消化系统疾病 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000941

乙型肝炎病毒感染相关性肝癌中 HBV cccDNA 水平与突变关系的研究

罗 璇,黄 瑶,陈彦猛,黄爱龙,胡 源
(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:研究乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染相关性肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)中 HBV 共价闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA,cccDNA)水平与突变关系。**方法**:运用特异性荧光定量 PCR 定量分析了 12 例肝癌组织和癌旁组织中乙肝病毒复制水平的表征因子 HBV cccDNA,HBV total DNA 及前基因组 RNA(pregenome RNA,pgRNA)的表达水平,再用滚环扩增(rolling circle amplification,RCA)特异性扩增癌组织中 HBV cccDNA,测序分析了病毒基因组 4 个编码调控区域 preC/C、RT、X、preS 中 cccDNA 序列的突变。最后检测了肿瘤组织 cccDNA 的 AP 位点。**结果**:HBV cccDNA 在癌组织的表达水平明显低于癌旁组织(3.32 copies/cell vs. 9.64 copies/cell,P=0.029),但是 HBV 总 DNA 和 pgRNA 的表达没有明显差异(16.94 copies/cell vs. 12.18 copies/cell,P=0.325,75.54 copies/cell vs. 22.46 copies/cell,P=0.128);在肝癌组织中,HBV cccDNA preC/C 和 X 区间,G-A 突变是主要的突变类型;其次,preC/C 和 X 区域发生 G-A 突变的位置上,均更倾向于 GA 二联核苷酸组合方式,在肝癌中所占比例为 37.1%和 40%。最后,肿瘤组织中 APE1 酶处理后,HBV cccDNA 水平明显下降(1 011 copies/μl vs. 501.8 copies/μl,P=0.058)。**结论**:HBV cccDNA 水平在癌组织中明显低于癌旁组织,可能与癌组织中 HBV cccDNA 发生大量 GA突变及形成的 AP 位点有关。

【关键词】乙型肝炎病毒;肝癌;HBV 共价闭合环状 DNA;序列突变
【中图分类号】R512.6+2;R331 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-02-29

Association between intrahepatic levels and mutation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma

Luo Xuan, Huang Yao, Chen Yanmeng, Huang Ailong, Hu Yuan
(*Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Disease, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To analyze the association between intrahepatic levels and mutation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA (HBV cccDNA) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. ***Methods***: The levels of intrahepatic HBV cccDNA, HBV total DNA and pgRNA were measured by real-time quantitative PCR. Intrahepatic cccDNA was amplified by rolling circle amplification (RCA), and the preC/C, RT, X, preS region of cccDNA were sequenced. Finally, the AP sites of intrahepatic cccDNA in cancerous tissues were measured. ***Results***: The mean intrahepatic HBV cccDNA level was significantly lower in the cancerous tissues than in the contiguous noncancerous tissues (3.32 copies/cell vs. 9.64 copies/cell, P=0.029), while there was no significant difference in the median levels of intrahepatic HBV total DNA and pgRNA between the cancerous tissues and the contiguous noncancerous tissues (HBV total DNA: 16.94 copies/cell vs. 12.18 copies/cell, P=0.325; pgRNA: 75.54 copies/cell vs. 22.46 copies/cell, P=0.128). G-A mutation was the main mutation pattern for preC/C and X gene regions. The dinucleotide context of the G-to-A mutation in preC/C and X gene regions showed preferred editing in the 5'GpA, accounting for 37.1% and 40% in cancerous. Finally, the levels of intrahepatic HBV cccDNA in cancerous tissues decreased with APE1 treatment (1 011 copies/μl vs. 501.8 copies/μl, P=0.058), indicating HBV cccDNA in the cancerous tissues contains AP site. ***Conclusion***: The intrahepatic HBV cccDNA level is lower in the cancerous tissues than in contiguous noncancerous tissues, which maybe associated with high mutations of G-A and AP site.

