

原发型肝癌的肝内 HBVDNA 整合状况

吕 凌 彭文伟 何树初 谢彦博

(附属第三医院传染科)

提 要 应用 ^{32}P 标记的克隆 HBVDNA 片段探针对 30 例原发型肝癌病人的肝内组织进行了 DNA 电泳转移 Southern 杂交。结果检出 HBVDNA 整合者 21 例 (70%)，其中癌组织整合者 18 例 (60%)，癌外组织整合者 16 例 (53%)，双份组织均整合者 13 例 (43%)。杂交带分析发现，不同例和同例肝内不同组织的 HBVDNA 整合模式都不相同，提示整合具随机性并可能发生整合和/或侧翼序列的基因重排。由于探针含 HBV 基因组中 1.4~2.8kb 的 DNA 顺序，故结果实际反映 S 基因及其下游增强子的整合状况。基因重排和增强子插入整合并活化细胞原癌基因的致癌机理在本文也进行了初步探讨。

关键词 原发型肝癌 HBVDNA 整合 基因重排 增强子

大量证据表明，乙型肝炎病毒 (HBV) 感染与原发型肝癌 (HCC) 发生有关。基于 HCC 肝内常检出 HBVDNA 整合，现认为 HBV 是 HCC 的致癌因子。晚近研究提示，这有赖于整合 HBVDNA 作用诱导肝细胞转化^[1]。中国作为 HBV 感染高流行区和 HCC 高发区，有关此项研究亟需展开。为此，我们选 30 例 HCC 患者，对其肝内癌灶和癌外双份组织的 HBVDNA 整合状况作如下初步研究。

材 料 与 方 法

研究对象 为 1986 年 5 月~1986 年 12 月广州四所医院 (中山一院、中山二院、肿瘤医院、华侨医院) 外科切除的 30 例 HCC 病人。病人平均年龄 51 ± 9.8 岁，男女比 6.5 : 1。每例无菌取血清及肝内组织，后者包括癌灶组织及癌灶 3cm 外之肝组织。组织去血污后立即液氮冻存。

实验方法

1. 血清 HBV 标记检测 HBsAg、HBsAb、HBsPHSAR 为 RIA 法，HBcAb、HBeAg、HBeAb 为 ELISA 法。

2. 克隆 HBVDNA 片段探针制备 自 BamHI 酶切的重组质粒 PTHBV (Dr. P. Price 赠予) 中纯化 1.4kb 带 S 基因和其下游增强子的 HBV-DNA 片段进行缺口翻译^[2]。反应液体积 50 μl ，

含 HBVDNA 0.5 μg ，0.02mM dATP、dGTP、dTTP (BRL)，5'-(α - ^{32}P)-dCTP (Amersham)，以及 DNA 多聚酶 I / DNA 酶 I (BRL)。15 $^{\circ}\text{C}$ 育 90 分钟后过 $\phi 1 \times 11\text{cmG}-50$ Sephadex 柱。集并峰管洗脱液即为探针，液闪测比放为 1.4×10^8 cpm/ μg 。

3. 组织 DNA 提取 液氮中压碎组织，加 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白酶 K 消化、酚提和透析，再加 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 胰 RNA 酶消化、酚提和透析。内析液测 DNA 浓度后 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用^[3]。

4. 组织 DNA 酶切、电泳、转移、杂交和放射自显影 用 EcoRI、Hind III 或 Taq I (Boehringer/mannheim) 消化或未消化的组织 DNA 经琼脂糖凝胶电泳分离后，紧贴 Zeta-Probe 滤膜 (Bio-Rad) 作快速电泳转移。然后按 Molecular Cloning 一书所载之方法进行杂交和放射自显影^[3]。

实 验 结 果

肝内 HBVDNA 状态 HBVDNA 一般以二种状态存在于肝内，即游离型和/或整合型。游离型杂交带 $\leq 3.2\text{kb}$ ，整合型杂交带 $> 3.2\text{kb}$ ^[4]。图 1 示 HCC 肝内之 HBVDNA 状态。a 为癌灶组织 DNA 杂交图，其中 H 行 (Hind III 酶切) 有 2 条 $> 3.2\text{kb}$ 的整合型条带，反映染色体有 2 个 HBVDNA 整合位点。

这两条杂交带在R行(EcoR I 酶切)相应前移,说明已被酶切,其 DNA 长度变短。b 为 癌外组织 DNA 杂交图,其中H行有>3.2kb 和≤3.2kb 的杂交带各 2 条,说明肝内既有整合也有游离型 HBVDNA。

