

HBV 导致肝细胞癌机制研究进展

徐浩 兰孟东 赵龙凤

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤,在男性肿瘤中居第五位,女性肿瘤中居第八位,估计每年有 5000 ~ 10 000 新增病例^[1,2]。在世界范围内,慢性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是 HCC 形成的主要危险因素。经历数十年的慢性 HBV 感染后,约有 30% ~ 40% 的患者进展为肝硬化,而这些肝硬化的患者中每年又有 1% ~ 5% 随后发展为 HCC^[3]。最新研究^[4]表明 HBsAg 携带者与未感染 HBV 的人群相比发展为 HCC 的风险增高 25 ~ 37 倍。在过去的三十年中,针对 HBV 在肿瘤形成过程中的作用进行了大量的研究。

经广泛研究认为,多种因素参与 HBV 相关的 HCC 的形成过程。Liu 等^[3]认为 HBV 相关的 HCC 的形成包含宿主细胞与 HBV 两方面因素,对最终的病理结果独立或协同发挥作用。目前,HBV 与肿瘤形成相关的不同模型已经出现。越来越多的证据指向了 HBV 特异性致肿瘤形成的两个主要机制:第一,病毒基因组的直接致癌作用;第二,病毒表达产物的间接致癌作用,这两种机制可能是起协同作用的。

一、病毒基因组的致癌机制

1. 病毒基因与宿主基因的整合:基因整合并非病毒复制所必需的,但却使病毒基因组得以保存。几乎所有 HBV 相关的 HCC 均包含 HBV 的整合基因。

HCC 基因中毗邻 HBV 基因整合点处的人类基因,目前认为主要有 8 个蛋白编码区:ras 效应元件结合蛋白、钙调节蛋白、混合性白细胞介素-2、FLJ333655、LOC220272、LOC255345、LOC220220 和 LOC168991。与基因整合有关的遗传不稳定性可潜在改变癌基因、肿瘤抑制基因、微小 RNA 的表达,这些可能是 HBV 致病的重要因素^[4]。在许多病例中,病毒基因的整合是以重排和/或部分缺失为特点的。HBV 基因整合可诱发宿主染色体整合部位基因的缺失。基于以上的观察事实可以推测整合事件本身是导致细胞周期调控关键元件失控的原因^[5]。

对于病毒基因整合发生的具体时间,目前主要有以下两种相对学说:(1)Feitelson 等^[6]认为 HBV 的致癌作用与 HBV 慢性感染有关。一个突出特征就是 HBV 亚基因组的碎片基因可以整合入宿主基因的不同位置,这种基因整合是随机发生的,伴随着慢性肝脏疾病整个过程,在肝细胞的再生过程中会助长基因的不稳定性,但 HBV 基因整合在肿瘤形成中的真正作用尚不明确;(2)Lupberger 等^[7]通过聚合酶链反应发现 HBV 基因整合入细胞基因发生在 HBV 感染的早期

作者单位:100011 北京市,北京地坛医院传染病研究所(徐浩、兰孟东);山西医科大学第一附属医院感染病科(徐浩、赵龙凤)
通讯作者:兰孟东 Email: dylanmd@163.com

甚至是急性自限性 HBV 感染之后,且这种整合可发生在基因的细胞信号转导级联调控区,可控制细胞增殖及细胞发育。

2. 与细胞增殖分化相关基因的甲基化: Su 等^[5]认为由于基因甲基化导致的基因失活在 HCC 形成中也发挥重要作用,为此其设计实验对比非肝硬化、肝硬化以及 HCC 三阶段的异常甲基化的发生情况,结果发现基因的甲基化可发生在肝脏疾病的不同阶段。

在癌变过程中,发生甲基化的基因不止一种,p16INK4a 基因的甲基化与 HBV 相关的 HCC 的关系目前研究较多。p16INK4a 蛋白可通过间接作用途径抑制染色体合成,阻止细胞由 G1 期进入 S 期。p16INK4a 基因的甲基化可导致细胞周期调节失控诱发细胞癌变。Zhu 等^[8,9]研究提示,p16INK4a 的超甲基化与癌前损伤的 HBV X 蛋白高表达有相关性。此外,X 蛋白在 HBV 相关 HCC 的早期病变中通过诱导 p16INK4a 启动子的甲基化而使该基因产物的表达量改变,从而诱发肿瘤形成。

