DOI:10.16016/j.2097-0927.202306066

肝癌细胞株-乙型肝炎病毒 DNA 整合事件的高通量靶向捕获测序分析

羊泽锐,邓海君,胡 源 400016 重庆,重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室

［摘要］ **目的** 采用探针捕获和高通量测序技术研究 HepG2.2.15 与 HepAD38 2 个乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)肝癌细胞系中病毒 DNA 在宿主基因组中的整合位点特征。**方法** 提取 HepG2.2.15 与 HepAD38 细胞基因组 DNA,采用探针捕获和高通量测序策略对 2 个肝癌细胞株中整合的 HBV DNA 进行捕获测序,使用 Trimmomatic、BBAP、BWA(Burrows-Wheeler Aligner)等生物信息学软件进行数据分析;最后通过聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)及克隆测序对病毒 DNA 整合特征进行验证。**结果** 利用探针捕获和高通量测序技术分别在 HepG2.2.15 与 HepAD38 细胞系中检测出 12、7 个 HBV DNA 整合事件,随机分布在 chr1、chr2、chr7、chr9、chr16、chr17、chr19、chrX 染色体上,整合位点上下游基因出现频率较高的有 *DPP*7、*TRIM*56、*GPC*3 等。**结论** 成功建立基于探针捕获和高通量测序技术检测 HBV DNA 在宿主基因组上的整合片段的方法,HepG2.2.15 与 HepAD38 细胞系中 HBV 整合事件在染色体上随机发生,大部分整合位点发生在 HBV 基因组上的 X 基因区域。

［关键词］ 乙型肝炎病毒;HBV 整合;探针捕获;高通量测序;克隆测序

［中图法分类号］ R373.21; R394.3; R735.7 ［文献标志码］ A

Analysis of HBV DNA integration events in hepatocellular carcinoma cell lines by high throughput targeted capture sequencing

YANG Zerui, DENG Haijun, HU Yuan Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

［**Abstract**］ **Objective** To investigate the integration characteristics of hepatitis B virus (HBV) viral DNA in the host genome of hepatocellular carcinoma HepG2.2.15 cells and HepG2-derived cell line HepAD38 by probe-based capture and high-throughput sequencing technology. **Methods** After the genomic DNA of HepG2.2.15 and HepAD38 cells were extracted, probe-based capture technique was used to capture the integrated DNA fragments of HBV DNA in the obtained genomic sequences, and the intergrated fragments were further studied with high-throughput sequencing technology. The bioinformatics software such as Trimmatic, BBAP, and BWA (Burrows-Wheeler Aligner) were empolyed for data analysis. Finally, the characteristics of integrated DNA were validated through PCR and cloning and sequencing. **Results** The probe-based capture and high-throughput sequencing technology detected 12 and 7 integrated DNA fragments in HepG2.2.15 and HepAD38 cells, respectively. These integration events were randomly distributed on chromosomes chr1, chr2, chr7, chr9, chr16, chr17, chr19, and chrX. *DPP*7, *TRIM*56 and *GPC*3 appeared with higher frequencies at the upstream and downstream of the integration sites. **Conclusion** We successfully establish a method to detect and analyze the integrated DNA fragments of HBV DNA in host genome based on probe-based capture and high-throughput sequencing technology. HBV integration events occur randomly on

［基金项目］ 科技部重点研发计划(2018YFE0107500);重庆市教委科学技术研究项目(KJQN202100422);重庆市渝中区自然基金(20210116)

［通信作者］ 胡 源,E-mail: huyuan@cqmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

the chromosomes in HepG2.2.15 and HepAD38 cells, and most of integration sites are in the X gene region of the HBV genome.

[**Key words**] hepatitis B virus; HBV integration; probe-based capture; high-throughput sequencing; cloning and sequencing

Supported by the Key Research and Development Program of Ministry of Science and Technology (2018YFE0107500), the Project of Science and Technology Research Program of Chongqing Education Commission (KJQN202100422) and the Project of Science and Technology Plan of Yuzhong District, Chongqing (20210116). Corresponding author: HU Yuan, E-mail: huyuan@cqmu.edu.cn

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染引起的慢性肝炎、肝硬化和肝癌是一个严重的公共卫生问题。目前我国慢性乙型肝炎患者大约有2 000万[1]。大量研究表明HBV感染中病毒基因组DNA整合到宿主基因组,通过多种机制发挥致癌作用[2-4]。病毒DNA与宿主基因组DNA进行基因整合,发生DNA序列缺失、重排、转位或扩增,改变宿主基因的功能或染色体的不稳定,促进细胞的癌变[5]。但是HBV DNA整合到宿主基因组的特征尚不清楚。

