhongsong2999@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the integration of hepatitis B virus (HBV) in human hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines. **Methods** HCC cell lines, which established from patients with HBV infection (MHCC97H, MHCC97L, MHCCLM3 and PLC/PRF/5), stably transfected with HBV (HepG2.2.15, HepAD38 and DE19) and without HBV infection (HepG2 and HuH-7), were cultured for 72 h and cell supernatants were harvested for HBsAg, HBeAg and HBV DNA quantification. HBV-Alu-PCR was used to amplify the integrated HBV X/C/S genes and their flanking sequences in human genomic DNA of the HCC cell lines. The integrated HBV fragments and integration sites were determined by sequencing the PCR products. The

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.05.027

基金项目: 国家重大科技专项 (No. 2008ZX10002-019); 国家自然科学基金 (No. 91029741; No. 81001072; 81273202); 江苏省临床医学科技专项 (No. BL2013024)

作者单位: 212013 镇江市, 江苏大学医学院¹; 100044 北京, 北京大学人民医院北京大学肝病研究所, 丙型肝炎及肝病免疫治疗北京市重点实验室²; 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院, 新发突发传染病研究北京市重点实验室³; 100089 北京, 北京市理化分析测试中心⁴

通讯作者: 陈红松, Email: chenhongsong2999@163.com

upstream and downstream human genes adjacent to the integration sites were identified by bioinformatics analysis. **Results** MHCC97H, MHCC97L and MHCCLM3 were negative for HBsAg and HBeAg, but positive for HBV DNA with a titer ranged between 2.00×10^5 to 4.00×10^5 IU/ml. HepG2.2.15, HepAD38, DE19 and PLC/PRF/5 were positive for HBsAg with a HBV DNA titer higher than 5.00×10^5 IU/ml. HepG2.2.15 and HepAD38 were positive for HBeAg. HepG2 and HuH-7 were negative for HBsAg, HBeAg and HBV DNA. One or more integrated HBV sub-genome fragments were detected in cell lines except for HepG2 and HuH-7. Among them, up to five integration sites were detected in HepG2.2.15 (HBx/HBc), two in HepAD38 and PLC/PRF/5 (HBx), one in DE19 (HBc). Interestingly, three HCC cells (MHCC97H, MHCC97L and MHCCLM3), which had the same clone origin from MHCC97, contained exactly the same HBC fragment integrated into the same site. Furthermore, HBV integration mainly targeted genes belonging to distinct pathways: cancer related genes, calcium signaling related genes, ribosomal protein encoding genes. **Conclusions** HBV integration occurs in HCC cell lines from patients with HBV infection and HCC cell lines stably transfected with HBV virus genome. HBx and HBc are the main HBV fragments integrated into the genomic DNA of HCC cells. HCC cells from the same clone origin contain the same HBV integration site, which may be used to trace the clone origin of primary or metastatic HCC cells.

【Key words】 Hepatitis B virus; Hepatocellular carcinoma cell; Virus integration

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是我国最常见的恶性肿瘤之一, HBV感染是增加肝癌患病风险的重要致病因素^[1]。自1980年Brechot等^[2]首次报道HBsAg阳性HCC患者癌组织存在HBV整合以来, 大量研究集中在HBV整合与HCC发生机制关系的探讨。1995年Minami等^[3]建立了特殊的Alu-PCR被应用于检测HBV病毒-细胞接头序列, 为探讨HBV DNA整合及HBV致癌机制提供了快速的方法。目前常见肝癌细胞株HBV整合情况尚不清楚, 本研究采用Alu-PCR (Alu repeat sequence polymerase chain reaction) 对人肝癌细胞株基因组进行病毒整合位点的分析, 以期望明确目前实验室常用肝癌细胞株的HBV整合, 为将来应用于临床HCC诊断分析奠定基础。

材料与方 法

一、实验材料

1. 实验细胞: HBV感染者来源的肝癌细胞株 (MHCC97H、MHCC97L、MHCCLM3和PLC/PRF/5), 稳定转染HBV的肝癌细胞株 (HepG2.2.15、HepAD38和DE19), 无HBV感染者来源的肝癌细胞株 (HepG2和HuH-7), 见表1。