3. HBV 基因的突变:除了基因的插入以及甲基化外,HBV 增强子 II 和核心启动子基因序列的变异也与 HCC 的形成有关^[10]。HBV 增强子和启动子可以调控病毒基因的复制和转录。HBV 增强子区域位于 HBV 基因 1000 ~ 1250 核苷酸区,相当于核心抗原基因启动子上游 400 bp 处,即 HBsAg 基因编码序列与 X 基因之间。HBV 核心启动子区含肝脏富含因子的独立结合点,变异的核心启动子可改变这种结合,降低前-C 区的 RNA 转录,最终使 HBeAg 表达减少,核心启动子区域的变异还可使前基因组 RNA 转录增强 2 ~ 3 倍,提高病毒的装配和释放。Chou 等^[10]通过病例对照研究认为核心启动子的双重变异与 HCC 的发生在统计学上存在相关性,这值得我们关注。由此可得出持续有风险的序列变异在 HCC 发生中起重要作用。

最近,科学家们就 T1653 的突变进行了较多研究。Shinkai 等^[11]研究结果表明无论 HBeAg 状态如何,HBV 的 T1653 突变增加了 HBV C2 基因型患者发展成为 HCC 的风险。Orito 等^[12]也发现日本 C 基因型患者的 HBV 核心启动子区 T1653 突变与 HCC 发生有关。Yuen 等^[13]研究认为核心启动子及 T1653 突变与 HBV 基因水平及肝硬化都是促 HCC 形成的独立危险因素,如果这几种独立因素联合作用,HCC 发生的潜在风险将会增加。

Lin 等^[14]对 HBV 的前-S 区进行了研究,发现前-S 区的缺失突变在 C 型 HBV 感染者中频繁发生。他们认为无论何种基因型的 HBV 感染,发生了前-S 缺失突变可能与 HCC 的发生有关。

4. HBV 不同基因型与 HCC 发生的关系:近期有很多关于 HBV 基因型与 HCC 发生相关性的报道,亚洲 HBV 的基因型主要是 B 型和 C 型。B 型 HBV 又进一步分为 Ba 型和 Bj 型,前者在亚洲普遍存在,后者主要分布在日本。Orito 等^[12]调查了不同 HBV 基因型在病原学和临床上与 HCC 发生的关系,认为与 Ba 和 C 基因型相比,Bj 型 HBV 相关的 HCC 的发生率较低,且 Bj 基因型的 HBV 患

者发展为 HCC 的时间较晚。另有学者^[15]对 C 型 HBV 患者的 X 基因测序结果进行统计学分析发现, X 基因的第 38 位密码子突变是 HCC 发生的独立危险因素。

二、病毒基因产物的致癌机制

在 HBV 转录激活中起主要作用的是 X 蛋白。X 蛋白被认为具有多效功能并参与慢性感染肝细胞的恶性转化^[16]。X 蛋白可反式激活多种癌基因和抑癌基因,在转录水平上介导肿瘤的形成,且其还具有生长因子样作用,可直接刺激细胞生长并影响细胞分裂、分化和增殖,可与相关的 DNA 修复蛋白结合,导致受损细胞修复失败,从而发生癌变。X 蛋白可阻断 Fas/FasL 凋亡信号途径,抑制细胞凋亡。

Pin1 是一种独特的肽基脯氨酰顺反异构酶,它专一性催化已磷酸化的丝/苏-脯氨酰顺/反异构,这种构型转变是蛋白磷酸化后的调节机制,主要关系到细胞增殖和转化。Pin1 在人类多种肿瘤中过表达,可加强和催化多种致癌信号表达,被称为肿瘤发生发展的催化分子。HBV 的 X 蛋白具有丝氨酸-脯氨酸基序可以与肽基脯氨酸顺反异构酶结合,从而发挥该异构酶的致癌作用^[17]。这是新发现的 HBV X 蛋白促肝细胞癌发生的又一作用机制。

