乙型肝炎病毒诱发肝细胞癌分子机制研究进展

邵一鸣^{1,2}, 苏力德^{1,2}, 郝睿^{1,2}, 王茜茜², 那仁满都拉^{1,2}

1. 内蒙古医科大学药学院, 内蒙古 呼和浩特 010000

2. 浙江大学医学院, 浙江 杭州 310058

[摘要] 乙型肝炎病毒(HBV)诱导肝细胞癌(HCC)的发生是一个多阶段、多因素相互作用的复杂过程。HBV促进HCC发生、发展的途径主要包括HBV DNA整合至宿主肝细胞基因组从而影响整合位点的基因功能、形成致癌作用的截短蛋白、造成宿主基因组的不稳定,HBV基因组S、C、X区基因突变,HBV X基因编码的HBx蛋白激活原癌基因、抑制抑癌基因等。本文综述了近年来HBV诱发HCC分子机制的研究进展,以期HCC预防、早期预测及术后辅助治疗提供理论指导。

[关键词] 乙型肝炎病毒; 肝细胞癌; 基因突变; 基因整合; 乙型肝炎病毒X蛋白; 综述

[中图分类号] R735.7 **[文献标志码]** A

Advances on molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma

SHAO Yiming^{1,2}, SU Lide^{1,2}, HAO Rui^{1,2}, WANG Qianqian², NARANMANDURA Hua^{1,2}

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010000, China; 2. School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Corresponding author: NARANMANDURA Hua, E-mail: narenman@zju.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0003-0799-2340>

[Abstract] The pathogenesis of hepatitis B virus (HBV)-associated hepatocellular carcinoma (HCC) is complicated with the crosstalk of multiple factors and the multi-step processes. The main mechanisms underlying the HBV-induced HCC include: ① integration of HBV DNA into the host hepatocyte genome to alter gene function at the insertion site, resulting in host genome instability and expression of carcinogenic truncated

收稿日期: 2020-09-23 接受日期: 2020-11-11

基金项目: 国家自然科学基金(82003875, 81872942); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程[浙卫发(2018)62号]; 浙江省博士后择优资助项目(ZJ2020154)

第一作者: 邵一鸣, 硕士研究生, 主要从事急性髓细胞白血病的机制研究; E-mail: 2018120006@stu.immu.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0001-9594-3738>

通信作者: 那仁满都拉, 教授, 博士生导师, 主要从事抑制剂治疗急性早幼粒细胞白血病的机制研究; E-mail: narenman@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0003-0799-2340>

proteins;②HBV gene mutations at S,C,and X coding regions in the genome;③HBV X gene-encoded HBx protein activates proto-oncogenes and inhibits tumor suppressor genes,leading to the HCC occurrence. In this article,the recent research progress on the molecular mechanism of HBV-induced HCC is comprehensively reviewed,so as to provide insights into the prevention,early prediction and postoperative adjuvant therapy of HCC.

[**Key words**] Hepatitis B virus; Hepatocellular carcinoma; Gene mutation; Gene integration; Hepatitis B virus X protein; Review

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2021, 50(1): 113–122.]

[**缩略语**] 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV); 脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA);肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC); 乙型肝炎病毒X蛋白(hepatitis B virus X protein,HBx); 端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase,TERT); 细胞周期蛋白E1(cyclin E1,CCNE1); 乙型肝炎e抗原(hepatitis B e antigen,HBeAg); 乙型肝炎核心抗原(hepatitis B core antigen,HBeAg); Janus激酶/信号转导与转录激活子(Janus kinase/signal transducer and activator of transcription,JAK/STAT); 丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK); p38分裂原激活的蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinases,p38MAPK); 微核糖核酸(microRNA,miRNA,miR); 转化生长因子 β (transforming growth factor- β ,TGF- β); 表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF); 表皮生长因子受体(EGF receptor,EGFR);核因子 κ B(nuclear factor κ B,NF- κ B); 白细胞介素6(interleukin 6,IL-6); 载脂蛋白B mRNA编辑酶催化多肽家族(apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like,APOBEC)

2017年世界卫生组织的分析报告显示,截至2015年全世界HBV感染者约为2.57亿人次,占总人群的3.5%,每年约有88.7万人死于慢性乙型肝炎,其中约45%的患者死于HCC^[1]。在我国,约85%的HCC患者存在HBV感染史^[2]。HBV作为诱发HCC最为常见和重要的因素,能够通过多种途径诱发HCC。研究发现,HBV基因组突变及其与宿主基因组整合、HBx蛋白表达、炎症因子产生等均在HBV感染诱发HCC的过程中发挥重要的调控作用。因此,明确HBV介导HCC发生发展的具体分子机制,对HCC的预防、诊断和治疗具有指导意义。

1 HBV DNA整合至宿主肝细胞基因组诱发HCC

研究发现,在HBV相关HCC患者的肝组织中,80%~90%的癌细胞可检测到HBV DNA整合^[3]。值得注意的是,肝癌组织HBV DNA的整合量相比邻近组织高很多。据统计,HBV DNA在HCC患者肝组织中的整合率高达86.4%,而在非HCC患者肝组织中的整合率仅为30.7%,

且HBV整合至宿主肝细胞基因组发生在HCC之前^[4]。由此可见,HBV DNA和宿主基因组的整合可能与HCC的发生存在重要关联。已有研究表明,HBV DNA与宿主基因组整合对HCC的发生具有促进作用,具体机制主要有影响整合位点基因的功能、形成具有致癌作用的HBV截短蛋白、增加宿主基因组的不稳定性(图1)。

1.1 HBV DNA影响整合位点基因的功能

HBV可以通过整合其他基因从而影响整合位点基因的功能。如TERT是端粒酶的催化亚基,其主要功能是维持染色体末端端粒的长度^[5],同时在细胞衰老、肿瘤发生等过程中起重要作用。TERT在90%以上的肿瘤中都呈现明显上升的趋势,其在HCC患者肝组织中的表达量也特异性上调^[6]。TERT核心启动子区位于TERT转录起始点上游200 bp到下游73 bp,该区段对TERT启动子的转录活性有调控作用。大量研究表明,TERT是与HBV整合频率最高的基因,且HBV在TERT核心启动子区的整合作用明显强于其他位置^[7]。TERT的高频整合片段覆盖了核心启动子区,这可

乙型肝炎病毒(HBV) DNA通过整合至宿主基因组中、HBV基因组突变以及乙型肝炎病毒 X 蛋白(HBx)等途径促进肝细胞癌(HCC)的发生和发展. APOBEC3: 羧基蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽家族 3.