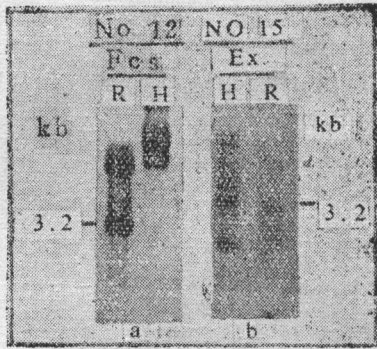


图 1 肝内 HBVDNA 状态

No: 病例号, H: Hind III 酶切, R: EcoRI 酶切, Fcs: 癌灶组织, Ex: 癌灶外肝组织

本文30例 HCC 患者肝内双份组织 DNA 转移杂交结果,检出 HBVDNA 整合者21例(70%),其中癌组织整合者18例(60%),癌外组织整合者16例(53%),双份组织均整合者13例(43%);19例整合病例(91%)和2例非整合病例,肝内还检出游离型 HBVDNA。

肝内 HBVDNA 整合模式 13例双份组织均整合病例,其癌组织 HBVDNA 整合模式均不同于癌外组织所见。这表现为整合位点和/或整合杂交带电泳位置不同。并且,癌外组织多还合并有游离型 HBVDNA 存在。图 2 示 1 例 HCC 肝内良恶组织的 HBVDNA 整合模式异同。Hind III 酶切后两组织各显 5 条整合带,数目相同,位置相近,但 EcoR I 酶切后其数目和位置却发生较大变异,说明二者染色体整合位点或整合序列有所不同。图 3 示 2 例 HCC 癌组织和癌外组织的 HBVDNA 分子状态差别。2 例双份组织都有 1~2 个位点的 HBVDNA 整合,但电泳位置不一致,而且癌外组织还见有涂抹状游离型 HBVDNA 杂交带,而癌组织则没有。上述13例双份组织均整合病例,12例癌外组织还检出游离型 HBVDNA。不同病例,

肝内 HBVDNA 整合模式差别更大,如见图 4。DNANO1 经 Hind III 酶切后显示 2 条整合带,EcoR I 酶切后变为 4 条(一切为二);DNANO4 经 Hind III 酶切后显示 3 条整合带,EcoR I 酶切后变为 5 条,Taq I (作用类似 EcoR I) 酶切后又成为 4 条。各条带位置及数目很不一致。

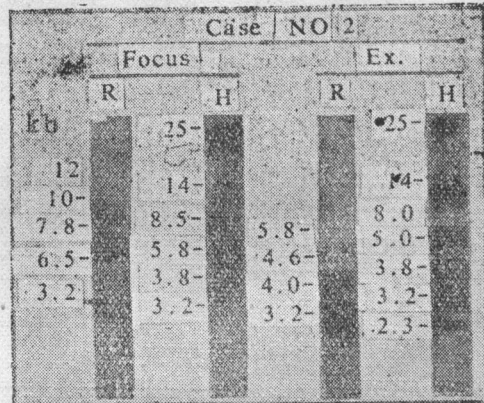


图 2 肝内 HBVDNA 整合条带电泳位置比较

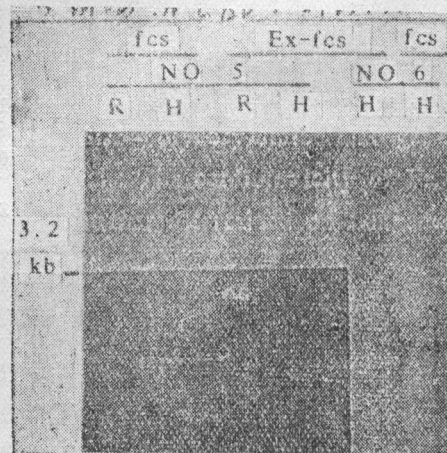


图 3 HCC 肝内的 HBVDNA 分子状态

肝内 HBVDNA 状态与血清 HBV 标记的相关性

本文肝内 HBVDNA 状态与 HBsAg 的相关关系见附表。可见30例 HCC, 24例(80%)是 HBsAg 携带者,所检21例整合病例,20例(95%) HBsAg 阳性,另 1 例 HBsAb 阳性,亦即全部整合病例皆有 HBV 感染的血清学依据。此外,

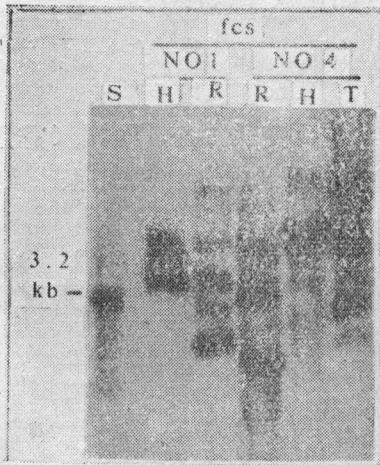


图4 HCC 癌灶组织的 HBVDNA 整合模式

附表 30例HCC患者肝内癌灶和癌外双份组织的HBVDNA状态

肝内HBVDNA	HBsAg阳性 (n=24)		HBsAg阴性 (n=6)	
	T ^a	NT ^b	T ^a	NT ^b
游离型	0	7	0	0
游离型+整合型	8	13	0	1
整合型	10	2	0	0
未测出	6	2	6	5