【Key words】hepatitis B virus; hepatocellular carcinoma; HBV covalently closed circular DNA (HBV cccDNA); mutation

作者介绍:罗 璇,Email:317724458@qq.com,
研究方向:临床检验诊断学。
通信作者:胡 源,Email:tottyhy@163.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81471945);重庆市科委自然科学基金资助项目(编号:cstc2014jcyjA10075)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1000.028.html (2016-05-13)

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)感染是肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)发病的主要危险因素,超过 60%的肝癌发生与慢性 HBV 感染密切相关[1]。HBV 共价闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA,cccDNA)不仅是 HBV DNA 复制转录的模板,也是 HBV 持续感染的关键因素。HBV cccDNA 在细胞核内转录成 pgRNA,pgRNA 转运到细胞质中和病毒编码的 C 蛋白和聚合酶包装形成核衣壳,在病毒颗粒中 pgRNA 反转录合成病毒的部分双链松弛环状的 DNA(relaxed circular DNA,rcDNA)。近年越来越多的研究表明,在慢性 HBV 感染引起的肝脏病理变化过程中,包括肝硬化、肝癌等阶段,HBV cccDNA 仍然持续存在[2]。现有的研究多集中在肝癌中 HBV cccDNA 表达水平的研究,而缺少肝癌中 HBV cccDNA 突变序列的研究,因此本研究主要通过对 HBV 感染引起 HCC 肝组织和癌旁组织中 cccDNA 水平及突变序列的研究,揭示两者之间关系。

1 材料与方法

1.1 研究对象

从重庆医科大学附属第一医院感染科获得 12 例 HBV 感染引起的 HCC 癌组织和癌旁的组织样本,按照临床样本库的标准进行各项检测指标采集,保存于-80 ℃冰箱备用,标本排除了 HCV 和 HIV 共感染。

1.2 材料和试剂

肝组织 DNA 的提取试剂盒及荧光定量 PCR 试剂采用 Promega 公司,PSAD 酶(Plasmid-safe ATP-depended DNAase)购自美国 Epicentre 公司,提取 RNA 的 Trizol reagent 来自 Life technologies 公司,逆转录试剂盒来自 Bio-RAD 公司,引物和探针由上海英俊公司合成,质粒抽提试剂盒和胶回收试剂盒采用德国 QIAGEN 公司,Phi29 酶和 APE1 酶采用 New Engand Biolab 公司。

1.3 肝组织中 HBV total DNA、cccDNA 和 pgRNA 的提取

取肝癌组织和配对的癌旁组织约 10 mg,按 Wizard Genomic DNA purification Kit 说明书取肝组织中的 DNA。提取的 DNA 用 PSAD 酶 37 ℃处理过夜,降解肝组织中线性和单链的 HBV DNA,以得到 HBV cccDNA。

取 20 mg 肝癌组织和配对的癌旁组织,在液氮环境中碾磨完全后加入 1 ml 的 Trizol,加入氯仿抽提,并异丙醇沉淀,溶于 RNase-free 水。RNA 逆转录条件按照 Bio-RAD 公司 iScript ReverseTranscriptase 试剂盒进行。

1.4 荧光定量 PCR 检测 HBV total DNA、cccDNA 和 pgRNA

利用 Tagman 探针法可特异性扩增 HBV cccDNA[3]。荧光定量 PCR 检测 HBV cccDNA、HBV total DNA 和 pgRNA。检测 cccDNA 和 HBV DNA 的方法和引物序列见[4],检测 pgRNA 的引物序列如下:正向引物:5'-CCTAGTAGTCAGTTATGTCAAC-3',反向引物:5'-TCTATAAGCTGGAGGAGTGCGA-3'。反应条件:95 ℃预变性 5 min,95 ℃ 10 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 15 s,40 个循环。

1.5 滚环扩增 HBV cccDNA

采用滚环扩增(rolling circle amplification,RCA)来特异性扩增肝组织中的 HBV cccDNA[5-6]。

1.6 AP 位点检测

cccDNA 发生氨基化后,被尿嘧啶-N-糖基化酶(uracil-DNA-glycosylase,UNG)识别,形成 AP 位点,然后被核酸内切酶作用而降解[7]。为了进一步分析肿瘤组织中 cccDNA 是否形成 AP 位点,本研究采用了 APE1 酶作用 cccDNA:1 μg cccDNA 用 APE1 酶 37 ℃作用 4 h,通过荧光定量检测处理前后cccDNA 的量。

1.7 统计分析

所得数据的统计分析和作图采用 GraphPad Prism 5,癌组织和癌旁组织中数据的统计分析采用配对 t 检验。通过滚环扩增得到的癌组织全长的 HBV cccDNA,采用分段测序得到 HBV 重要的 4 个区段序列,利用 CustalW 2.0 序列比对软件进行多序列的全局比对,编写 perl 代码程序完成比对后的碱基突变统计。