图 1 乙型肝炎病毒诱发肝细胞癌的示意图

Figure 1 Schematic diagram of hepatocellular carcinoma induced by hepatitis B virus

能是 HBV 整合优先选择的结果^[8]。此外,HBV 整合可以上调 TERT 的 RNA 表达水平,其不仅与 HBV 的整合位置有关,还与整合的 HBV 序列密切相关^[9]。有学者认为,整合的 HBV 序列能扮演增强子的角色,通过顺式激活作用上调 TERT 的转录水平^[10]。

CCNE1 也是 HBV DNA 常见的整合插入基因,表达于细胞周期的 G1~S 期,通过结合并激活周期蛋白依赖激酶 2 促进 DNA 复制及组蛋白合成^[11]。研究显示,HBV 整合可引起 CCNE1 的扩增和重组,使 CCNE1 基因过表达 CCNE1,进而使周期蛋白依赖激酶 2 处于持续激活状态,促使细胞异常增殖,最终导致肿瘤的发生^[12]。

1.2 HBV DNA 形成具有致癌作用的 HBV 截短蛋白

在 HBV DNA 整合过程中,为了更好地适应宿主的免疫反应,逃逸宿主的免疫清除,其 HBx 基因区时常发生断裂。这种断裂的 HBx 基因整合至宿主 DNA 后,转录翻译为 HBx 蛋白截短体,通常为 HBx 羧基端截短蛋白^[13]。值得注意的是,HBx 羧基端缺失不同氨基酸长度的截短体对 HCC 发生以及 HBV 复制起着不同的作用。研究表明,肝细胞感染 HBV 后,三磷酸脱氧核苷酸水平在 G0/G1 期相对较低,HBV 复制并不活跃,但羧基端缺失 20 和 40 个氨基酸的 HBx 截短蛋白会使细胞的

G0/G1 期出现阻滞,三磷酸脱氧核苷酸水平上升,HBV 的复制能力也随之增强,促进肝细胞的恶性转化及肿瘤的浸润,从而增加 HCC 发生风险^[14]。

1.3 HBV DNA 增加宿主基因组的不稳定性

HBV DNA 在人基因组上的随机整合会导致宿主基因组不稳定,包括染色体结构缺失、扩增、断裂、倒置、易位等^[15]。例如,在 HCC 发生过程中,1q、8q、17q、6p、20q、7q 等染色体臂存在高频扩增,而 8p、4q、13q、17p、16q 等常出现缺失^[16];也有文献报道在 HCC 细胞系中可以检测到 t(1;10)(q10;p10)染色体易位^[17]。此外,HBV DNA 整合还会使原癌基因如 C-MYC 等转变为致癌基因,或导致抑癌基因如 P53、P21 等发生突变,进而失去其正常的生物学功能,影响肝细胞的正常增殖,致使其周期性生长过程紊乱,促进 HCC 的发生^[18]。

2 HBV 基因组突变诱发肝细胞癌

HBV 基因组包含 S、P、C、X 四个开放阅读框^[19],它们之间存在部分重叠,如图 2 所示。研究表明,S、C、X 区基因突变与 HCC 的发生密切相关,P 区基因突变则与 HBV 对核苷(酸)类药物的耐药性相关^[20]。以下重点阐述 S、C、X 区基因突变诱发 HCC 的分子生物学机制。

2.1 HBV S 区基因突变

HBV S 区由前 S 区基因和 S 区基因组成,其中

A: 乙型肝炎病毒(HBV)基因组结构为部分双链环状DNA, 包含4个主要的开放阅读框, 分别为S区、C区、P区、X区。B: S区基因分为前S1区(nt2848~3204)、前S2区(nt3205~154)和S区(nt155~835), 其中S基因编码的乙型肝炎表面抗原是HBV感染的标志物; P区基因覆盖了3/4的基因组, 其主要编码DNA聚合酶; C区包括前C区基因(nt1814~1900)和C区基因(nt1901~2452), 分别编码乙型肝炎e抗原和乙型肝炎核心抗原; X区基因(nt1374~1838)编码产物是含154aa的X蛋白, 该蛋白可通过多种机制在HBV致肝细胞癌过程中起重要作用。

图2 乙型肝炎病毒基因组结构示意图

Figure 2 Schematic diagram of the genomic structure of hepatitis B virus

前S区基因缺失、突变与HCC的发生和发展密切相关^[21]。前S区基因缺失、突变可使两种不同类型的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白过度表达, 并聚集在肝细胞内质网上分别形成I型和II型毛玻璃样肝细胞。II型毛玻璃样肝细胞以群集方式聚集于肝细胞内质网后会引起强烈的内质网应激, 导致氧化性DNA损伤、基因突变以及基因组不稳定, 进而诱发肝细胞癌变^[22]。前S区基因又可分为前S1区和S2区基因。HBV前S2区基因缺失、突变翻译表达的突变抗原会聚集在肝细胞内质网上, 致使细胞内质网压力增大、细胞周期蛋白A异常表达以及细胞中心体过度合成, 使得染色体不稳定, 这可能是HBV感染诱发HCC的潜在机制^[23]。