目前检测HBV DNA整合到宿主基因组的方法主要包括Alu-PCR[6-7]、反向巢式PCR(inv-PCR)[8]、高通量测序技术[9-10]等。既往对整合肝癌细胞系中HBV DNA整合的研究主要采用传统的PCR技术,其灵敏度和特异性不能全面分析肝癌整合细胞系中HBV DNA的整合特征[11-12]。最近,基于病毒特异性靶序列捕获的二代测序技术已被用于检测低病毒载量[13]。因此,本研究采用HBV探针富集带有HBV序列的基因组片段,联合高通量测序后,建立一种新的生信分析方法策略,实现对人类肝癌整合细胞系HepG2.2.15与HepAD38进行HBV-宿主整合位点的分析,研究结果有助于深入研究HBV DNA整合与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)的关系,同时为该方法应用到临床HCC的诊断分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂耗材

人肝癌细胞株HepG2.2.15由重庆医科大学林永教授转赠,HepAD38细胞由四川大学华西医学院唐红教授转赠,并由重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室长期保存;DMEM培养基及胰酶均购自Gibco公司;胎牛血清购自上海双泓生物科技有限公司;DNA提取试剂盒(QIAamp DNA mini kat)购自德国QIAGEN公司;pMD™ 19-T Vector和PCR扩增酶rTaq均购自TaKaRa公司;PCR产物纯化试剂盒购自美基生物公司;琼脂糖粉末购自北京擎科生物科技有限公司;引物合成与一代测序由上海生工生物工程股份有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与胞内基因组DNA提取

HepG2.2.15与HepAD38细胞用含有1%青-链霉素、10%胎牛血清的DMEM培养基,在37 ℃、含二氧化碳浓度为5%的培养箱中培养,细胞基因组DNA提取采用QIAamp DNA mini kat试剂盒(详细操作见说明书),DNA浓度使用Nanodrop-500测定。

1.2.2 HBV DNA整合检测

1.2.2.1 Alu-PCR技术检测HBV DNA整合 Alu-PCR扩增方法参考文献[14],并做一定优化,共进行3轮扩增(引物设计见表1[6]):①第1轮扩增引物为Alu sense A5(或Alu antisense A3)、HBV引物HB1x(或HB1s、HB1c),采用单管扩增形式,每个样本做6套扩增。50 μL体系含25 μL r*Taq*、1 μL Alu引物、1 μL HBV引物、DNA 100 ng,加入ddH_2O补足到50 μL,Alu引物与HBV引物浓度比为1∶10。扩增条件为94 ℃预变性2 min,每个循环包括94 ℃ 30 s、59 ℃ 30 s、70 ℃ 3 min,共10次循环,70 ℃补平延伸10 min。②使用尿嘧啶DNA糖苷酶(Uracil DNA Glycosylase,UNG)对第1轮扩增产物进行消化,每个扩增管加入1 μL UNG酶,37 ℃金属浴30 min,95 ℃ 10 min灭活酶活性。③第2轮扩增引物为Alu sense Tag5(或Alu antisense Tag3)、HBV引物HB2x(或HB2s、HB2c),Alu引物与HBV引物浓度比例为1∶1,各1 μL直接加入到UNG酶消化后的第1轮产物中,进行第2轮扩增,扩增条件为94 ℃预变性2 min,每个循环包括94 ℃ 30 s、65 ℃ 30 s、70 ℃ 3 min,共20次循环,采用降落PCR,每次循环退火温度降低0.5 ℃,直到55 ℃,在此退火温度上继续扩增20个循环,70 ℃补平延伸10 min。④第3轮扩增引物为Alu sense Tag5(或Alu antisense Tag3)、HBV引物HB3x(或HB3s、HB3c)。25 μL体系含r*Taq* 12.5 μL、引物各1 μL、第2轮产物1 μL、ddH_2O 9.5 μL,扩增条件同第2轮扩增。第3轮PCR产物经过1%琼脂糖凝胶电泳确认目的条带产物并进行胶回收纯化。

1.2.2.2 TA克隆、一代测序及结果比对 纯化的

胶回收产物克隆到 pMD™ 19-T 载体,每个样本挑选单克隆测序。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 检索以及加州大学圣克鲁兹分校数据库(University of California, Santa Cruz Database,UCSC)进行比对。

1.2.3 探针捕获和高通量测序技术检测 HBV DNA 整合位点 提取的细胞基因组 DNA 使用 Qubit 核酸定量仪对 DNA 浓度进行精准定量质检,由北京艾吉泰康生物科技公司根据 Illumina 标准说明构建测序文库。采用针对 HBV 不同基因型(A-H)保守序列设计特异性捕获探针[15-16](由北京艾吉泰康生物科技公司设计合成),通过液相捕获高效、特异富集,富集后在 NovaSeq 6000 二代测序平台上进行 PE150 高通量、高深度测序。主要流程如图 1。