2. 主要试剂: DNA提取试剂盒、PCR试剂盒购自美国Promega公司, HBsAg及HBeAg检测试剂盒购自美国Abbott公司, HBV DNA定量试剂盒购自德国QIAGEN公司, PCR引物由上海生工生物工程公司合成, PCR产物纯化及全自动测序由北京奥科鼎盛生物科技完成。

二、实验方法

1. 细胞培养上清HBsAg、HBeAg及HBV DNA滴度检测: 将对数生长期细胞接种于100 mm培养皿, 加入10 ml培养基, 37 °C、5% CO₂浓度培养箱

中培养72 h, 细胞生长至80%~90%融合度, 收集并检测上清HBsAg、HBeAg和HBV DNA滴度, 每个样品重复检测3次。

2. 细胞DNA提取: 按照DNA提取试剂盒说明书提取细胞基因组DNA, 用分光光度法测定吸光度 (A_{260}), 对DNA浓度定量并调整浓度为10 ng/ μ l。

3. HBV-Alu-PCR扩增病毒-细胞接头序列: 扩增方法详见文献^[4], 引物序列 (表2), 引物合成用dUTP代替dTTP, 在Alu引物的5'-端人工加入一段“标签序列”。具体步骤为: ①第一轮扩增引物为Alu引物UP5 (或T3-515) 和HBV引物pUTP (或uPre31、uPreS2), 每种细胞DNA模板做6套扩增。20 μ l体系含10 μ l Mix, 0.1 μ l Alu引物, 1 μ l HBV引物, 2 μ l模板, 6.9 μ l ddH₂O。94 °C预变性2 min, 每个循环包括94 °C、0.5 min, 55 °C、0.5 min, 72 °C、3 min, 进行15次循环, 72 °C补平延伸5 min。②尿嘧啶DNA糖苷酶 (UDG) 消化: 在体系中加入0.5 U UDG, 37 °C反应30 min, 使含有dUTP的DNA位点断裂, 94 °C 10 min中止反应。③第二轮扩增: Alu引物UP6 (或midT3) 分别对应第一轮引物UP5和T3-515, HBV引物MM37 (或MM31、MM2R) 分别对应pUTP、uPre31和uPreS2。20 μ l体系含10 μ l Mix, 引物各0.1 μ l, 1 μ l模板, 8.8 μ l ddH₂O。94 °C预变性2 min, 每个循环包括94 °C、0.5 min, 65 °C、0.5 min (每次循环退火温度降落1 °C), 72 °C、3 min, 进行15个循环, 72 °C补平延伸5 min。④第三轮扩增: Alu引物UP6 (或midT3), HBV引物MM60 (或MM25、MD71) 分别对应第二轮引物MM37、MM31和MM2R, 取1 μ l第二轮扩增产物为模板, 50 μ l体系, 扩增条件同第二轮扩增。

4. DNA测序及序列分析: PCR第三轮产物经1%琼脂糖凝胶电泳确认有目的条带的产物经胶回

收纯化测序, 测序引物HB3 (图1)。测序结果采用美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的BLAST检索获取位于HBV侧翼的细胞DNA序列基因库登陆号, Map Viewer检索确定整合在染色体上的定位。

结 果

一、肝癌细胞培养上清HBsAg、HBeAg及HBV DNA滴度

MHCC 97H、MHCC 97L和MHCCLM3未检出HBsAg和HBeAg, 但HBV DNA滴度为 $2.00 \times 10^5 \sim 4.00 \times 10^5$ IU/ml; HepG2.2.15、HepAD38、DE19和PLC/PRF/5 HBsAg阳性, 且HBV DNA滴度 $> 5.00 \times 10^5$ IU/ml, 其

中HepG2.2.15、HepAD38 HBeAg阳性; HepG2、HuH-7的HBsAg、HBeAg和HBV DNA均未检出, 见表3。

二、肝癌细胞株HBV基因整合发生率及整合的HBV基因

除HepG2、HuH-7未检测到整合外, 其余细胞株可检测到1个或多个整合的不同HBV亚基因组片段。HepG2.2.15细胞具有来自HBx和HBc亚基因组的5个整合片段, HepAD38细胞和PLC/PRF/5细胞均可检测到2个来自HBx的整合片段, DE19细胞有一个来自HBc的整合片段。此外, 3个MHCC97的衍生细胞株: MHCC97L (低转移潜能肝癌细胞)、MHCC97H (高转移潜能肝癌细胞)和MHCCLM3 (MHCC97H肺转移肝癌细胞), 具有完全相同的HBC基因片段整合 (位于16q13上IRX3和IRX5基因