2.2 HBV C区基因突变

HBV C区由前C区基因和C区基因组成, 分别参与编码HBeAg和HBcAg。大量研究表明, HBV前C区部分基因突变也是HCC的重要发病原因^[24-26]。例如, HBV前C区基因G1896A突变可导致HBeAg第28位氨基酸表达为终止密码子, 终止HBeAg表达, 减少HBeAg合成但不干扰HBV复制, 造成病毒持续感染, 加重感染HBV的肝细胞损伤, 进一步诱发HCC^[25]。HBV C区基因上的基本核心启动子区突变同样会促进HCC的发生和发展, 如基本核心启动子区的双突变(A1762T/

G1764A)导致HBV能够调控前C区RNA转录, 减少HBeAg产生^[26], 进而增强病毒复制, 加重肝细胞损伤、肝细胞炎症反应及肝硬化, 同时增强P21的表达, 促进肝细胞增殖失控并进一步发展为HCC^[27]。此外, HBV C区基因的核心启动子区突变还可通过激活转录因子E2F1以及下调细胞周期抑制物, 增强S期激酶相关蛋白的表达, 缩短细胞增殖周期, 从而促使HCC的发生^[28]。

2.3 HBV X区基因突变

HBV X区是HBV基因组中最小的开放阅读框, HBV X区基因编码的HBx蛋白与肝细胞的恶性转化密切相关^[29]。流行病学研究发现, HBx突变可增加HCC发生的风险^[30]。其中, 羧基端缺失24个氨基酸的HBx可通过激活转录因子C-Jun增强HepG2细胞的侵袭力和转移力; 而缺失27个氨基酸的HBx可增强NF- κ B、TERT的转录活性及C-MYC、增殖细胞核抗原的表达, 从而促进肝细胞增殖^[31]。以上研究结果均表明HBx的羧基端在控制细胞增殖、侵袭和转化过程中起关键作用。此外, X区基因不仅编码HBx, 还编码包括基本核心启动子区、增强子II等在内的多个顺式元件。其中, X区基本核心启动子区的T1753V和A1762T/G1764A突变是诱发HCC的常见突变类型^[32]。有研究者发现, A1762T/G1764A突变可

能通过调控 TGF- β 1 的表达参与 HCC 发生发展进程^[33]。此外,增强子 II 区的 C1653T 突变是增强子 II /核心启动子的强活化元件,可增强其活性。由于许多反式调节核因子在 1653 位点上结合 HBV DNA,因此这种突变可以改变多种核因子的结合亲和力,增加 HCC 发生的风险^[34]。

3 HBx 蛋白在 HBV 诱发 HCC 过程中的作用

HBx 蛋白是由 HBV X 区基因编码的一种多功能调节蛋白,由 154 个氨基酸组成,相对分子质量约为 17 000^[35]。该蛋白既可直接作用于细胞转录因子参与核内相关转录过程,又可激活信号转导系统参与细胞内的信号转导^[36]。研究表明,HBx 蛋白可通过多种机制参与 HCC 发生(图 1)。

3.1 激活原癌基因

RAS、C-FOS、C-MYC 等是常见的原癌基因,具有调控细胞周期、控制细胞生长和分裂等作用,其异常激活可使细胞的增殖、分化失控,最终导致细胞发生癌变^[37]。HBx 蛋白能够反式激活多种原癌基因,如 HBx 蛋白可通过上调激活蛋白 Shc 激活 RAS 基因,以及通过 JAK/STAT 通路间接激活 C-FOS 基因^[38]。HBx 蛋白对原癌基因多方面的反式激活极大地促进了癌细胞的生长,导致 HCC 的发生。

3.2 抑制抑癌基因

肿瘤的发生不仅与原癌基因激活有关,还与抑癌基因的功能抑制密切相关。P53 蛋白是一种常见的肿瘤抑制因子,具有促进癌细胞凋亡、修复 DNA 损伤等多种生物学功能,其表达下调或失活往往与肿瘤的形成紧密相关^[39]。研究发现,HBx 蛋白能够通过细胞质内的 P53 蛋白结合形成复合物,阻滞 P53 蛋白向细胞核内转移,降低其在细胞核内的浓度,从而抑制其诱导细胞凋亡的功能^[40]。P53 蛋白的羧基端结构域是其与损伤 DNA 结合的区域,而 HBx 蛋白通过竞争性结合该区域阻碍 P53 蛋白与损伤 DNA 的结合,影响 P53 的 DNA 修复功能^[41]。此外,在转录水平上,HBx 蛋白能够抑制 P53 启动子的活性,进而下调 P53 蛋白的表达^[42]。因此,HBx 蛋白能够通过多种途径抑制抑癌基因 P53 的活性,进而促进 HCC 的发生发展。

3.3 异常活化蛋白激酶

MAPK 信号通路是广泛存在于各种细胞中的一条信号转导途径,参与调节细胞生长、发育、分

裂等一系列生命活动^[43]。有研究发现,HBx 蛋白能够使肝细胞中 MAPK 家族的 MAPK 激酶 3 及其下游分子 p38MAPK 异常激活^[44]。这两种激酶的异常活化可引起肝细胞周期、增殖和凋亡的改变,从而发挥致癌作用。一方面,HBx 蛋白能够通过 p38MAPK 途径引起细胞周期 G2/M 检查点活化,使细胞周期从 G2 期向 M 期转化的相关因子 Cdc25B、CyclinB1 等的表达发生改变,造成肿瘤细胞异常增殖^[45]。另一方面,HBx 蛋白可以通过激活 HCC 细胞中 MAPK 家族的 MAPK 激酶 3,促进 p38MAPK 磷酸化,同时使更多 p38MAPK 进入细胞核内发挥致癌作用^[45]。

3.4 调控 miRNA

miRNA 是一种由约 22 个核苷酸组成的短链内源性非编码 RNA 分子,可在转录水平调控基因的表达^[46]。研究表明,大多数 miRNA 基因位于肿瘤相关位点区域,且在肿瘤细胞中的表达常处于异常状态^[47]。研究发现,HBx 蛋白主要通过影响 DNA 甲基化、细胞增殖和恶性转化以及迁移等调控 miRNA 的表达,促进肝细胞向 HCC 转化,从而导致 HCC 发生发展。