1.2.4 数据处理与分析 二代测序(next generation sequencing,NGS)原始数据首先采用 Trimmomatic 软件(v0.39)过滤低质量片段,按以下条件处理后得到高质量序列:①切除序列头尾碱基质量值小于 15 的碱基;②从序列 5'至 3'方向,以 5 bp 为窗口滑动,当窗口平均质量值小于 15 时,切除该窗口至序列 3'末尾的序列;③去掉序列平均质量值低于 15 的序列;④去掉 trim 之后序列长度小于 30 bp 的序列。高质量序列采用 BBAP(http://homepage.ntu.edu.tw/~youylin/)进行拼接,得到高质量 unique reads,然后利用 Burrows-Wheeler Aligner(BWA, v0.7.17)软件将其与 Human 人类(NCBI build 37,HG19)和 HBV 参考基因组(HE815465.1)进行比对。同时具有人类基因组序列和 HBV 基因组序列的 unique reads 即为包含 HBV 整合事件断点的序列,对这些断点进行分析,计算每种整合事件支持的 unique reads 数,并将其进行标准化,得到 normalized number of support unique sequences (nnsus),进一步根据 hg19 基因组基因注释 gtf 信息,对整合事件进行注释。判断 HBV 整合事件的发生条件为 nnsus≥1 且支持该整合事件的 unique reads 数要大于等于 3 条。

表 1 Alu-PCR 扩增引物序列

引物名称	序列(5′→3′)	注释
UP5	CAGUGCCAAGUGUUUGCUGACGCCAAAGUGCUGGGAUUA	Alu sense A5
T3-515	AUUAACCCUCACUAAAGCCUCGAUAGAUYRYRCCAYUGCAC	Alu antisense A3
UP6	CAAGTGTTTGCTGACGCCAAAG	Alu sense Tag5
midT3	TTAACCCTCACTAAAGCCTCG	Alu antisens Tag3
pUTP	ACAUGAACCUUUACCCCGUUGC	HB1(HBx)
MM37	TGCCAAGTGTTTGCTGACGC	HB2(HBx)
MM60	CTGCCGATCCATACTGCGGAAC	HB3(HBx)
uPre 31	GAGUUCUUCUUCUAGGGGACCUG	HB1(HBc)
MM31	AGTGCGAATCCACACTC	HB2(HBc)
MM25	GGAAGGAAAGAAGTCAGAAGG	HB3(HBc)
uPreS2	ACACGGCGGUAUUUUGGGGTGGAG	HB1(HBs)
MM2R	CAGGCTCAGGGCATATTGACAA	HB2(HBs)
MD71	YCCTGCTGGTGGCTCCAGTTC	HB3(HBs)

Y=(C,T); R=(C,G); U:脱氧核苷三磷酸;带下划线的序列为 Tag 标签序列

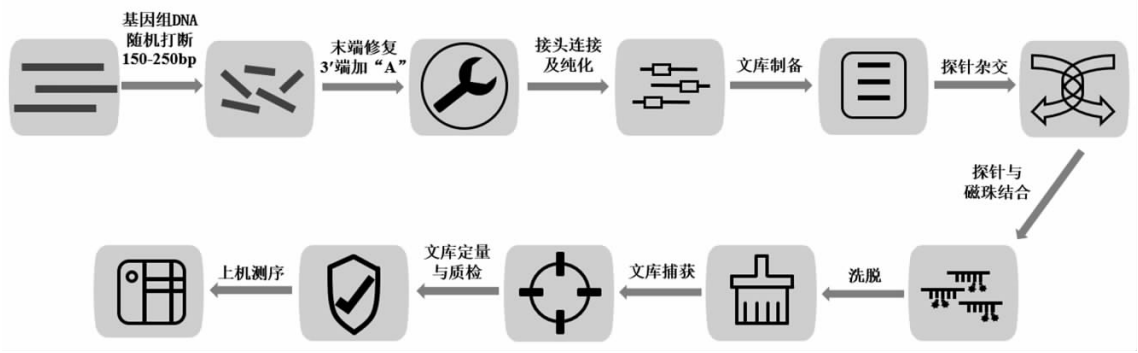


图 1 高通量捕获测序检测 HBV DNA 整合大致流程

1.2.5 Sanger 测序验证整合事件的发生 测序样本来自捕获测序后构建的文库样本,根据结果分析得到的病毒-宿主嵌合区段设计相应的 PCR 扩增引物,该引物能够扩增病毒整合到宿主基因组上的嵌合区段,PCR 扩增产物进行 Sanger 测序,对 HBV 捕获测序结果进行验证。