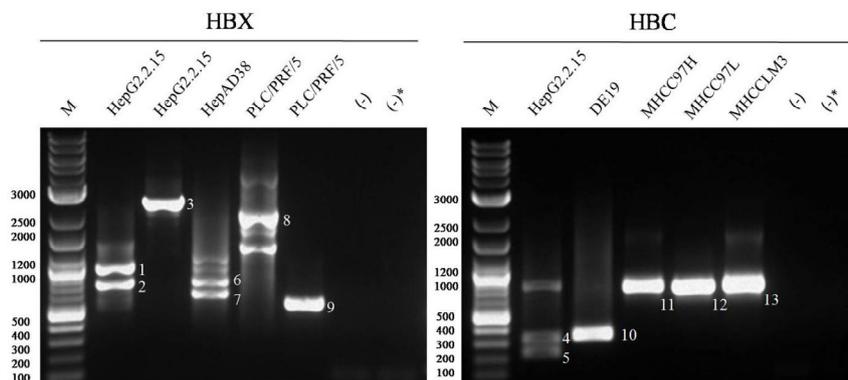
表1 肝癌细胞株来源及背景资料

细胞名称	细胞来源	背景资料
MHCC97H	中国人民解放军军事医学科学院赠送	1997年田健等 ^[10] 从转移性肝癌组织模型LCID20中分离出的具有自发性高转移潜能人肝癌细胞株MHCC97后, 2001年Li等 ^[11] 从MHCC97中分离出高转移潜能人肝癌细胞, 免疫组化HBsAg阴性, 荧光PCR法检测细胞基因组HBV DNA阳性且存在整合
MHCC97L	中国人民解放军军事医学科学院赠送	2001年Li等 ^[11] 从MHCC97中分离出低转移潜能的人肝癌细胞 (HBsAg和HBV DNA同MHCC97H)
MHCCLM3	中国人民解放军军事医学科学院赠送	2002年李雁等 ^[12] 利用MHCC97H建立人肝癌细胞肺转移细胞 (HBsAg和HBV DNA同MHCC97H)
PLC/PRF/5	中国科学院上海生科院细胞资源中心	1976年Alexander等 ^[13] 从1例原发性肝癌男性患者建立的人肝癌亚历山大细胞, 高分泌adw亚型HBsAg, 不分泌HBeAg、Dane颗粒 ^[7]
HepG2.2.15	中国疾病预防控制中心病毒所赠送	1987年Sells等 ^[14] 将HBV基因的重载体质粒pDolTHBV-1转染HepG2经G418筛选建立的人肝癌细胞, 分泌HBsAg、HBeAg和Dane颗粒
HepAD38	本所保存	1997年Ladner等 ^[15] 将对四环素敏感的巨细胞病毒启动子连接到PBR322质粒并与ayw亚型HBV基因连接成ptetHBV质粒, 转染HepG2经G418筛选建立的人肝癌细胞, 分泌HBsAg、HBeAg, 培养基去除四环素可向上清分泌病毒颗粒
DE19	本所保存	2007年Guo等 ^[16] 将对四环素敏感的巨细胞病毒启动子连接到pTREHBVDE质粒和表达Tet敏感的转录激活剂的pTet-off质粒转染HepG2经G418筛选建立的人肝癌细胞, 培养基去除四环素可向上清分泌病毒颗粒
HepG2	美国模式培养物研究所 (ATCC) 购买	1980年Knowles等 ^[17] 从1例15岁高加索男性患者肝癌活体标本中分离的人肝癌细胞, 不分泌HBsAg、HBeAg, 不分泌病毒颗粒
HuH-7	Drexel University, Institute for Hepatitis and Virus Research (IHVR) 赠送	1982年Nakabayshi等 ^[18] 从1例57岁高分化肝细胞癌患者建立的人肝癌细胞, 不分泌HBsAg、HBeAg, 不分泌病毒颗粒