2 结 果

2.1 相关临床信息

纳入分析的 12 对配对的肝癌及癌旁组织样本的临床、病毒学和血清学指标参数如表 1 所示,其中男女样本和表面抗原(hepatitis B surface antigen,HBsAg)样本阳性、阴性的比例均为 11∶1,e 抗原(hepatitis B e antigen,HBeAg)、核心抗体(hepatitis B core antigen,HBcAg)阳性和阴性比例分别为5∶7 和 12∶0,样本年龄和病毒滴度水平平均分布在53.5 岁和 4.596 log copies/ml。

表 1 12 对配对病人样本临床信息列表

Tab.1 Clinical information list of paired patients

临床特征	统计
性别(男/女)	11/1
年龄	53.50 ± 10.09
HBsAg (+/-)	11/1
HBeAg(+/-)	5/7
HBcAb(+/-)	12/0
AFP[$M(Q_1,Q_3)$、ng/ml]	19.74(2.818,857.8)
HBV DNA(log10)	4.596 ± 0.890

AFP:甲胎蛋白;HBV DNA:血清中 HBV 滴度水平;HBsAg:乙肝表面抗原;HbeAg:乙肝 e 抗原;HBcAb:乙肝核心抗体

2.1 肝癌及癌旁组织中的 HBV cccDNA、HBV total DNA 和 pgRNA 的表达水平

12 例配对肝癌组织及癌旁组织中均能有效检测出 HBV cccDNA 和 HBV total DNA(图 1)。其中肿瘤组织 HBV cccDNA 的水平分布从 0.003 4~17.550 0 copies/cell，而在癌旁组织中 HBV cccDNA 的水平分布从 0.005 7~26.840 0 copies/cell；肿瘤组织中 HBV total DNA 水平分布从 0.619 2~62.890 0 copies/cell，而在癌旁组织中 HBV total DNA 的水平分布从 0.023 6~36.970 0 copies/cell；肿瘤组织中 HBV pgRNA 水平分布从 0.16~389.62 copies/cell，而在癌旁组织中 HBV pgRNA 水平分布从 0.65~80.06 copies/cell。

2.2 肝癌及癌旁组织中 HBV DNA、cccDNA 及 pgRNA 的表达差异

本文进一步分析了肝癌组织和配对的癌旁组织 2 组中 HBV cccDNA、HBV total DNA 和 HBV pgRNA 的表达差异，结果表明在肝癌组织中 HBV cccDNA 水平明显低于癌旁组织(3.32 copies/cell vs. 9.64 copies/cell，P=0.029，图 2A)，而 HBV total DNA 和 HBV pgRNA 在肝癌组织和癌旁组织中的水平却没有明显差异(16.94 copies/cell vs. 12.18 copies/cell，P=0.325，图 2B；75.54 copies/cell vs. 22.46 copies/cell，P=0.128，图2C)。

2.3 肝癌组织不同区域序列突变

通过 RCA 扩增后，获得了肝癌中 HBV cccDNA 4 个区段的核苷酸序列：preC/C、preS、X 和 RT 区域。在 12 例肝癌样本中，4 个区段扩增的样本数分别为 preC/C 区(6 例)，preS区(7 例)，X 区(6 例)和 RT 区(6 例)。首先从 NCBI 下载 HBV 全基因组序列 B 型 784 条，C 型 1 289 条，分别利用 ClustalW软件进行基因组全局比对，根据全基因组比对结果分别构建 B、C 型保守型序列，来作为参考序列。通过 Clustal W 2.0 比对软件分别对 preC/C、preS、X 和 RT 区域的序列进行分区域的全局比对，再对比对后的结果进行每种碱基突变的统计，如图 3 所示，每种碱基的突变形式以及突变个数在不同区域中分布不一样，其中 G-A 突变形式和个数在每个区域中均属于数目较多的，尤其是在 preC/C 和 X 两个区域中，该突变形式是此两区域中数量最多的，在肝癌组织中每 1 000 bp 的突变个数分别达到了 5.74 和 3.94。