2 结果

2.1 Alu-PCR 技术检测 HepG2.2.15 与 HepAD38 细胞中 HBV DNA 整合

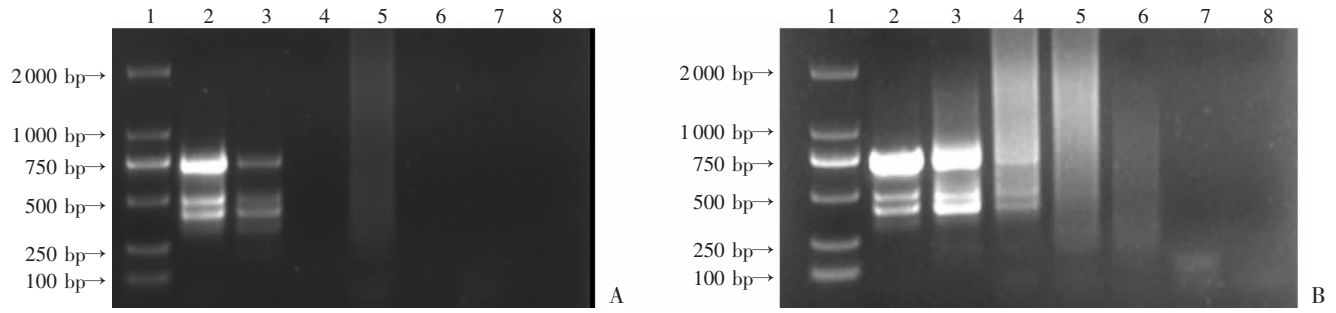
为了探索 HepG2.2.15 与 HepAD38 细胞中 HBV 整合到基因组的特征,首先采用 Alu-PCR 技术对 2 个细胞系的基因组进行扩增检测,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后显示存在多个扩增产物(图 2)。进一步通过胶回收纯化并克隆到 pMD^{TM}19-T 载体上测序,结果显示大部分目的条带为含 Tag 标签的非特异性序列,表明 Alu-PCR 难以高效地扩增出人类基因组与 HBV 基因组嵌合的整合序列。

2.2 高通量捕获测序技术检测 HBV DNA 整合特征

进一步利用高通量捕获测序技术,即通过针对 HBV 不同基因型的序列设计覆盖 HBV 全基因组的特异性探针,提取 2 个 HBV 整合的肝癌细胞系基因组 DNA,利用探针杂交技术,捕获与富集目的序列,最后对 Illumina 平台测序结果进行生信分析,鉴定 HBV-人类基因组的整合位点并进行特征分析。

测序结果显示,对照组 HepG2 细胞测得 17.08 MB 数据,HepG2.2.15 和 HepAD38 细胞分别测得 10.44 MB 和 6.63 MB 的高质量序列,目标区域平均测序深度约为 55 倍,目标区域平均序列长度为 145 bp,测序数据结果达到了本分析方法对 HBV 整合位点分析的最低测序深度要求(表 2)。通过捕获测序,在 HepG2.2.15 与 HepAD38 细胞基因组 DNA 中分别检测到 12 个和 7 个 HBV 整合位点。作为对照,HepG2 细胞中未检测出 HBV 整合事件。HepG2.2.15 细胞中的 12 个整合事件分别位于 7 条染色体上,包括 chr1、chr2、chr7、chr9、chr17、chr19、chrX。HepAD38 细胞中的 7 个整合事件分别位于 4 条染色体上,包括 chr1、chr2、chr16、chrX。分析 8 条染色体上分布的所有整合事件所在的或其上下游基因位点(表 3),HepG2.2.15 细胞中整合频率较高的基因有 *DPP7*、*TRIM56*、*FAM9B* 等,HepAD38 细胞中整合频率较高基因有 *FNDC4*、*MIGA1*、*GPC3*。

研究结果显示,HBV 整合到宿主基因组有正向插入和反向插入整合两种模式(图 3)。对 19 个整合事件中 HBV 整合断点在 HBV 基因组上的分布显示,大部分断点在 HBV 基因组 nt1 000~nt2 000。部分断点分布在 HBV 基因组其他区域。在 HepG2.2.15 和 HepAD38 2 个整合细胞系中,整合事件在 HBV 基因组



A:Alu-PCR 扩增 HepG2.2.15 细胞 HBV 整合 1: Marker 2 000; 2: HepG2.2.15 5x; 3: HepG2.2.15 5c; 4: HepG2.2.15 5s; 5: HepG2.2.15 3x; 6: HepG2.2.15 3c; 7: HepG2.2.15 3s; 8: 阴性对照;B:Alu-PCR 扩增 HepAD38 细胞 HBV 整合 1: Marker 2 000; 2: HepAD38.5x; 3: HepAD38.5c; 4: HepAD38.5s; 5: HepAD38.3x; 6: HepAD38.3c; 7: HepAD38.3s; 8: 阴性对照