端粒是真核生物线形染色体末端的核苷酸重复序列,对维持染色体的稳定性具有重要作用。端粒酶是维持端粒长度必需的一种逆转录酶,是由 RNA 和蛋白质组成的酶,在细胞增殖、衰老、永生化和癌变等方面都发挥重要作用。肿瘤细胞的端粒酶发生明显变化,有较高水平的表达和很强的活性,已成为癌变细胞一个带有普遍意义的生物学标志。Zhou 等^[18]分别用 S 基因、C 基因和 X 基因转染 HepG2 细胞,同步培养后检测 3 种细胞系的端粒酶活性指数及凋亡率,发现 39.5% 的表达 X 基因的细胞进入 S 期,端粒酶活性较其它两种细胞高,而且抗-端粒酶的反义寡核苷酸诱导的凋亡率降低,这可能是肝细胞恶化的另一条途径。另有学者^[19]研究发现, X 蛋白可以激活人端粒酶逆转录酶(hTERT)使细胞发生永生化和癌变。hTERT 是端粒酶核蛋白复合体的一部分,在不同 HBV 相关的 HCC 可作为基因整合的靶位点。Kojima 等^[20]在 HCC 细胞 H7402 中瞬时转染和稳定转染 X 基因,发现其 hTERT 的表达和端粒酶的活性均显著提高。因此他们认为 X 蛋白能够上调肝癌细胞中 hTERT 的表达和活性。

HCC 中 HBV 的 X 基因是常见的可与宿主染色体发生整合的开放性读码框架,发生整合的 X 基因常常发生突变。突变的基因产物仍然保留与 p53 结合的能力,使 p53 的基因修复及其介导的细胞凋亡功能减弱^[21]。

HBV 的 X 蛋白参与 HCC 形成,已发生整合的 X 基因的编码产物常常缺乏 134 aa ~ 154 aa。有学者^[22]通过创建一系列 X 蛋白部分缺失的四环素表达细胞系,检测其对促有丝分裂途径的激活,对内源性细胞周期素 A 的表达以及对细胞凋亡的影响来寻找 X 蛋白的功能区。条件性表达 X 蛋白 51 aa ~ 140 aa 可以激活促有丝分裂途径诱导内源性细胞周期素 A 表达及致敏感细胞凋亡,这些作用与野生型 X 蛋白作用相同。而 X 蛋白 51aa ~ 115 aa 则无上述作用,支持 116 aa ~

140 aa 在激活促有丝分裂途径诱导内源性细胞周期素 A 表达及致敏感细胞凋亡中发挥作用。X 蛋白部分缺失的实验还显示了野生型 X 蛋白的两个氨基酸区域 1 aa ~ 78 aa 及 141 aa ~ 154 aa 对其自身功能的影响。通过与野生型 X 蛋白的免疫共沉淀实验表明 X 蛋白的 N-端 1aa ~ 78 aa 区域参与蛋白质-蛋白质相互作用导致 X 蛋白寡聚化。研究还发现 X 蛋白的 1 aa ~ 78 aa 参与野生型 X 蛋白的间接促有丝分裂途径的激活、内源性基因的表达及凋亡。通过对野生型 X 蛋白及仅有 1 aa ~ 140 aa 段的 X 蛋白的脉冲追踪研究证明 C-端的 141 aa ~ 154 aa 能够降低野生型 X 蛋白的稳定性,提示自发的缺乏 134 aa ~ 154 aa 的 X 蛋白变异株的稳定性增强可能在致 HCC 的过程中发挥作用。

Ou 等^[23]研究认为 HCC 中 HBV X 蛋白的表达与膜型金属基质蛋白酶 1 和金属基质蛋白酶 2 的表达量增高有关。膜型金属基质蛋白酶 1 和金属基质蛋白酶 2 的表达量增高提示了不良预后的可能性。进一步研究发现 X 蛋白可以上调膜型金属基质蛋白酶 1,随之介导金属基质蛋白酶 2 的表达上调。值得关注的是 X 蛋白介导的金属基质蛋白酶的活性与细胞迁移性的增加有关。X 蛋白通过上调金属基质蛋白酶以及细胞外基质的破坏更利于肿瘤细胞的侵袭性生长。