3.4.1 影响宿主 DNA 甲基化 DNA 甲基化是一种重要的表观遗传修饰,在调控基因表达方面发挥重要作用,过度 DNA 甲基化可以导致基因沉默^[48]。有研究发现,HBx 蛋白高表达时,miR-101、miR-152 显著下调,分别使 DNA 甲基化酶 3A 和 DNA 甲基化酶 I 表达增加,而两者表达增加均能引起全基因组出现高甲基化,并进一步导致谷胱甘肽 S-转移酶 P1 及 runt 相关转录因子 3 等多种基因沉默^[49],增加 HCC 发生风险。

3.4.2 影响 HCC 细胞增殖和恶性转化 正常细胞在体内程序性死亡因子的调控下会逐渐衰老并最终凋亡,但 HCC 等肿瘤细胞却能够无限增殖,这一现象与细胞生长周期蛋白的活性密切相关。一项研究发现,HBx 蛋白在 HepG2 细胞内可引起大量 miRNA 表达变化,其中 miR-16 家族在 HepG2、SK-HEP-1 及 Huh7 肝癌细胞系中低表达^[50]。此外,HBx 蛋白能够通过下调 miR-16 家族表达从而上调原癌基因 CCNE1 的表达,并进一步导致肝细胞异常增殖,从而加速肝细胞生长和细胞周期进程,加速正常肝细胞向 HCC 转化^[51]。

3.4.3 影响 HCC 细胞迁移 HCC 患者具有高病死率的主要原因包括癌细胞的迁移和术后复发。

因此,探究其肿瘤细胞侵袭和迁移的分子机制对预防HCC恶性转化具有重要意义。研究发现,HBx蛋白调控的某些特定miRNA与HCC细胞的迁移相关。HBx蛋白能够通过NF- κ B信号通路上调miR-143表达,从而抑制纤连蛋白3B表达,致使HCC细胞更易剥离癌组织,增强其迁移和侵袭的能力^[52]。此外,HBx蛋白亦能通过上调miR-29a,从mRNA和蛋白水平降低HBx表达,促进癌细胞迁移^[53]。

3.5 促进炎症反应

多项研究表明,当HBV导致机体发生炎症反应时,HBx蛋白能够通过激活NF- κ B通路上调IL-6的转录水平^[54]。活化的IL-6能够参与激活JAK/STAT信号通路,从而使介导肿瘤侵袭和转移的基质金属蛋白酶以及促进肿瘤血管生成的血管内皮生长因子表达上调^[55]。不仅如此,激活的STAT通路还能反过来诱导IL-6等致癌炎症因子或趋化因子大量生成,如此恶性循环,最终诱发HCC^[56]。

此外,在HCC的发生过程中还有多种炎症因子参与构成HCC发生的炎性微环境,并对癌症的启动、进展和转移有重要作用。TGF- β 是HCC肿瘤微环境的重要组成成分,在HCC发展过程中扮演双重角色。在HCC早期,TGF- β 可抑制HCC细胞的增殖、侵袭和转移,而在HCC后期TGF- β 则可促进HCC细胞增殖、侵袭和转移^[57]。研究者认为TGF- β 在诱导HCC细胞凋亡的同时能够促进EGFR表达上调,触发EGF/EGFR信号通路,使HCC细胞增殖能力增强,从而抵消TGF- β 诱导的凋亡作用^[58]。同时,TGF- β 还可促使HCC细胞中干细胞因子分泌,而干细胞因子又诱导TGF- β 表达上调,进而形成TGF- β /干细胞因子自分泌循环,这是TGF- β 诱导HCC侵袭转移的重要原因^[59]。此外,在HCC晚期,TGF- β 诱导上皮-间质转化过程是HCC转移复发的另一重要途径。上皮-间质转化是细胞从上皮状态向间质状态转换的过程,该过程会增强细胞内黏附分子的表达,从而使其具有迁移和侵袭性行为^[60]。TGF- β 是HCC细胞最重要的上皮-间质转化激活剂,能刺激HCC细胞发生上皮-间质转化,进而促进HCC转移^[60]。

3.6 诱导氧化应激

大量研究发现,HBV主要通过HBx蛋白诱导肝细胞发生氧化应激。HBx蛋白定位于线粒体并

与电压依赖性阴离子通道3结合从而改变线粒体膜电位,增加内源性活性氧水平^[61];HBx蛋白还可通过钙离子信号传导途径,使钙离子积聚于线粒体,继而增加活性氧水平以及激活富含脯氨酸的酪氨酸激酶2和Src家族激酶等细胞激酶,导致转录因子NF- κ B、STAT活化,从而促进HBV复制和HCC早期发展^[62]。此外,有研究表明,当HBV感染肝细胞后,病毒复制产生的氧化应激可引起MAPK活化,激活肝星状细胞,其作为肝脏的主要结缔组织细胞,被激活后能够促进肝细胞增殖和纤维化形成,从而诱发HCC的发生^[63]。

3.7 发挥免疫抑制作用

APOBEC是近年来发现的一种具有独特抗多种病毒作用的天然免疫分子^[64]。APOBEC3作为该家族中的一员,是机体固有免疫中的重要成员,APOBEC3基因缺失会导致癌基因突变增多,增加多种肿瘤发生的风险。有研究表明,APOBEC3在HCC患者的肿瘤组织中表达增加,提示其在HCC的发生发展中发挥着重要作用^[65]。在感染HBV的HepG2细胞中过表达APOBEC3后,HBV RNA水平下降,病毒复制能力受到抑制^[66],而APOBEC3基因缺失反而会增加HBV持续感染及HCC发生的风险^[67],表明APOBEC3具有抗HBV的作用。目前研究发现,APOBEC3主要通过作用于HBV DNA中编码HBx蛋白的X区,诱导HBV DNA发生基因突变,产生羧基端截短的HBx突变体,使肝细胞的增殖能力增强,进而导致HCC发生^[68]。此外,研究者发现HBx蛋白通过上调雄性特异性致死2蛋白的表达而降解APOBEC3,从而使HBV共价闭合环状DNA在HCC细胞中的稳定性增强,促进HCC发生发展^[69]。