表2 引物序列

引物名称	序列 (5'-3')	HBV 序列中的位置 (bp)	附注
UP5	CAGUGCCAAGUGUUUGCUGACGCCAAAG UGCUGGGAUUA		Alu 正义序列
T3-515	AUUAACCCUCACUAAAGCCUCG AUAGAUYYRCCAYUGCAC		Alu 反义序列
UP6	CAAGTGTGCTGACGCCAAAG		Alu 正义序列 (tag)
midT3	ATTAACCCCTACTAAAGCCTCG		Alu 反义序列 (tag)
pUTP	ACAUGAACUUUACCCCGUUGC	1 131-1 152	HB1 (HBx)
MM37	TGCCAAGTGTGCTGACGC	1 174-1 193	HB2 (HBx)
MM60	CTGCCGATCCATACTGCGGAAC	1 258-1 279	HB3 (HBx)
uPre31	GAGUUCUUCUUCUAGGGGACCUG	2 350-2 328	HB1 (HBc)
MM31	AGTGCGAATCCACACTC	2 288-2 269	HB2 (HBc)
MM25	GGAAGGAAAGAAGTCAGAAGG	1 978-1 960	HB3 (HBc)
uPreS2	ACACGCGGUUUUUGGGGTGGAG	3 042-3 065	HB1 (HBs)
MM2R	CAGGCTCAGGGCATATTGACAA	3 070-3 091	HB2 (HBs)
MD71	YCCTGCTGGTGGCTCCAGTTC	55-75	HB3 (HBs)

注: U = dUTP, Y = (C, T), R = (A, G), 引物设计参考乙型肝炎病毒完整DNA序列 (Pubmed核苷酸登录号V00866), 引物UP5和T3-515下划线部分为标签序列



注: M, DNA Ladder; (-) 和 (-)* 为阴性对照, 电泳条带右侧 1~13 编号与表 4 编号对应, 左侧为各细胞株 HBX 基因整合, 右侧为各细胞株 HBC 基因整合

图 1 HBV-Alu-PCR 阳性扩增产物电泳图

之间的非编码区), 见表4。所有检出整合的PCR产物碱基序列均来源于HBV基因X/C片段: X片段出现7个整合, C片段出现6个整合, 未检出S片段整合。

三、HBV整合位点在染色体中的分布及邻近宿主基因

MHCC97H、MHCC97L和MHCCLM3整合在16号染色体, PLC/PRF/5整合在5、11号染色体, HepG2.2.15整合在4、9、10、16、20号染色体,

HepAD38整合在2、3号染色体, DE19整合在22号染色体(图2)。病毒-细胞接头序列插入宿主基因或上下游基因间的非编码区(整合位点与上下游基因距离在3.3~472.3 kb), 包括3个癌症相关基因(抑癌基因TERT和PAX5, 癌基因RAB1A), 2个核糖体蛋白编码基因(RPL23AP61和RPL21P41), 1个钙信号相关基因(CDH4)。MHCC97H、MHCC97L和MHCCLM3存在相同的整合位点,