Park 等^[24]的最新研究认为:X 蛋白介导的 DNA 甲基转移酶的定向紊乱能够促进特定区域的超甲基化和整体的低甲基化。这些由 X 蛋白介导的后续调节在 HBV 相关的 HCC 形成过程中成为又一可能的机制。

三、其他 HBV 致 HCC 机制

谷胱甘肽-S-转移酶 P1 基因是一种抑癌基因,该基因的启动子区 CpG 岛即富含双核苷酸“CG”的区域,高甲基化可能是 HCC 发生的早期分子事件,在人 HCC 的发生发展中具有重要的作用。E-钙黏附蛋白与连环素结合形成复合物可以抑制肿瘤侵袭和转移,E-钙黏附蛋白还可通过信号转导通路与肿瘤发生相关。有学者^[5]研究了 HBV 与以上两种蛋白基因甲基化的关系,认为 HBV 感染可能会维持和加强谷胱甘肽-S-转移酶 P1 和 E-钙黏附蛋白启动子的甲基化而影响其抑癌作用。

KLF6 被认为是抑癌基因,可以通过上调 p21wAF1 表达等途径发挥其抑制细胞增殖的作用。Kremer-Tal 等^[25]研究得出 KLF6 在 HBV 相关的 HCC 进展中的表达常减少。KLF6 基因表达水平的下降可能在 HBV 相关的 HCC 发病机制中起到一定作用。

HSP gp96 能激发特异性抗肿瘤抗病毒 T 细胞反应。可通过 MHC I 类途径和 MHC II 类途径将抗原呈递给 CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺ T 细胞。HSP gp96 具有抗原加工和呈递作用,肿瘤组织中提出的 HSP-肽复合物可以作为肿瘤排斥抗原,诱导肿瘤特异性免疫,产生特异细胞毒性细胞,特异性杀死肿瘤细胞,以此参与肿瘤免疫。Yao 等^[26]研究发现 HCC 中异常表达 HSP gp96 与 HBV 的复制有关,这表明 HBV 感染可通过这一机制在 HCC 形成中发挥重要作用。

Zheng 等^[27]通过携带有整个 HBV 基因组的转基因小鼠模型进行研究表明,

HBV 本身是一个无效致癌物质。然而,HBV 可以通过摄入致癌物质二乙基亚硝酸胺(DEN)来促进 HCC 形成,此作用不参与肝脏慢性炎症,但通过 DEN 处理后肝细胞的凋亡以及代偿性的再生增强,这不需要 X 蛋白的参与。结论表明 HBV 在 HCC 形成中的直接作用与病毒和摄入的致癌物质之间的相互作用有关。这就对许多关于 HBV 致 HCC 的经典研究结论提出质疑。

综上所述,HBV 的感染与 HCC 的发生密切相关。近年来就 HBV 致 HCC 机制的研究已取得了很大进展,病毒基因及其产物可以从不同方面发挥致癌作用。研究还发现感染 HBV 的患者中还存在与肿瘤发生相关的一些特异性改变,然而这些特异性改变的确切致病机制尚未完全清楚,是否还存在其他未知的致癌机制仍需进一步的研究探索,明确疑惑之处,阐明发病机制,指导病毒性肝炎相关的 HCC 的预防和临床治疗。