4 结 语

慢性HBV感染是导致肝硬化、HCC发生的重要原因。尽管大量研究已证实HBV DNA与宿主基因组整合、HBV基因组突变、HBx蛋白表达等都是诱发HCC的重要因素,但HBV诱发HCC的确切机制尚未阐明。全面探索HBV诱导HCC的分子机制将有助于揭示HCC的发生和发展过程,为临床预防和治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] THOMAS D L. Global elimination of chronic hepatitis

- [J]. *N Engl J Med*, 2019,380(21):2041–2050. DOI:10.1056/NEJMra1810477.
- [2] WANG M, WANG Y, FENG X, et al. Contribution of hepatitis B virus and hepatitis C virus to liver cancer in China north areas:experience of the Chinese National Cancer Center[J]. *Int J Infect Dis*, 2017,65:15–21. DOI:10.1016/j.ijid.2017.09.003.
- [3] LARSSON S B, TRIPODI G, RAIMONDO G, et al. Integration of hepatitis B virus DNA in chronically infected patients assessed by Alu-PCR[J]. *J Med Virol*, 2018,90(10):1568–1575. DOI:10.1002/jmv.25227.
- [4] SUNG W K, ZHENG H, LI S, et al. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Genet*, 2012,44(7):765–769. DOI:10.1038/ng.2295.
- [5] KWA W T, EFFENDI K, YAMAZAKI K, et al. Telomerase reverse transcriptase (*TERT*) promoter mutation correlated with intratumoral heterogeneity in hepatocellular carcinoma[J]. *Pathol Int*, 2020,70(9):624–632. DOI:10.1111/pin.12974.
- [6] PEZZUTO F, BUONAGURO L, BUONAGURO F M, et al. Frequency and geographic distribution of TERT promoter mutations in primary hepatocellular carcinoma [J]. *Infect Agent Cancer*, 2017,12:27. DOI:10.1186/s13027-017-0138-5.
- [7] YU J I, CHOI C, HA S Y, et al. Clinical importance of TERT overexpression in hepatocellular carcinoma treated with curative surgical resection in HBV endemic area[J]. *Sci Rep*, 2017,7(1):12258. DOI:10.1038/s41598-017-12469-2.
- [8] ZHANG H, WENG X, YE J, et al. Promoter hypermethylation of TERT is associated with hepatocellular carcinoma in the Han Chinese population[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2015,39(5):600–609. DOI:10.1016/j.clinre.2015.01.002.
- [9] SZE K M F, HO D W H, CHIU Y T, et al. Hepatitis B virus–telomerase reverse transcriptase promoter integration harnesses host elf4,resulting in telomerase reverse transcriptase gene transcription in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Hepatology*, 2021,73(1):23–40. DOI:10.1002/hep.31231.
- [10] GUERRERO R B, ROBERTS L R. The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2005,42(5):760–777. DOI:10.1016/j.jhep.2005.02.005.
- [11] EHEDEGO H, MOHS A, JANSEN B, et al. Loss of cyclin E1 attenuates hepatitis and hepatocarcinogenesis in a mouse model of chronic liver injury[J]. *Oncogene*, 2018,37(25):3329–3339. DOI:10.1038/s41388-018-0181-8.
- [12] SONNTAG R, GIEBELER N, NEVZOROVA Y A, et al. Cyclin E1 and cyclin-dependent kinase 2 are critical for initiation, but not for progression of hepatocellular carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018,115(37):9282–9287. DOI:10.1073/pnas.1807155115.
- [13] JEGAL M E, JUNG S Y, HAN Y S, et al. C-terminal truncated HBx reduces doxorubicin cytotoxicity via *ABCB1* upregulation in Huh-7 hepatocellular carcinoma cells[J]. *BMB Rep*, 2019,52(5):330–335. DOI:10.5483/BMBRep.2019.52.5.312.
- [14] LUDGATE L, LIU K, LUCKENBAUGH L, et al. Cell-free hepatitis B virus capsid assembly dependent on the core protein C-terminal domain and regulated by phosphorylation[J]. *J Virol*, 2016,90(12):5830–5844. DOI:10.1128/JVI.00394-16.
- [15] LI M, SHEN Y, CHEN Y, et al. Characterization of hepatitis B virus infection and viral DNA integration in non-Hodgkin lymphoma[J]. *Int J Cancer*, 2020,147(8):2199–2209. DOI:10.1002/ijc.33027.
- [16] 齐鲁楠,陈圆圆,陈祖舜,等. 广西地区乙肝病毒/黄曲霉毒素 B1 双暴露相关性肝细胞性肝癌微阵列比较基因组学的研究[J]. *中国癌症防治杂志*, 2013,5(3):201–210. DOI:10.3969/j.issn.1674-5671.2013.03.04.
- QI Lunan, CHEN Yuanyuan, CHEN Zushun, et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis of patients with hepatocellular carcinoma related to hepatitis B virus and aflatoxin B₁ exposure in Guangxi, China[J]. *Chinese Journal of Oncology Prevention and Treatment*, 2013,5(3):201–210. DOI:10.3969/j.issn.1674-5671.2013.03.04. (in Chinese)
- [17] PANG E, WONG N, LAI P B S, et al. Consistent chromosome 10 rearrangements in four newly established human hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *Genes Chromosom Cancer*, 2002,33(2):150–159. DOI:10.1002/gcc.1220.
- [18] LI C L, LI C Y, LIN Y Y, et al. Androgen receptor enhances hepatic telomerase reverse transcriptase gene transcription after hepatitis B virus integration or point mutation in promoter region[J]. *Hepatology*, 2019,69(2):498–512. DOI:10.1002/hep.30201.
- [19] HOSSAIN M G, MAHMUD M M, NAZIR K, et al. PreS1 mutations alter the large HBsAg antigenicity of a hepatitis B virus strain isolated in Bangladesh[J]. *Int J Mol Sci*, 2020,21(2):546. DOI:10.3390/ijms21020546.
- [20] CHEVALIEZ S, RODRIGUEZ C, POITEAU L, et al. Primary resistance of hepatitis B virus to nucleoside and nucleotide analogues[J]. *J Viral Hepat*, 2019,26(2):278–286. DOI:10.1111/jvh.13025.
- [21] 金子铮,金方方,文 凤,等. 血清 HBV DNA 前 S/

