

消化系统肿瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000282

应用滚环扩增研究肝癌组织中的 HBV cccDNA

罗璇, 龙泉鑫, 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:运用滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)分离肝癌患者组织中乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)共价闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA), 研究 pre-S 区的缺失。**方法:**对 RCA 技术的特异性和灵敏度进行了研究, 并应用该技术扩增 13 对癌组织和癌旁组织中 HBV cccDNA, 对 pre-S 区的缺失进行了研究。**结果:**RCA 能够高效、特异的扩增组织中 10 拷贝/ μl HBV cccDNA; 26 例样本中, 22 例样本的 HBV cccDNA 能够被 RCA 扩增测序, 其中有 8 例样本(8/22, 36.4%) 在 pre-S 区域存在着缺失, pre-S2 缺失比例高于 pre-S1(8/8 vs. 2/8, $P=0.007$)。**结论:**首次发现肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织中 HBV cccDNA 存在着 pre-S 区的缺失, 有助于深入理解 cccDNA pre-S 区缺失与 HCC 的关系。

【关键词】乙型肝炎病毒; 乙型肝炎病毒共价闭合环状; 滚环扩增; 肝癌

【中图分类号】R512.6²; R331

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-02-25

Amplification of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in patients with hepatocellular carcinoma using rolling circle amplification

Luo Xuan, Long Quanxin, Huang Ailong, Hu Yuan

(Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To analyze the intrahepatic hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA) in hepatocellular carcinoma (HCC) patients. **Methods:** The specificity and sensitivity of rolling circle amplification (RCA) were investigated. The intra-hepatic HBV cccDNA in 13 pairs of tumor and adjacent non-tumor tissues were amplified by RCA and pre-S deletions were determined by sequencing. **Results:** The HBV cccDNA (10 copy/ μl) could be amplified specifically by RCA. Among 26 samples, the HBV cccDNA in 22 tissues were amplified successfully, and the pre-S deletions were identified in 8 samples (8/22, 36.4%). In addition, the rate of pre-S2 deletion was higher than that of pre-S1 (8/8 vs. 2/8, $P=0.007$). **Conclusion:** The pre-S2 deletion of HBV cccDNA is first identified in hepatocellular carcinoma patients, which would be benefit for understanding the relationship between cccDNA pre-S deletion and HCC.

【Key word】 hepatitis B virus; covalently closed circular DNA; rolling circle amplification; hepatocellular carcinoma

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染可导致慢性肝炎(chronic hepatitis B, CHB), 增加了罹患肝硬化、肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的可能性^[1]。HBV 共价闭合环状 DNA(covalently closed circular, cccDNA)不仅是 HBV DNA 复制转录的模板和 HBV 持续感染的关键因素, 研究表明 CHB 发展到晚期, 其病毒复制水平下降, 但 cccDNA 成为肝组

织中 HBV DNA 的主要存在形式^[2]。而目前对 HCC 中 HBV cccDNA 的研究主要集中于 cccDNA 拷贝数的检测^[3], 而未见有针对 cccDNA 缺失的相关研究。本文应用滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)从肝组织中特异高效地扩增出 HBV cccDNA, 并研究了 cccDNA 序列中 pre-S 区的缺失, 为深入理解 HBV cccDNA pre-S 区的缺失在 HCC 的发生机制中的作用奠定了基础。

1 对象与方法

1.1 临床研究对象

从重庆医科大学附属第一医院感染科获得 13 对 HCC

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: 81101310); 教育部博士点新教师基金资助项目(编号: 20115503120001); 重庆市教委转化成果课题资助项目(编号: Kjzh11201)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000282.html>

及癌旁的组织样本,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。

1.2 主要试剂

质粒抽提试剂盒和胶回收试剂盒(德国 QIAGEN 公司), (Promega 公司), 荧光定量 PCR 试剂(美国 ABI 公司), Phi29 酶(New England Biolabs 公司), PSAD 酶(美国 Epicentre 公司), Premix Taq™ 酶和 PMD19-T 载体(TaKaRa 公司), PCR 产物纯化试剂盒(Roche 公司), 引物和探针由上海英俊公司合成, MEM 培养基(Hyclone 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞与组织中 HBV cccDNA 提取 HepAD38 细胞中 HBV cccDNA 的提取参考文献[4],略有改动。采用裂解液(10 mmol/L Tris pH=7.5, 10 mmol/L EDTA, 0.6% SDS)裂解细胞后, 4℃过夜。然后 14 000 g 离心 30 min, 用 Tris-酚-酚-异丙醇-氯仿(25:24:1)、异丙醇-氯仿(24:1)混合液抽提, 乙醇沉淀后 PSAD 酶处理得到 cccDNA。

取 HCC 病人的癌组织和癌旁组织约 10 mg, 采用 Promega 公司的肝组织 DNA 的提取试剂盒提取肝组织中的 DNA, 取 2 μl DNA 用 PSAD 酶 37℃处理 3 h, 以降肝组织中线性和单链环状的 HBV DNA, 从而得到 HBV cccDNA。