表3 肝癌细胞株HBsAg、HBeAg及HBV DNA载量

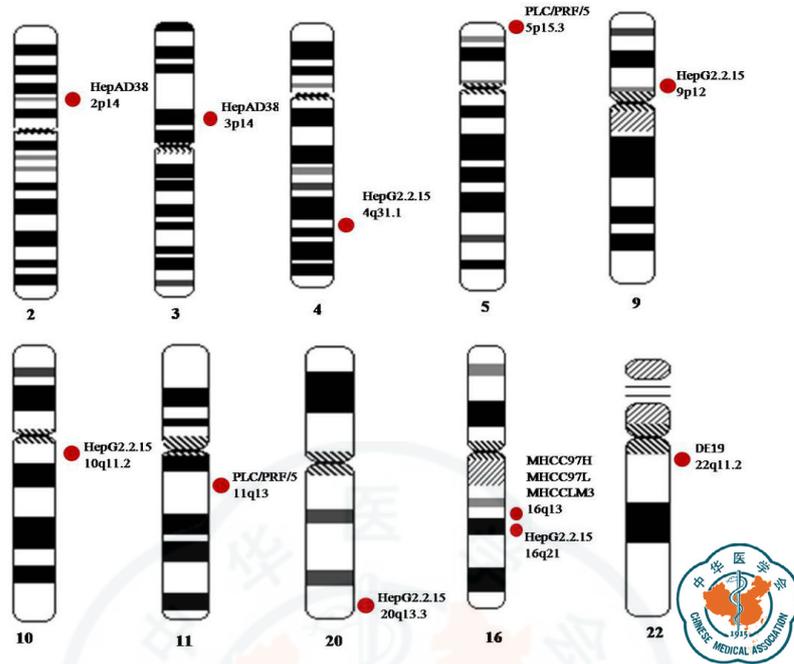
细胞	HBsAg (IU/ml)	HBeAg (S/CO)	HBV DNA 载量 (lg 值, IU/ml)
MHCC97H	—	—	5.39 ± 0.05
MHCC97L	—	—	5.32 ± 0.01
MHCC LM3	—	—	5.50 ± 0.02
PLC/PRF/5	24.61 ± 2.57	—	5.73 ± 0.01
HepG2.2.15	13.07 ± 0.99	59.67 ± 4.02	6.25 ± 0.80
HepAD38	4.18 ± 0.40	21.97 ± 5.48	7.31 ± 0.14
DE19	5.19 ± 0.86	—	5.72 ± 0.01
HepG2	—	—	—
HuH-7	—	—	—

注: HBsAg < 0.05 IU/ml 为阴性, 表示为“—”; HBeAg < 1.00 S/CO 为阴性, 表示为“—”; HBV DNA 定量 < 5 × 10² IU/ml 为低于检测下限, 表示为“—”

表4 肝癌细胞株HBV-Alu-PCR产物测序结果

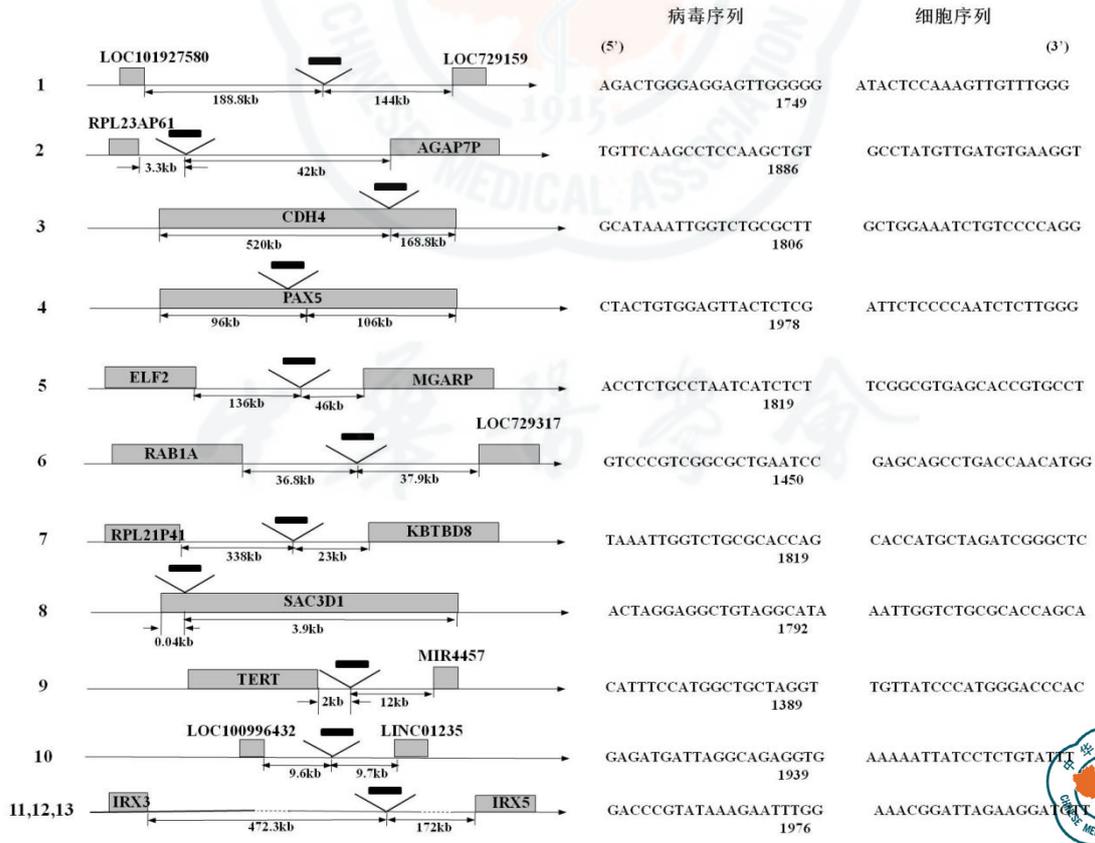
细胞	HBV 整合亚基因	染色体定位	整合位点所定位的基因			电泳条带号
			插入基因	上游基因	下游基因	
HepG2.2.15	HBX	16q21		LOC101927580	LOC729159	1
		10q11.2		RPL23AP61	AGAP7P	2
		20q13.3	CDH4			3*
HepAD38	HBC	9p12	PAX5			4
		4q31.1		ELF2	MGARP	5
		2p14		RAB1A	LOC729317	6
PLC/PRF/5	HBX	3p14		RPL21P41	KBTBD8	7
		11q13	SAC3D1			8
DE19	HBC	5p15.3		TERT	MIR4457	9*
		22q11.2		LOC100996432	LINC01235	10
MHCC97H	HBC					11*
MHCC97L		16q13		IRX3	IRX5	12*
MHCCLM3						13*