图 2 Alu-PCR 技术扩增 2 个整合细胞系胞内基因组 DNA 中 HBV DNA 整合

表 2 HepG2.2.15 与 HepAD38 细胞高通量捕获测序原始数据特征分析

样本	原始测序数据/MB	过滤后数据/MB	目标序列平均读取长度/bp	目标比对序列/MB	目标序列捕获效率/%	覆盖率/%	平均深度	目标序列10×覆盖率/%
HepG2	17.08	16.73	140	0.06	100	3.44	0.16	0.29
HepG2.2.15	10.66	10.44	145	9.43	100	18.89	55.61	8.90
HepAD38	6.68	6.63	145	9.01	100	16.72	54.95	7.35

上的分布又有所不同。在 HepG2.2.15 细胞中的分布大部分在 P 基因区域,而在 HepAD38 细胞中则大部分在 X 基因区域,这可能和 2 个细胞系本身的特点有关。此外,研究结果表明,2 个整合细胞株中的 HBV DNA 整合事件是随机发生的,未发现其对某条染色体或者某个基因有整合偏向性。

2.3 HepG2.2.15 与 HepAD38 细胞系 HBV DNA 整合事件验证

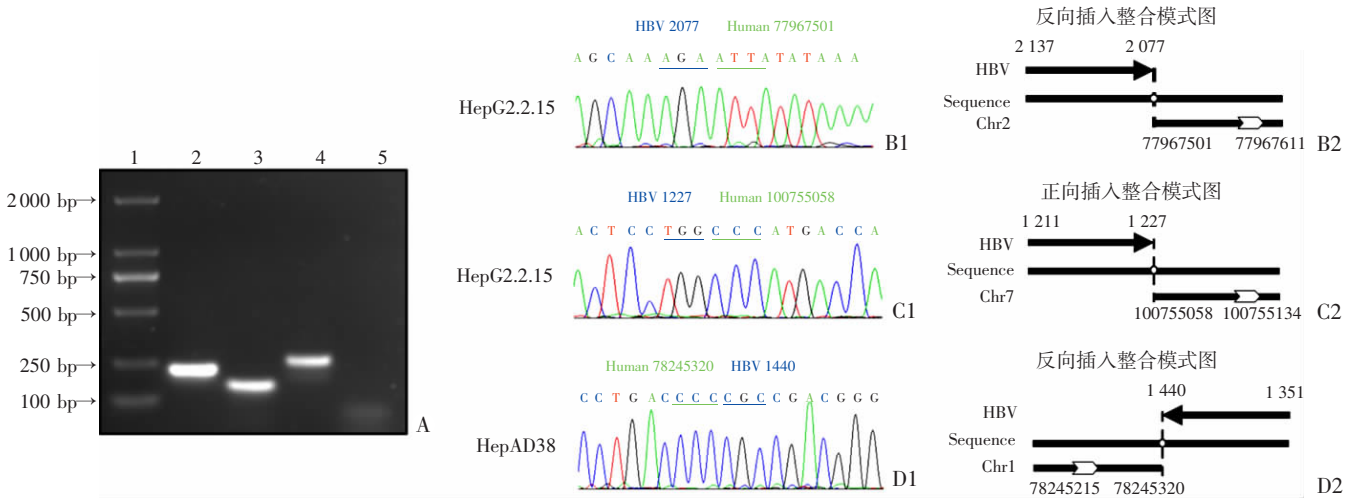
为验证高通量捕获测序技术检测 HBV 整合事件的准确性,从 2 个细胞系中检测出的 19 个整合断点中,随机选取了 3 个整合断点(HepG2.2.15 细胞系中的 2 号和 7 号染色体上的整合事件以及 HepAD38 细胞系中的 1 号染色体上的整合事件),通过设计引物(表 4)对其进行反向验证,PCR 扩增后得到目的条带(图 3A),目的条带测序后比对,结果与捕获测序技术检测的 HBV 整合特征相符(图 3,表 3),表明高通量捕获测序技术对 HBV DNA 整合事件检测的准确度较高。