^aT, 癌灶组织

^bNT, 癌外肝组织

整合病例19例(91%) HBsPHSAR阳性, 18例(86%) HBcAb 阳性, 2例HBeAg 阳性, 3例HBeAb 阳性。整合且 HBsPHSAR 阳性19例中有17例(90%)肝内可检出游离型 HBVDNA, 看来两者有一定的相关性。

HBVDNA整合与组织病理改变的相关性

30例癌组织梁索型16例有整合者 8例(50%), 假腺管型 9例有整合者 6例(67%), 低分化型 3例全部有整合(100%), 透明癌型 1例也有整合, 硬化结节型 1例无整合。前三型组织分化程度较高, 其HBVDNA 整合率均比低分化型低。30例癌外组织 CAH14例有整合者 8例

(57%), 活动型肝硬化 9例有整合者 5例(56%), CPH 4例有整合者 3例(75%), 正常者 3例无 1例有整合。CAH 和活性肝硬化的病理特征是碎屑坏死, 它似乎与 HBVDNA 整合相伴随。

讨 论

1. 肝内 HBVDNA 整合率 本文HCC 病例肝内 HBVDNA 整合率 HBsAg 阳性者为 83.3%(20/24), HBsAg 阴性者为 16.7%(1/6)。前者结果与某些报道相近, 反映携带者病毒整合所需因素可能无人种地域差别^[6]。16.7%(4/24)的HBsAg 阳性病人肝内无HBVDNA 整合提示其致癌机理另有所在, 或许与 HBV 其它产物有关^[7]。HBsAg 阴性 HCC 病人肝内 HBVDNA 整合率有报道高达75%(6例/8例), 本文和 Lai 的结果均低于此数^[4,6]。三者样本固然都少, 但多种 HBV 以外因素的致癌作用确实不可低估^[7]。另从整体来看, 30例 HCC 的癌组织 HBVDNA 整合率为60%(18/30)亦即40%(12/30)的病人肝癌与病毒整合无直接关联。后者除却 3例癌外肝组织检出 HBVDNA 整合外, 其余 9例(30%) HCC 的发病机理可能确非HBVDNA 整合所致。至于癌外肝组织的 HBVDNA 整合, 本文认为它先于肿瘤发生, 是 HBV 感染游离型向整合型的移行阶段, 故多合并游离型HBVDNA 存在, 因此整合率低于癌组织所见^[1]。

2. 肝内 HBVDNA 整合模式 本文 21例整合病例, 其肝内整合HBVDNA 的杂交带数目和电泳位置彼此很不一致, 说明 HBV 在宿主染色体上没有特定整合位点, 提示病毒整合只是随机发生所累积的结果, 整合可能并非直接致癌原因^[1]。本文还发现, 13例双份组织均整合病例, 其癌组织的 HBVDNA 整合模式与癌外组织所见也有差别, 反映二种组织的病毒整合一是发生的时间顺序有别, 二是癌组织的病毒整合基因和/或侧翼序列已发生基因重排^[1]。理论上讲, 同一肝内的 HBVDNA 整合虽则随机不同步发生, 但有克隆选择优势, 如

果序列重排基因其功能足以影响细胞生长调控, 则后果可能就是细胞转化^[1]。

3. 肝内 HBVDNA 整合与病理改变 本文肝癌组织病理分型以梁索型和假腺管型以及低分化型为主, 与他人报道相似^[8]。各型癌组织都有 HBVDNA 整合, 仅整合率有别。可见病毒整合对癌组织分化可能无决定影响。癌外组织大多数 (CAH+活动型肝硬化=77%) 有碎屑坏死的病理改变, 后者持续活动和继发的肝细胞再生既可有助于病毒整合又可促使发生基因重排^[11]。