参 考 文 献

- 1 Parkin DM, Stjernsward J, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. *Bull World Health Organ*, 1984,62:163-182.
- 2 El-Serag HB. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis*, 2001,5:87-107.
- 3 Liu CJ, Kao JH. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiology and pathogenic role of viral factors. *J Chin Med Assoc*, 2007,70:141-145.
- 4 Vallet S, Gouriou S, Nkontchou G, et al. Is hepatitis C virus NS3 protease quasispecies heterogeneity predictive of progression from cirrhosis to hepatocellular carcinoma? *J Viral Hepat*, 2007,14:96-106.
- 5 Su PF, Lee TC, Lin PJ, et al. Differential DNA methylation associated with hepatitis B virus infection in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 2007,121:1257-1264.
- 6 Feitelson MA, Lee J. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett*, 2007,252:157-170.
- 7 Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol*, 2007,13:74-81.
- 8 Zhu R, Li BZ, Ling YQ, et al. Chronic hepatitis B virus infection and the methylation status of p16INK4A promoter. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2007,29:166-170.
- 9 Zhu R, Li BZ, Li H, et al. Association of p16INK4A hypermethylation with hepatitis B virus X protein expression in the early stage of HBV-associated hepatocarcinogenesis. *Pathol Int*, 2007,57:328-336.
- 10 Chou YC, Yu MW, Wu CF, et al. Temporal relationship between hepatitis B virus enhancer II/basal core promoter sequence variation and risk of hepatocellular carcinoma. *Gut*, 2008,57:91-97.
- 11 Shinkai N, Tanaka Y, Ito K, et al. Influence of hepatitis B virus X and core promoter mutations on hepatocellular carcinoma among patients infected with subgenotype C2. *J Clin Microbiol*, 2007,45:3191-3197.
- 12 Orito E, Mizokami M. Differences of HBV genotypes and hepatocellular carcinoma in Asian countries. *Hepatol Res*, 2007,37: S33-35.
- 13 Yuen MF, Tanaka Y, Shinkai N, et al. Risk for hepatocellular carcinoma with respect to hepatitis B virus genotypes B/C, specific mutations of enhancer II/core promoter/precore regions and HBV DNA levels. *Gut*, 2008,57:98-102.
- 14 Lin CL, Liu CH, Chen W, et al. Association of pre-S deletion mutant of hepatitis B virus with risk of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007,22:1098-1103.
- 15 Muroyama R, Kato N, Yoshida H, et al. Nucleotide change of codon 38 in the X gene of hepatitis B virus genotype C is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 2006,45:805-812.
- 16 Lee AT, Lee CG. Oncogenesis and transforming viruses: the hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma --the etiopathogenic link. *Front Biosci*, 2007,12:234-245.
- 17 Pang R, Lee TK, Poon RT, et al. Pin1 interacts with a specific serine-proline motif of hepatitis B virus X-protein to enhance hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, 2007,132:1088-1103.
- 18 Zhou W, Shen Q, Gu B, et al. Effects of hepatitis B virus X gene on apoptosis and the activity of telomerase in HepG(2) cells.

- Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2000, 8: 212-214.
- 19 Tamori A, Yamanishi Y, Kawashima S, et al. Alteration of gene expression in human hepatocellular carcinoma with integrated hepatitis B virus DNA. Clin Cancer Res, 2005, 11: 5821-5826.
 - 20 Kojima H, Kaita KD, Xu Z, et al. The absence of up-regulation of telomerase activity during regeneration after partial hepatectomy in hepatitis B virus X gene transgenic mice. J Hepatol, 2003, 39: 262-268.
 - 21 Hussain SP, Schwank J, Staib F, et al. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. Oncogene, 2007, 26: 2166-2176.
 - 22 Li H, Chi CY, Lee S, et al. The mitogenic function of hepatitis B virus X protein resides within amino acids 51 to 140 and is modulated by N- and C-terminal regulatory regions. J Virol, 2006, 80: 10554-10564.
 - 23 Ou DP, Tao YM, Tang FQ, et al. The hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinoma metastasis by upregulation of matrix metalloproteinases. Int J Cancer, 2007, 120: 1208-214.
 - 24 Park IY, Sohn BH, Yu E, et al. Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein. Gastroenterology, 2007, 132: 1476-1494.
 - 25 Kremer-Tal S, Narla G, Chen Y, et al. Downregulation of KLF6 is an early event in hepatocarcinogenesis, and stimulates proliferation while reducing differentiation. J Hepatol, 2007, 46: 645-654.
 - 26 Yao DF, Wu XH, Su XQ, et al. Abnormal expression of HSP gp96 associated with HBV replication in human hepatocellular carcinoma. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2006, 5: 381-386.
 - 27 Zheng Y, Chen WL, Louie SG, et al. Hepatitis B virus promotes hepatocarcinogenesis in transgenic mice. Hepatology, 2007, 45: 16-21.

(收稿日期: 2008-01-03)

(本文编辑: 温少芳)

徐浩, 兰孟东, 赵龙凤. HBV 导致肝细胞癌机制研究进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(3): 214-219.