- S 区基因突变检测的回顾性临床应用研究[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 155(9): 26–30, 49. DOI: CNKI: SUN: BJMY. 0. 2019-09-004.
- JIN Zizheng, JIN Fangfang, WEN Feng, et al. The retrospective clinical study of the detection of mutations in preS/S gene using serum HBV DNA [J]. **Labeled Immunoassays and Clinical Medicine**, 2019, 155(9): 26–30, 49. DOI: CNKI: SUN: BJMY. 0. 2019-09-004. (in Chinese)
- [22] LIN C M, WANG G M, JOW G M, et al. Functional analysis of hepatitis B virus pre-s deletion variants associated with hepatocellular carcinoma[J]. **J Biomed Sci**, 2012, 19(1): 17. DOI: 10. 1186/1423-0127-19-17.
- [23] 郑羽飘, 钱宝鑫, 覃 琴, 等. 乙肝病毒 S 基因 Pre-S 区突变的人肝癌细胞 HepG2 稳定株构建及其生物学行为变化[J]. 山东医药, 2019, 59(2): 36–39. DOI: 10. 3969/j. issn. 1002-266X. 2019. 02. 009.
- ZHENG Yupiao, QIAN Baoxin, QIN Qin, et al. Construction of a stable strain of hepatitis B virus S gene mutation in Pre-S region of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and its changes in biological behavior[J]. **Shandong Medical Journal**, 2019, 59(2): 36–39. DOI: 10. 3969/j. issn. 1002-266X. 2019. 02. 009. (in Chinese)
- [24] 束 毅, 王 伟, 代 鹏, 等. 肝癌患者体内乙型肝炎病毒基因组 BCP/Pre C 区基因突变多样性分析[J]. 病毒学报, 2017, 33(1): 36–43. DOI: 10. 13242j. cnki. bingduxuebao. 003087.
- SHU Yi, WANG Wei, DAI Peng, et al. Analyses of the genetic diversities and mutations of the hepatitis B virus genome BCP/Pre C region[J]. **Chinese Journal of Virology**, 2017, 33(1): 36–43. DOI: 10. 13242j. cnki. bingduxuebao. 003087. (in Chinese)
- [25] PODLAHA O, GANE E, BRUNETTO M, et al. Large-scale viral genome analysis identifies novel clinical associations between hepatitis B virus and chronically infected patients[J]. **Sci Rep**, 2019, 9(1): 10529. DOI: 10. 1038/s41598-019-46609-7.
- [26] 徐丹丹, 张 曼, 吴黎黎. 乙型肝炎病毒基本核心启动子区 A1762T/G1764A 突变检测的意义[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(1): 32–34. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2017. 01. 011.
- XU Dandan, ZHANG Man, WU Lili. Significance of mutations detection of HBV basal core promoter region A1762T/G1764A[J]. **Laboratory Medicine and Clinic**, 2017, 14(1): 32–34. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2017. 01. 011. (in Chinese)
- [27] MUÑOZ A, CHEN J G, EGNER P A, et al. Predictive power of hepatitis B 1762T/1764A mutations in plasma for hepatocellular carcinoma risk in Qidong, China [J]. **Carcinogenesis**, 2011, 32(6): 860–865. DOI: 10. 1093/carcin/bgr055.
- [28] HUANG Y, TAI A W, TONG S, et al. HBV core promoter mutations promote cellular proliferation through E2F1-mediated upregulation of S-phase kinase-associated protein 2 transcription[J]. **J Hepatol**, 2013, 58(6): 1068–1073. DOI: 10. 1016/j. jhep. 2013. 01. 014.
- [29] GONZÁLEZ C, TABERNERO D, CORTESE M F, et al. Detection of hyper-conserved regions in hepatitis B virus X gene potentially useful for gene therapy[J]. **World J Gastroenterol**, 2018, 24(19): 2095–2107. DOI: 10. 3748/wjg. v24. i19. 2095.
- [30] SALPINI R, SURDO M, CORTESE M F, et al. SAT-195-The novel HBx mutation F30V correlates with HCC *in vivo*, hampers HBV replicative efficiency and enhances anti-apoptotic activity of HBx N-terminus *in vitro* [J/OL]. **J Hepatol**, 2019, 70(1): e716. DOI: 10. 1016/S0618-8278(19)31430-6.
- [31] SZE K M F, CHU G K Y, LEE J M F, et al. C-terminal truncated hepatitis B virus x protein is associated with metastasis and enhances invasiveness by C-Jun/matrix metalloproteinase protein 10 activation in hepatocellular carcinoma[J]. **Hepatology**, 2013, 57(1): 131–139. DOI: 10. 1002/hep. 25979.
- [32] QU L S, ZHU J, LIU T T, et al. Effect of combined mutations in the enhancer II and basal core promoter of hepatitis B virus on development of hepatocellular carcinoma in Qidong, China[J]. **Hepatol Res**, 2014, 44(12): 1186–1195. DOI: 10. 1111/hepr. 12291.
- [33] 王玉凤. HBx 蛋白与 TGF- β 致 HBV 相关性肝病的研究进展[J]. 重庆医学, 2017, 46(28): 4011–4012. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2017. 28. 044.
- WANG Yufeng. Research progress on HBV-related liver disease caused by HBx protein and TGF- β [J]. **Chongqing Medical Journal**, 2017, 46(28): 4011–4012. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2017. 28. 044. (in Chinese)
- [34] YUASA R, TAKAHASHI K, DIEN B V, et al. Properties of hepatitis B virus genome recovered from Vietnamese patients with fulminant hepatitis in comparison with those of acute hepatitis[J]. **J Med Virol**, 2000, 61(1): 23–28. DOI: 10. 1002/(SICI)1096-9071(200005)61:13. 3. CO.
- [35] RANG K Y, RAN B M, WOO C J. Integrin $\alpha 6$ as an invasiveness marker for hepatitis B viral X-driven hepatocellular carcinoma[J]. **Cancer Biomark**, 2018, 23(1): 135–144. DOI: 10. 3233/CBM-181498.
- [36] SALERNO D, CHIODO L, ALFANO V, et al. Hepatitis B protein HBx binds the DLEU2 lncRNA to sustain cccDNA and host cancer-related gene transcription[J]. **Gut**, 2020, 69(11): 2016–2024. DOI: 10. 1136/gutjnl-2019-319637.
- [37] HEUKERS R, ALTINTAS I, RAGHOENATH S, et al.