2.4 二联核苷酸突变形式统计分析

由于 G-A 突变形式在 preC/C 和 X 2 个区域中分布最多，本文进一步对这 2 个区域中所有发生 G-A 突变位点的 4 种二联核苷酸组成形式(GA、GT、GG、GC)进行了统计，发

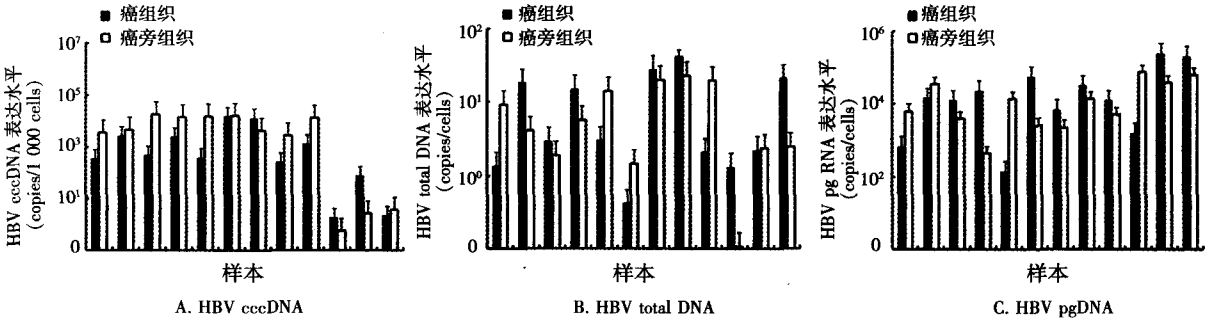


图 1 12 例肝癌和癌旁组织中 HBV cccDNA，HBV total DNA 和 HBV pgRNA 的表达水平

Fig.1 Intrahepatic HBV cccDNA, HBV total DNA and HBV pgRNA level in cancerous and contiguous noncancerous liver tissues in all 12 clinical samples

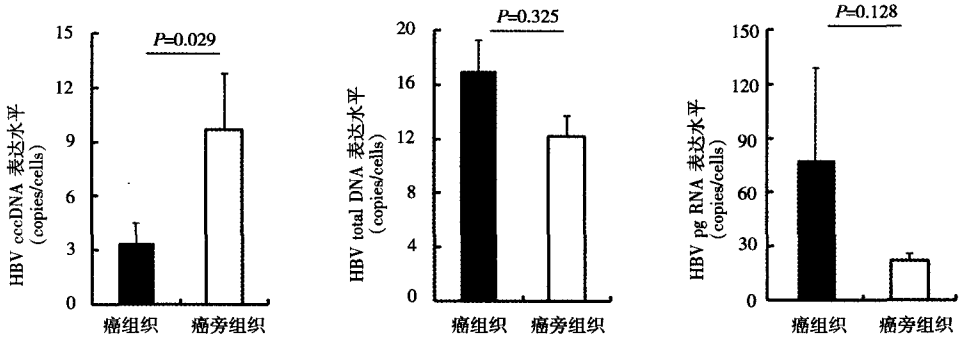


图 2 肝癌及癌旁组织中 HBV cccDNA，HBV total DNA 和 HBV pgRNA 表达差异分析

Fig.2 Analysis on expression difference of the intrahepatic HBV cccDNA, HBV total DNA and HBV pgRNA in cancerous and contiguous noncancerous liver tissues