4. HBVDNA 整合与HCC致癌机理 关于 HBVDNA 整合与HCC的致癌机理有以下几种推测: ①病毒增强子插入整合活化细胞原癌基因^[9]; ②整合和/或侧翼序列基因重排使细胞生长分化失控^[1]; ③整合序列和侧翼序列形成融合基因混合转录和表达^[10]; ④其它遗传结构和功能异常如逆转录等^[10]。目前研究对前二者了解较为深入。现已发现, 动物和人肝内有包括一系列增强子在内的嗜肝病毒 DNA 整合^[9]; 被整合的 HCC 细胞中有包括myc、Lca、和N-ras 等许多原癌基因的激活和异常表达^[10]; 整合和/或侧翼序列的基因重排也屡见不鲜^[1]。据认为, 这些可能都是肝细胞转化的原因^[1]。从本文结果来看, HCC 肝内 HBV DNA 整合比较普遍, 说明整合可能是癌变的遗传结构基础; 良性和恶性组织的病毒整合模式不同, 反映癌细胞中的整合和/或侧翼序列可能已发生基因重排, 由于HCC与碎屑坏死常相伴随, 提示肝细胞坏死对整合和重排可能具促进作用。可以设想, 整合和重排如果影响细胞生长分化则其后果将是细胞转化。转化细胞的单克隆选择和增殖必然是肿瘤发生^[1]。更重要的是本文所用片段探针仅含 HBV 基因组中的 S-基因和其下游增强子, 后者插入整合并活化原癌基因的致 HCC 机理看来也很有可能。

5. 肝内HBV状态与血清 HBV 标记 一般认为, 高发区 HCC 患者其 HBsAg 携带率为 50~80%, 我们的结果是80%, 反映两者高度

相关。如按一种以上 HBV 标记阳性计, 则本文病例93%(28/30)有 HBV 感染证据, 故相关程度更著。换言之, 6例HBsAg阴性HCC, 4例(66.7%)血清其它 HBV 标记证实曾有 HBV 感染, 其 HCC 可能与之有关。此外, 本文全部 HBeAg 阳性病例和 90% HBsPHSAR 阳性病例肝内均检出游离型 HBVDNA, 说明这二种标记与HBVDNA游离状态关系一致。

参 考 文 献

- [1] Popper H, et al. Relation of the hepatitis B virus carrier state to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1987; 7(4):764.
- [2] Rigby FWJ, et al. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 1977; 113(1):237.
- [3] Maniatis T, et al. Isolation of high-molecular-weight, eukaryotic DNA. Southern transfer. Autoradiography. In: Maniatis T, et al. ed. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1987:280-281 382~389, 470~472.
- [4] Lai Ming-Yang, et al. Status of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma: A study based on paired tumor and non-tumor liver tissues. *J Med Virol* 1988; 25(3):249.
- [5] Hino O, et al. Relationship between serum and histochemical markers for hepatitis B virus and rate of viral integration in hepatocellular carcinomas in Japan. *Int J Cancer* 1985; 35(1):5.
- [6] Brechot C, et al. Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen. *N Engl J Med* 1985; 312(5):270.
- [7] Beasley PR. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1988; 61(10):1942.
- [8] Wu Tzee Chung, et al. Primary hepatocellular carcinoma and hepatitis B infec-

tion during childhood. *Hepatology* 1987; 7(1):46.

[9] Chen Jen-Yang, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinoma: analysis by hybridization

with subgenomic DNA fragments. *Hepatology* 1988; 8(3):518.

[10] Ganem D and Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Ann Rev Biochem* 1987; 56:651.

INTEGRATION OF HEPATITIS B VIRUS DNA IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA

Lu Ling Peng Wenwei He Shuchu Xie Yanbo

(Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital)

To investigate the hepatitis B virus (HBV) DNA status in the liver when hepatocellular carcinoma (HCC) has developed, 30 paired tumorous and nontumorous liver tissue from 24 hepatitis B surface antigen (HBsAg)-seropositive and 6 HBsAg-negative patients with HCC were studied by Southern blot analysis which involved the using of ³²P labeled HBVDNA-S subgenomic fragment as the probe and fast electrophoretic transfer of DNA onto Zetaprobe membrane in place of capillary blot onto nitrocellulose membrane. Twenty one (21/30 = 70%) integrants had been discovered, including 20 (20/24 = 83.3%) HBsAg positive and 1 (1/6 = 16.7%) HBsAg negative, among them 18 (60%) had integrated HBVDNA in tumorous, 16 (53%) in nontumorous and 13 (43%) in both tissue. The hybridization patterns of integrated HBVDNA were all different not only in different integrants but also in different parts of liver tissue of any integrant suggesting the randomness of viral integration and the rearrangement of integrated and/or flanking sequences. Since the subgenomic probe had the fragment of 1.4~2.8 kb in HBV genome, the result specifically represented the status of S-gene and its downstream enhancer. Possibly, the carcinogenesis of HCC lies on the integration of HBV enhancers and ensuing activation of cellular oncogenes as well as the rearrangement of abnormal sequences and actively persistent hepatocellular necrosis.

Key words Hepatocellular carcinoma (HCC) HBVDNA integration
Rearrangement Enhancer