3 讨论

HBV DNA 整合可以发生在 HBV 感染的早期阶段[17],并可以持续存在于慢性感染的不同阶段。病毒 DNA 整合可能有两种生物学意义:①HBV 在复制过程中形成的双链线性 DNA(Double-stranded linear DNA,dslDNA)通过非同源重组的方式整合到宿主基因组中。由于 HBsAg 启动子区域位于 HBV 基因组中部,病毒 DNA 整合产生的 S 基因转录产物可能编码截断的 HBsAg。已有研究报道,即使在肝脏内共价闭合环状 DNA(Covalently closed circular DNA,cccDNA)转录沉默的情况下,HBV DNA 整合也能产生 HBsAg[18]。因此,在长期核苷酸类似物药物治疗的部分慢性乙型肝炎患者中,尽管 cccDNA 的转录活性降低或沉默,但是由于来自整合 DNA 编码的 HBsAg 持续性表达,血清中的 HBsAg 水平难以显著下降,这部分患者应该停用核苷酸类似物药物,而采用其他的抗病毒策略,因此,对慢性乙型肝炎患者整合 DNA 的检测有助于抗病毒疗效的优化。②病毒基因组的整合可能导致人类基因组功能的破坏,HBV 整合导致细胞重要的基因表达异常,可能对肝细胞具有选择性生长优势并导致肝癌的发生。因此,研究 HBV DNA 整合到宿主基因组的特征有助于深入阐明 HBV DNA 整合与 HCC 发生、发展的关系。

表 3 HepG2.2.15 与 HepAD38 细胞高通量捕获测序整合事件特征

样本	断点所在染色体	人类染色体断点	HBV 断点	HBV 基因区域	支持序列数	整合模式	宿主基因注释
HepG2.2.15	Chr1	247911749	3 153	S	826	Cis	*AL*390860.1
	Chr2	77967501	2 137	C	498	Rev	*AC*012494.1
	Chr2	77923838	1 027	P	474	Rev	*AC*012494.1
	Chr2	27775261	2 777	P	174	Cis	*C2orf*16
	Chr2	27915041	2 568	P	56	Cis	*SLC4A1AP*
	Chr7	100755058	1 227	P	532	Cis	*TRIM*56(*Upstream*)
	Chr7	51464631	1 116	P	145	Rev	*AC*012441.1(*Upstream*)
	Chr9	140008778	1 638	X	1 006	Rev	*DPP*7
	Chr9	140011480	1 860	C	698	Cis	*DPP*7
	Chr17	76317491	1 346	X	14	Rev	*SFXN*1
	Chr19	10762420	1 227	P	16	Rev	*ILF*3-*DT*(*Downstream*)
	ChrX	9148657	2 178	C	522	Rev	*FAM9B*
HepAD38	Chr1	78245320	1 440	X	45	Rev	*MIGA*1
	Chr1	91834551	1 513	X	3	Rev	*HFM*1
	Chr2	27718953	1 495	X	74	Rev	*FNDC*4(*Upstream*)
	Chr2	229723772	1 180	P	3	Rev	*PID*1
	Chr2	102365519	1 578	X	3	Rev	*AC*079160.1(*Upstream*)
	Chr16	70423863	1 462	X	3	Cis	*TMEM*233
	ChrX	132992184	687	S	22	Rev	*GPC*3



A:PCR 扩增产物凝胶电泳图 1: Marker 2 000;2: HepG2.2.15 chromosome 2; 3: HepG2.2.15 chromosome 7; 4: HepAD38 chromosome 1; 5: 阴性对照;B1、B2:HepG2.2.15 细胞 2 号染色体上整合事件序列验证与整合事件模式图;C1、C2:HepG2.2.15 细胞 7 号染色体上整合事件序列验证与整合事件模式图;D1、D2:HepAD38 细胞 1 号染色体上整合事件序列验证与整合事件模式图

图 3 高通量捕获测序 HBV 整合事件反向验证

表 4 HepG2.2.15 与 HepAD38 细胞整合事件验证引物

样本	染色体位置	上游引物 FP(5′→3′)	下游引物 RP(5′→3′)	整合模式
HepG2.2.15	Chr2:100755058	TACCTGAACCTTTACCCCGT	TGTAGAAATGGGGTCTTGCT	HBV-Human (Rev)
	Chr7:77967501	AAGTGTTGGGATTACAGGCG	AAACCACAAGAGTTGCCTGA	HBV-Human (Cis)
HepAD38	Chr1:78245321	AAGTGTTGGGATTACAGGCG	AAGTGTTGGGATTACAGGCG	Human-HBV (Rev)