注: 无/有*标记分别代表Alu正义、反义序列引物与HBV基因引物扩增产物



注：红点代表整合位点，并标出细胞名称及染色体区带

图 2 HBV 整合位点在人类染色体分布



注：左侧编号与表 4 编号对应，左侧为病毒 - 细胞接头插入染色体基因，灰色条框代表基因，黑色粗线代表插入的 HBV 片段，起始密码子和终止密码子与插入位点的距离用数字标出 (kb)；右侧为病毒 - 细胞接头序列中病毒序列最后 20 个核苷酸和细胞序列起始 20 个核苷酸

图 3 HBV 整合附近的宿主基因示意图

HBC基因片段插入16q13上IRX3和IRX5基因(易洛魁基因同源基因家族)间的非编码区,说明同一克隆来源的细胞HBV整合位点较为稳定(图3)。

讨 论

基因整合是HBV感染过程中的常见现象,本研究发现除MHCC97H、MHCC97L和MLCCLM3外,发生HBV基因整合的不同来源的HCC细胞株均分泌HBsAg;HBV DNA分泌型肝癌细胞均存在HBV整合;而HBsAg、HBeAg及HBV DNA均为阴性的细胞不存在整合。从建系资料看PLC/PRF/5为不分泌病毒颗粒的HCC细胞株,但本研究结果发现,HBV DNA阳性可能是由于PLC/PRF/5含有大部分或全部HBV基因组,HBV DNA整合进宿主DNA,且无游离的HBV DNA^[5],但细胞株在长时间培养过程中整合的HBV DNA能够编码完整的病毒颗粒或出现游离HBV DNA并分泌至细胞外。

理论上,病毒基因片段越短越易插入宿主基因,本研究发现肝癌细胞中HBx是病毒整合频率最高的基因,其次是HBc,未检出HBs整合,与之前相关报道吻合^[4,6]。

MHCC97H、MHCC97L和MLCCLM3中HBV均整合在IRX3和IRX5基因间的非编码区,提示同一克隆来源的肝癌细胞的整合位点稳定,因此对HBV DNA整合位点的分析有可能用来追溯HCC原发灶和转移灶中癌细胞是否同源性。Edman等^[7]采用针对HBV基因片段的特异性探针检测PLC/PRF/5整合位点发现:PLC/PRF/5至少含有6个整合的HBV亚基因组片段,大多发生在病毒DNA的缺口黏合末端区域。但由于Alu-PCR检出水平的限制,本研究只检出了2个整合位点,其中HBx基因片段插入的端粒酶逆转录酶基因(TERT)是第一个被发现有HBV重复整合现象的“热点基因”,作为癌基因的重要一员在肝癌中有很高的表达^[8]。稳定转染HBV建立的HepG2.2.15、HepAD38和DE19均存在1个或多个整合,细胞建系资料提示理论上只存在一个整合位点,然而检测出多个整合位点,可能是在细胞传代过程中病毒颗粒重新感染细胞发生整合,导致新整合位点的出现。HepG2.2.15整合位点所插入的抑癌基因PAX5高甲基化在癌前病变及HCC发展中有重要作用^[9]。HepG2和HuH-7细胞未检出整合可能是细胞本身未整合,也可能低于Alu-PCR检测下限。本研究由于检测出的整合位点数量限制,HBV整合位点在染色体分布未发现明确规律。此外,本研究结果显示,HepAD38等标本出现多条带,但未检测到相应整合结果,可能是由于引物合成时dUTP代替dTTP引物不纯等原因导致非特异扩增。