- Targeting hepatocyte growth factor receptor (Met) positive tumor cells using internalizing nanobody-decorated albumin nanoparticles[J]. **Biomaterials**, 2014,35(1):601–610. DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.10.001.
- [38] CHEN L, HU L, LI L, et al. Dysregulation of β -catenin by hepatitis B virus X protein in HBV-infected human hepatocellular carcinomas[J]. **Front Med China**, 2010,4(4):399–411. DOI:10.1007/s11684-010-0170-y.
- [39] LIU N, WANG D N, LIU H Y, et al. Potential dynamic analysis of tumor suppressor p53 regulated by Wip1 protein[J/OL]. **Chin Phys B**, 2020,29(6):068704. DOI:10.1088/1674-1056/ab84d1.
- [40] YANG W Y, RAO P S, LUO Y C, et al. Omics-based investigation of diet-induced obesity synergized with *HBx*, *Src*, and *p53* mutation accelerating hepatocarcinogenesis in zebrafish model[J]. **Cancers**, 2019,11(12):1899. DOI:10.3390/cancers11121899.
- [41] LIU N, LIU Q, YANG X, et al. Hepatitis B virus-upregulated LNC-HUR1 promotes cell proliferation and tumorigenesis by blocking p53 activity[J]. **Hepatology**, 2018,68(6):2130–2144. DOI:10.1002/hep.30098.
- [42] CHOI J H, JEONG H, JANG K L. Hepatitis B virus X protein suppresses all-trans retinoic acid-induced apoptosis in human hepatocytes by repressing p14 expression via DNA methylation[J]. **J Gen Virol**, 2017,98(11):2786–2798. DOI:10.1099/jgv.0.000958.
- [43] DU W, HU H, ZHANG J, et al. The mechanism of MAPK signal transduction pathway involved with electroacupuncture treatment for different diseases[J]. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2019, 2019:1–10. DOI:10.1155/2019/8138017.
- [44] TU W, GONG J, TIAN D, et al. Hepatitis B virus X protein induces SATB1 expression through activation of ERK and p38MAPK pathways to suppress anoikis[J]. **Dig Dis Sci**, 2019,64(11):3203–3214. DOI:10.1007/s10620-019-05681-9.
- [45] 蒲长宇,周后龙,彭亮,等. 乙型肝炎病毒X蛋白对肝癌细胞 MKK3, p38MAPK 表达的影响[J]. **现代肿瘤医学**, 2011, (4):640–644. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2011.04.06.
- PU Changyu, ZHOU Houlong, PENG Liang, et al. Influences of hepatitis B virus X protein on the expression of MKK3 and p38MAPK in hepatoma carcinoma cell[J]. **Journal of Modern Oncology**, 2011, (4):640–644. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2011.04.06. (in Chinese)
- [46] SOHEL M. Circulating microRNAs as biomarkers in cancer diagnosis[J]. **Life Sci**, 2020,248:117473. DOI:10.1016/j.lfs.2020.117473.
- [47] 姚国栋,连源,陈鹏,等. MicroRNA 在肿瘤中的研究进展[J]. **河北医药**, 2019,41(5):771–775. DOI:10.3969/j.issn.1002-7386.2019.05.035.
- YAO Guodong, LIAN Yuan, CHEN Peng, et al. Research progress of the role of MicroRNA in tumors[J]. **Hebei Medical Journal**, 2019,41(5):771–775. DOI:10.3969/j.issn.1002-7386.2019.05.035. (in Chinese)
- [48] UNNIKRISHNAN A, FREEMAN W M, JACKSON J, et al. The role of DNA methylation in epigenetics of aging[J]. **Pharmacol Ther**, 2019,195:172–185. DOI:10.1016/j.pharmthera.2018.11.001.
- [49] WEI X, XIANG T, REN G, et al. miR-101 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and induces aberrant DNA methylation by targeting DNA methyltransferase 3A[J]. **Cell Signal**, 2013,25(2):439–446. DOI:10.1016/j.cellsig.2012.10.013.
- [50] 伍刚,郑波,黄锐,等. HBx 下调 miR-16 家族表达促进肝癌细胞恶性转化[J]. **中国普外基础与临床杂志**, 2017,24(4):412–419. DOI:10.7507/1007-9424.201611043.
- WU Gang, ZHENG Bo, HUANG Rui, et al. HBx promotes hepatoma cell malignant transformation via repressing miR-16 family[J]. **Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery**, 2017,24(4):412–419. DOI:10.7507/1007-9424.201611043. (in Chinese)
- [51] WU G, YU F, XIAO Z, et al. Hepatitis B virus X protein downregulates expression of the miR-16 family in malignant hepatocytes *in vitro*[J]. **Br J Cancer**, 2011,105(1):146–153. DOI:10.1038/bjc.2011.190.
- [52] ZHANG X, LIU S, HU T, et al. Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor kappa B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression[J]. **Hepatology**, 2009,50(2):490–499. DOI:10.1002/hep.23008.
- [53] KONG G, ZHANG J, ZHANG S, et al. Upregulated microRNA-29a by hepatitis B virus X protein enhances hepatoma cell migration by targeting PTEN in cell culture model[J/OL]. **PLoS One**, 2011,6(5):e19518. DOI:10.1371/journal.pone.0019518.
- [54] LAN T, CHANG L, WU L, et al. IL-6 plays a crucial role in HBV infection[J]. **J Clin Transl Hepatol**, 2015,3(4):271–276. DOI:10.14218/JCTH.2015.00024.
- [55] HU Z, LUO D, WANG D, et al. IL-17 activates the IL-6/STAT3 signal pathway in the proliferation of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma[J]. **Cell Physiol Biochem**, 2017,43(6):2379–2390. DOI:10.1159/000484390.
- [56] QUETIER I, BREZILLON N, REVAUD J, et al. C-terminal-truncated hepatitis B virus X protein enhances the development of diethylnitrosamine-