HepG2.2.15 和 HepAD38 是人肝癌细胞 HepG2 的 HBV 稳定细胞株[19-20],这 2 个细胞系已大量用于研究 HBV 的复制调控和 HCC 的调控机制。赵杨静等[11]曾采用 Alu-PCR 检测了 HepAD38 和 HepG2.2.15 中 HBV DNA 整合特征,在 HepG2.2.15 检测到来自 HBx 和 HBc 部分基因组的 5 个整合片段,而 HepAD38 细胞检测到 HBx 的 2 个整合片段,未检测出 HBs 的整合。本研究也曾用 Alu-PCR 方法进行了探索,发现 Alu-PCR 对 HBV DNA 整合到人类染色体上序列的扩增效率低,非特异性高,并且难以对 HBV DNA 整合事件进行定量分析。同时,由于人类基因组上的 Alu 位点具有偏向性,很难真实地反映样本中 HBV DNA 的整合。正是由于 Alu-PCR 检测方法的不足,本研究则利用探针捕获联合高通量测序技术和本课题组构建的生信分析流程,对 HepG2.2.15 和 HepAD38 2 个肝癌细胞系的 HBV DNA 整合特征进行深入研究。研究结果发现:①在 2 个细胞系上检测到的 HBV 整合事件高于既往 Alu-PCR 检测的结果,相对于 Alu-PCR,本研究检测到 HBs 的整合,表明高通量捕获测序技术在检测病毒 DNA 的整合具有更高的灵敏度;② 在 HepAD38 细胞中,HBx 基因片段插入到宿主染色体上的序列最多,提示 HBx 在调控 HCC 的发生中具有重要的调控作用;③本研究在 HepG2.2.15 和 HepAD38 分别检测到 12 个和 7 个整合事件,分布在 8 个染色体上,这些整合位点在染色体上随机分布,没有偏向性整合。既往文献报道的整合基因位点与本研究发现的整合基因位点有所不同,可能是方法的不同导致。本研究分别在 HepG2.2.15 和 HepAD38 细胞中发现了以下整合频率较高的基因,HepG2.2.15 细胞中:*DPP7*、*TRIM56*、*FAM9B*;HepAD38 细胞中:*FNDC4*、*MIGA1*、*GPC3*。其中 *DPP7* 能够调控 HepG2.2.15 细胞的衰老和凋亡[21],*TRIM56* 能够通过抑制 HBV 核心蛋白启动子来影响 HBV 病毒的复制[22],*GPC3* 与 HCC 预后相关可作为 HCC 诊断和预后的生物标志物[23]。此外,分析结果显示 HBV 基因整合插入到宿主基因组上有正向插入整合和反向插入整合两种模式,两种不同的整合模式随机发生,这种不同模式的整合插入,可能会影响嵌合转录本的表达,表明病毒通过整合到宿主基

因组上,调控这些基因表达异常,促进病毒复制或癌症的发生、发展。

本研究的不足之处在于 HepG2.2.15 和 HepAD38 是人肝癌细胞 HepG2 的 HBV 稳定细胞株,检测到的 HBV DNA 整合事件可能与肝癌自然病程中 HBV 的作用存在差异,本研究将进一步利用建立的探针捕获和高通量测序技术来分析临床 HBV 感染的肝癌样本中病毒 DNA 的整合事件特征,以期找到潜在导致肝癌发生的靶点整合基因。

综上所述,本研究建立了一种探针捕获和高通量测序技术检测 HBV 肝癌细胞系中病毒 DNA 整合事件的方法,该方法能高效富集带有 HBV 基因组序列的片段,通过深度测序和构建的生信分析策略能反映样本整体背景下的病毒-宿主嵌合 DNA 片段特征。该技术有助于对临床慢性乙型肝炎患者 HBV DNA 整合特征的研究和阐明病毒 DNA 整合促进 HCC 发生、发展的机制研究,具有重要的应用价值。

参考文献:

[1] COLLABORATORS P O. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2018, 3(6): 383-403. DOI: 10.1016/S2468-1253(18)30056-6.

[2] HUANG H C, REN Z G, GAO X X, *et al*. Integrated analysis of microbiome and host transcriptome reveals correlations between gut microbiota and clinical outcomes in HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. Genome Med, 2020, 12(1): 102. DOI: 10.1186/s13073-020-00796-5.

[3] POLLICINO T, CAMINITI G. HBV-integration studies in the clinic: role in the natural history of infection[J]. Viruses, 2021, 13(3): 368. DOI: 10.3390/v13030368.

[4] MASON W S, JILBERT A R, LITWIN S. Hepatitis B virus DNA integration and clonal expansion of hepatocytes in the chronically infected liver[J]. Viruses, 2021, 13(2): 210. DOI: 10.3390/v13020210.

[5] RAMIREZ R, VAN BUUREN N, GAMELIN L, *et al*. Targeted long-read sequencing reveals comprehensive architecture, burden, and transcriptional signatures from hepatitis B virus-associated integrations and translocations in hepatocellular carcinoma cell lines[J]. J Virol, 2021, 95(19): e0029921. DOI: 10.1128/jvi.00299-21.

[6] 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. DOI: 10.1136/gut.2004.054452.