综上所述,HBV感染者来源和稳定转染HBV的肝癌细胞株中均确定存在HBV整合;HBV基因X/C片段比S片段更易发生整合;同一来源的不同HCC细胞株具有稳定的整合位点提示癌细胞的同源性,HBV整合位点的分析可能对HCC原发灶和转移灶癌细胞来源的鉴定提供参考。本研究初步明确了目前实验室常用肝癌细胞株HBV整合情况,对肝癌相关基础及临床研究有一定参考价值。

参 考 文 献

- 1 Hai H, Tamori A, Kawada N. Role of hepatitis B virus DNA integration in human hepatocarcinogenesis [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(20):6236-6243.
- 2 Brechot C, Pourcel C, Louise A, et al. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma[J]. *Nature*, 1980, 286(5772):533-535.
- 3 Minami M, Poussin K, Bréchet C, et al. A novel PCR technique using Alu-specific primers to identify unknown flanking sequences from the human genome[J]. *Genomics*, 1995, 29(2):403-408.
- 4 Murakami Y, Saigo K, Takashima H, et al. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas[J]. *Gut*, 2005, 54(8):1162-1168.
- 5 Marion PL, Salazar FH, Alexander JJ, et al. State of hepatitis B viral DNA in a human hepatoma cell line[J]. *J Virol*, 1980, 33(2):795-806.
- 6 Sung WK, Zheng H, Li S, et al. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Genet*, 2012, 44(7):765-769.
- 7 Edman JC, Gray P, Valenzuela P, et al. Integration of hepatitis B virus sequences and their expression in a human hepatoma cell[J]. *Nature*, 1980, 286(5772):535-538.
- 8 Horikawa I, Barrett JC. cis-Activation of the human telomerase gene (hTERT) by the hepatitis B virus genome[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(15):1171-1173.
- 9 Pogribny IP, Rusyn I. Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2014, 342(2):223-230.
- 10 田健, 汤钊猷, 叶胜龙, 等. 具有高转移潜能的人肝癌细胞系的建立及其生物学特性[J]. *中华肿瘤杂志*, 1998, 20(6):405-407.
- 11 Li Y, Tang ZY, Ye SL, et al. Establishment of cell clones with different metastatic potential from the metastatic hepatocellular carcinoma cell line MHCC97[J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7(5):630-636.
- 12 李雁, 汤钊猷, 叶胜龙, 等. 体内连续筛选法建立自发性肺转移人肝癌细胞系[J]. *中华医学杂志*, 2002, 82(9):601-605.
- 13 Alexander JJ, Bey EM, Geddes EW, et al. Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver[J]. *S Afr Med J*, 1976, 50(54):2124-2128.
- 14 Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(4):1005-1009.
- 15 Ladner SK, Otto MJ, Barker CS, et al. Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a novel system for screening potential inhibitors of HBV replication[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41(8):1715-1720.
- 16 Guo H, Jiang D, Zhou T, et al. Characterization of the intracellular deproteinized relaxed circular DNA of hepatitis B virus: an intermediate of covalently closed circular DNA formation[J]. *J Virol*, 2007, 81(22):12472-12484.
- 17 Knowles BB, Howe CC, Aden DP. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen[J]. *Science*, 1980, 209(4455):497-499.
- 18 Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, et al. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium[J]. *Cancer Res*, 1982, 42(9):3858-3863.

(收稿日期: 2014-12-18)

(本文编辑: 孙荣华)