Cancerous

preC/C 1814–2452 N=6

	A	T	G	C
A		9	11	8
T	7		3	9
G	22	7		3
C	17	7	2	

preC/C 2848–3215 1–154 N=6

	A	T	G	C
A		1	4	5
T	8		3	9
G	8	3		3
C	5	11	1	

X 1374–1838 N=6

	A	T	G	C
A		7	3	4
T	0		2	2
G	11	3		5
C	0	8	2	

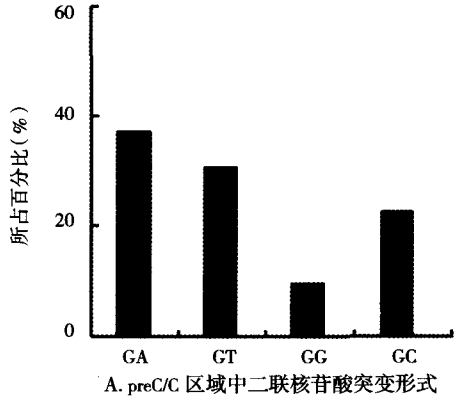
RT 371–1155 N=6

	A	T	G	C
A		8	11	12
T	6		2	7
G	8	1		2
C	3	6	4	

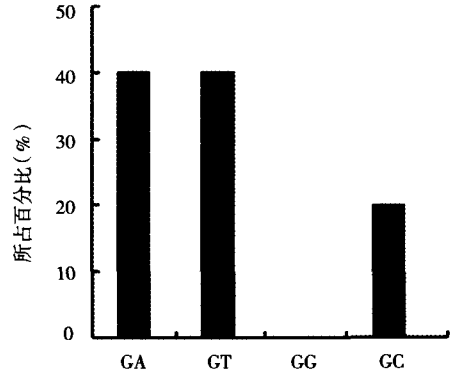
图 3　肝癌中 HBV 4 个区域碱基突变形式及个数

Fig.3　Mutations forms and frequencies in four different regions of HBV cccDNA in clinical HCC

现在这 2 个区域中：肝癌组织均以 GA 二联核苷酸组合方式所占的百分比最多，在 preC/C 区所占比例为 37.1%，在 X 区为 40%（图 4），表明在 preC/C 和 X 区中发生的 G–A 突变更倾向于发生在 GA 组合形式的 G 位置上。



A. preC/C 区域中二联核苷酸突变形式



B. X 区域中二联核苷酸形式

图 4　肝癌中 preC/C 和 X 区 G–A 突变位置的 4 种二联核苷酸形式

Fig.4　Dinucleotide contexts in the G–A mutation position of preC/C and X region

2.5　肿瘤组织中 AP 位点检测

本文进一步对肿瘤组织中的 cccDNA 经过 APE1 酶切后，定量检测 cccDNA 水平，结果表明癌组织中 cccDNA 水平明显降低（1 011.0 copies/μl vs. 501.8 copies/μl，P=0.058，图5），表明肿瘤组织中 cccDNA 含有较多的 AP 位点。

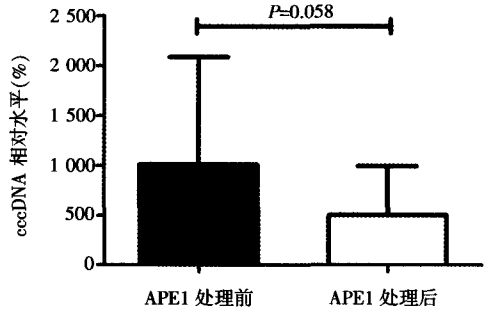


图 5　APE1 酶处理肿瘤组织中 HBV cccDNA 前后的相对表达水平

Fig.5　Intrahepatic HBV cccDNA level in cancerous tissues with APE1 treatment

3　讨　论

HBV 感染是引起肝癌的主要因素[8]。而 HBV cccDNA 是 HBV 复制转录的模板，在 HBV 的感染过程中起着举足轻重的作用，所以 cccDNA 在肝癌的发生中同样也是至关重要的角色。为了深入研究肿瘤发生过程中 HBV 的复制表达水平，本文定量检测了 HCC 组织中 HBV cccDNA、HBV total DNA 和 pgRNA 的表达水平，发现肝癌中的 HBV cccDNA 表达水平显著低于配对的癌旁组织，而 Wong 等[9]研究发现在 HBsAg 阳性的肝癌患者中，癌组织中 HBV cccDNA 表达水平明显高于癌旁组织。造成这样差异的原因可能有 3 点：(1)本研究中检测 HBV cccDNA 用的是特异性的 Tagman 法，而 Wong 等[9]用的是 Invader assay 方法，方法的不同可能会造成结果的不一致；(2)本研究中没有将患者 HBsAg 的特征进行分组，而 Wong 等[9]得出的结论仅限于 HBsAg 阳性的患者。(3)选用样本地域的差别也有可能造成结果的不一致，本研究中所用样本来自重庆地区，而