[7] SAITTA C, TRIPODI G, BARBERA A, *et al*. Hepatitis B virus (HBV) DNA integration in patients with occult HBV infection and hepatocellular carcinoma[J]. Liver Int, 2015, 35(10): 2311-2317. DOI: 10.1111/liv.12807.

[8] MASON W S, GILL U S, LITWIN S, *et al*. HBV DNA integration and clonal hepatocyte expansion in chronic hepatitis B patients considered immune tolerant[J]. Gastroenterology, 2016, 151(5): 986-998.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.07.012.

[9] FUJIMOTO A, FURUTA M, TOTOKI Y, *et al*. Whole-genome mutational landscape and characterization of noncoding and structural mutations in liver cancer[J]. Nat Genet, 2016, 48(5): 500-509. DOI: 10.1038/ng.3547.

[10] WANG A Q, WU L C, LIN J Z, *et al*. Whole-exome sequencing reveals the origin and evolution of hepato-cholangiocarcinoma[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 894. DOI: 10.1038/s41467-018-03276-y.

[11] 赵杨静, 李国力, 张恒辉, 等. 应用 HBV-Alu-PCR 研究肝癌细胞株中乙型肝炎病毒整合[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2015, 9(5):134-138. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.05.027.
ZHAO Y J, LI G L, ZHANG H H, *et al*. Identification of hepatitis B virus integration in human hepatocellular carcinoma cell lines by HBV-Alu-PCR[J]. Chin J Exp Clin Infect Dis Electron Ed, 2015, 9(5): 134-138. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.05.027.

[12] 阮鹏, 何春萍, 黄超, 等. 改良 Alu-PCR 技术检测 HepG2.2.15 细胞 HBV 整合的研究[J]. 肝脏, 2022, 27(7): 785-788. DOI:10.14000/j.cnki.issn.1008-1704.2022.07.012.
RUAN P, HE C P, HUANG C, *et al*. Detection of hepatitis B viral DNA integration in HepG2.2.15 cells by a modified Alu-PCR method[J]. Chin Hepatol, 2022, 27(7): 785-788. DOI:10.14000/j.cnki.issn.1008-1704.2022.07.012.

[13] NO J S, KIM W K, CHO S, *et al*. Comparison of targeted next-generation sequencing for whole-genome sequencing of Hantaan orthohantavirus in *Apodemus agrarius* lung tissues[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1-9. DOI: 10.1038/s41598-019-53043-2.

[14] MINAMI M, POUSSIN K, BRÉCHOT 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. DOI: 10.1006/geno.1995.9004.

[15] ZHENG B, LIU X L, FAN R, *et al*. The landscape of cell-free HBV integrations and mutations in cirrhosis and hepatocellular carcinoma patients[J]. Clin Cancer Res, 2021, 27(13): 3772-3783. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-21-0002.

[16] JANG J W, KIM J S, KIM H S, *et al*. Persistence of intrahepatic hepatitis B virus DNA integration in patients developing hepatocellular carcinoma after hepatitis B surface antigen seroclearance[J]. Clin Mol Hepatol, 2021, 27(1): 207-218. DOI: 10.3350/cmh.2020.0115.

[17] TU T, BUDZINSKA M, VONDRAN F, *et al*. Hepatitis B virus DNA integration occurs early in the viral life cycle in an *in vitro* infection model via sodium taurocholate cotransporting polypeptide-dependent uptake of enveloped virus particles[J]. J Virol, 2018, 92(11): e02007-17. DOI: 10.1128/JVI.02007-17.

[18] MEIER M A, CALABRESE D, SUSLOV A, *et al*. Ubiquitous expression of HBsAg from integrated HBV DNA in patients with low viral load[J]. J Hepatol, 2021, 75(4): 840-847. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.04.051.

[19] SELLS M A, CHEN M L, 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. DOI: 10.1073/pnas.84.4.1005.

[20] LADNER S K, OTTO M J, BARKER C S, *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. DOI: 10.1128/AAC.41.8.1715.

[21] HU X G, JIANG J H, NI C, *et al*. HBV integration-mediated cell apoptosis in HepG2.2.15[J]. J Cancer, 2019, 10(17): 4142-4150. DOI: 10.7150/jca.30493.

[22] TIAN X, DONG H J, LAI X Y, *et al*. TRIM56 impairs HBV infection and replication by inhibiting HBV core promoter activity[J]. Antivir Res, 2022, 207: 105406. DOI: 10.1016/j.antiviral.2022.105406.

[23] JIANG D L, ZHANG Y S, WANG Y N, *et al*. Diagnostic accuracy and prognostic significance of Glypican-3 in hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis[J]. Front Oncol, 2022, 12: 1012418. DOI: 10.3389/fonc.2022.1012418.

(**收稿**:2023-06-19;**修回**:2023-07-06)

(编辑 刘秋池)