- induced hepatocellular carcinogenesis[J]. **J Gen Virol**, 2015,96(3):614-625. DOI:10.1099/vir.0.070680-0.
- [57] 吴胜斌,王应灯. 人参皂苷 Rg1 对肾间质纤维化大鼠肾组织肝细胞生长因子及转化生长因子- β 1 的影响[J]. **中华实用诊断与治疗杂志**, 2019,33(5):422-425. DOI:10.13507/j.issn.1674-3474.2019.05.002.
- WU Shengbin, WANG Yingdeng. Effects of ginsenoside Rg1 on hepatocyte growth factor and transforming growth factor- β 1 in the kidney of rats with renal interstitial fibrosis[J]. **Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy**, 2019,33(5):422-425. DOI:10.13507/j.issn.1674-3474.2019.05.002. (in Chinese)
- [58] JI L, LIN Z, WAN Z, et al. miR-486-3p mediates hepatocellular carcinoma sorafenib resistance by targeting FGFR4 and EGFR[J]. **Cell Death Dis**, 2020,11(4):250. DOI:10.1038/s41419-020-2413-4.
- [59] YOU N, LIU W, TANG L, et al. Tg737 signaling is required for hypoxia-enhanced invasion and migration of hepatoma cells[J]. **J Exp Clin Cancer Res**, 2012,31(1):75. DOI:10.1186/1756-9966-31-75.
- [60] 刘 婷,吴俊成,陆伦根,等. STAT3加重TGF- β 1诱导的肝癌细胞上皮-间质转化的发生[J]. **肝脏**, 2018,(2):128-132. DOI:10.3969/j.issn.1008-1704.2018.02.010.
- LIU Ting, WU Juncheng, LU Lungen, et al. STAT3 aggravates TGF- β 1 induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells[J]. **Chinese Hepatology**, 2018,(2):128-132. DOI:10.3969/j.issn.1008-1704.2018.02.010. (in Chinese)
- [61] ZHANG Q, SONG G, YAO L, et al. miR-3928v is induced by HBx via NF- κ B/EGFR1 and contributes to hepatocellular carcinoma malignancy by down-regulating VDAC3[J]. **J Exp Clin Cancer Res**, 2018,37(1):14. DOI:10.1186/s13046-018-0681-y.
- [62] KUO C Y, CHIU V, HSIEH P C, et al. Chrysophanol attenuates hepatitis B virus X protein-induced hepatic stellate cell fibrosis by regulating endoplasmic reticulum stress and ferroptosis[J]. **J Pharmacol Sci**, 2020,144(3):172-182. DOI:10.1016/j.jphs.2020.07.014.
- [63] ZHOU L, YANG Y, TIAN D, et al. Oxidative stress-induced 1,N6-ethenodeoxyadenosine adduct formation contributes to hepatocarcinogenesis [J]. **Oncol Rep**, 2013,29(3):875-884. DOI:10.3892/or.2013.2227.
- [64] REN F L, LI W N, XIANG A, et al. Distribution and difference of APOBEC-induced mutations in the TpCpW context of HBV DNA between HCC and non-HCC[J]. **J Med Virol**, 2020,92(1):53-61. DOI:10.1002/jmv.25572.
- [65] LIU W, WU J, YANG F, et al. Genetic polymorphisms predisposing the interleukin 6-induced APOBEC3B-UNG imbalance increase HCC risk via promoting the generation of APOBEC-signature HBV mutations [J]. **Clin Cancer Res**, 2019,25(18):5525-5536. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-18-3083.
- [66] LIU Y, FENG J, SUN M, et al. Long non-coding RNA HULC activates HBV by modulating HBx/STAT3/miR-539/APOBEC3B signaling in HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. **Cancer Lett**, 2019,454:158-170. DOI:10.1016/j.canlet.2019.04.008.
- [67] NIK-ZAINAL S, WEDGE D C, ALEXANDROV L B, et al. Association of a germline copy number polymorphism of APOBEC3A and APOBEC3B with burden of putative APOBEC-dependent mutations in breast cancer[J]. **Nat Genet**, 2014,46(5):487-491. DOI:10.1038/ng.2955.
- [68] 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. DOI:10.1002/hep.21893.
- [69] GAO Y, FENG J, YANG G, et al. Hepatitis B virus X protein-elevated MSL2 modulates hepatitis B virus covalently closed circular DNA by inducing degradation of APOBEC3B to enhance hepatocarcinogenesis[J]. **Hepatology**, 2017,66(5):1413-1429. DOI:10.1002/hep.29316.

[本文编辑 沈 敏 余 方]