Wong等[9]的研究中不清楚其样本来源地区。值得指出的是，由于样本量较少，需要更多的样本量来验证这一结论。

为了探索肝癌组织中 cccDNA 水平降低的原因，本文进一步分析了肝癌中 HBV cccDNA 的突变，发现 HBV cccDNA 不同区域的碱基突变类型、数量的分布是不同且不均匀的，其中 G-A 突变形式和个数在 preC/C 和 X 两个区域分布最多。Bonvin 等[10]发现载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽 3（apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide 3, APOBEC3）的家族成员 B(APOBEC3B)能对 HBV 基因组进行编辑，在正链 DNA 上累积 G-A 高突变来抑制病毒的复制。国内发现 APOBEC3 使 HBx 发生突变，进而促进了肿瘤的发生[11]。最近，德国 Lucifora 课题组[12]进一步发现干扰素和淋巴毒素受体能够分别上调 APOBEC3A 和 APOBEC3B，介导核内的 cccDNA 脱氨基作用，可能经过UNG 所介导的 BER 修复途径而降解。为了进一步探索肝癌组织中 cccDNA 水平的降低与 APOBEC3 家族蛋白的相关性，本研究分析了 HBV cccDNA 的 preC/C 和 X 区域发生 G-A 突变位点的 4 种二联核苷酸组成形式（GA、GT、GG、GC），以 GA 二联核苷酸组合方式所占的百分比最多，而之前有研究表明 APOBEC3 家族脱氨基作用的特点就是依赖 5'GpA 和 5'GpG 的二联核苷酸形式[13-14]，暗示这 2 个区域发生的 G-A 高突变与 APOBEC3 基因家族对 HBV cccDNA 剪切有关。此外，本研究中发现肝癌组织 cccDNA 中存在大量的 AP 位点，暗示肿瘤组织中 cccDNA 可能被 APOBEC3 家族蛋白脱氨基作用后，继而 UNG 识别形成 AP 位点，进入 BER 修复途径而降解。

HBV cccDNA 水平在癌组织中明显低于癌旁组织，可能与癌组织中 HBV cccDNA 发生大量 GA 突变及大量 AP 位点存在有关，而这一切可能与 APOBEC3 家族相关。

参 考 文 献

[1] Papatheodoridis GV, Manolakopoulos S, Dusheiko G, et al. Therapeutic strategies in the management of patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Lancet Infect Dis, 2008, 8(3): 167-178.

[2] Shepard CW, Simard EP, Finelli L, et al. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination[J]. Epidemiol Rev, 2006 (28): 112-125.

[3] Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovirdipivoxil therapy[J]. Gastroenterology, 2004, 126(7): 1750-1758

[4] 黄 瑶，罗 璇，陈彦猛，等. 肝癌患者肝组织中乙肝病毒共价闭合环状 DNA 表达水平及与 e 抗原相关性研究[J]. 重庆医科大学学报，2015，40(11)：1430-1433

[5] Séverine M, Sandra C D, Isabelle C, et al. Rolling circle amplification, a powerful Tool for genetic and functional studies of complete hepatitis B virus genomes from low-level infections and for directly probing covalently closed circular DNA[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(9): 3068-3073.

[6] 罗 璇，龙泉鑫，黄爱龙，等. 应用滚环扩增研究肝癌组织中的 HBV cccDNA[J]. 重庆医科大学学报，2014，39(12)：1723-1726.

[7] Friedman JI, Stevers JT. Detection of damaged DNA bases by DNA glycosylase enzymes[J]. Biochemistry, 2010, 49(24): 4957-4967.

[8] 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.

[9] Wong DK, Yuen MF, Poon RT, et al. Quantification of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in patients with hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2006, 45(4): 553-559.

[10] Bonvin M, Greeve J. Effects of point mutations in the cytidine deaminase domains of APOBEC3B on replication and hypermutation of hepatitis B virus in vitro[J]. J Gen Virol, 2007, 88(Pt 12): 3270-3274.

[11] Xu R, Zhang X, Zhang W, et al. Association of human APOBEC3 cytidine deaminases with the generation of hepatitis virus B x antigen mutants and hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2007, 46(6): 1810-1820.

[12] Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, et al. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA[J]. Science, 2014, 343 (6176): 1221-1228.

[13] Suspène R, Guétard D, Henry M, et al. Extensive editing of both hepatitis B virus DNA strands by APOBEC3 cytidine deaminases in vitro and in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(23): 8321-8326.

[14] Burns MB, Temiz NA, Harris RS. Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers[J]. Nat Genet, 2013, 45(9): 977-983.

（责任编辑：张辉洁）