1.3.2 荧光定量 PCR(探针法)测定细胞中 cccDNA 含量 由于 HBV 负链 DR1 和 DR2 区域之间存在缺口, 因此本研究采用了荧光定量探针法来特异性检测 HBV cccDNA^[5], 以含有 HBV 基因全长的 PCH9 质粒为标准品, 倍比稀释为 9 个浓度(10⁰~10⁸ 拷贝/μl), 特异性引物和探针序列见表 1。荧光定量 PCR 条件: 95℃预变性 10 min, 随后 40 个循环, 98℃变性 10 s, 58℃退火 5 s, 62℃退火 10 s, 72℃延伸 20 s。

1.3.3 RCA HBV cccDNA 采用 RCA 方式来特异性扩增细胞和肝组织中的 HBV cccDNA^[6]。样本中提取的 DNA 首先经过 PSAD 酶处理后特异性降解 HBV 松弛的 RC DNA 和单链 DNA, 然后在 10 μl 体系中加入 2 μl DNA 和 0.25 μmol/L 的 RCA 引物混合物(表 1)。变性条件: 98℃ 3 min, 50℃ 15 s, 30℃ 15 s, 20℃ 10 min, 置冰上, 再加入含有 10 U 的 Phi29 DNA 聚合酶及 0.25 μmol/L 的引物混合物和 0.4 mg/ml 的 BSA, 4 mmol/L 的 DTT 共计 10 μl 反应液, 在 30℃条件下反应 19 h, 然后以 RCA 反应产物为模板, P1 和 P2 引物^[6]全基因组 PCR 扩增 HBV cccDNA 全序列: 98℃ 10 s, 66℃开始退火 15 s, 每个循环降 1℃, 7 个循环; 然后 40 个循环: 98℃ 10 s, 60℃ 15 s, 72℃下延伸 190 s。

1.3.4 pre-S 区段测序 有文献报道 HCC 中 HBV DNA pre-S 区域的缺失主要在 pre-S1 的 3' 端和 pre-S2 的 5' 端^[7], 以样本中分离得到的 HBV cccDNA 为模板, 经 RCA 和 PCR 得到的 HBV pre-S3113-270 区段 DNA, 纯化后按说明书连接到 T 载体, 送上海英俊公司测序。

1.4 统计分析学处理

数据采用 SPSS 19.0 统计软件处理。计数资料采用率表示, 缺失率比较采用 Fisher 确切概率法, 检验水准 α=0.05。

表 1 RCA 和荧光定量探针法的引物和探针

Tab.1 HBV-specific primers and probe used for RCA and PCR

引物或探针	序列(5'-3')	位置
RCA引物		
RCA1	AATCCTCACAATA*C*C	226~240
RCA2	GATGGGATGGGAA*T*A	615~601
RCA3	CCTATGGGAGTGG*G*C	637~651
RCA4	GCAACGGGGTAAA*G*G	154~1 140
RCA5	ATGCAACTTTTTC*A*C	814~1 828
RCA6	TCCAAATTCCTTA*T*A	1 930~1 916
RCA7	TAGAAGAAGAACT*C*C	368~2 682
RCA8	AGAATATGCTGAC*C*C	2 828~2 814
基因组 PCR 引物		
P1	cgggaaagcttgACTTTTTCACCTCTGCCT AATC	819~1 840
P2	cgggaaagcttgctAAAAAGTTGCATGCTG CTGG	823~1 804
pre-SFP	TGGGGTGGAGCCCT- CAVGCTCAGGGC	3 113~3 138
pre-SRP	AGAGAAGTCCACCACGACTCTA- GACTC	270~244
荧光定量 PCR 引物和探针 (HBV cccDNA)		
HBV cccFP	CTCCCCGTCTGTGCCTTCT	1 548~1 566
HBV cccRP	GCCCCAAAGCCACCCAAG	1 903~1 886
HBVcccDNA 探针	FAM- ACGTCGCATGGAGACCAC- CGTGAACGCC- TAMRA	1 603~1 630

注: * 表示该位点碱基进行硫代修饰

2 结果

2.1 RCA 的特异性

由于 RCA 反应只能扩增闭合环状的 DNA, 因此本研究采用 hepAD38 细胞提取的病毒颗粒和 hirt DNA 法提取的 cccDNA 进行验证。图 1A 表明 RCA 能够扩增 HBV 闭合环状的 cccDNA, 而细胞病毒颗粒中的 HBV DNA (含有带有缺口的 HBV RC DNA 和单链 DNA, 未含有 cccDNA^[8]) 不能被扩增; RCA 产物经过 HBV 全基因组 PCR 能够扩增出 3 200 bp 左右的条带(图 1B), Southern blot 表明 RCA 产物经过 Spe I 酶切或全基因组 PCR 为 HBV 全基因组^[6](图 1C)。

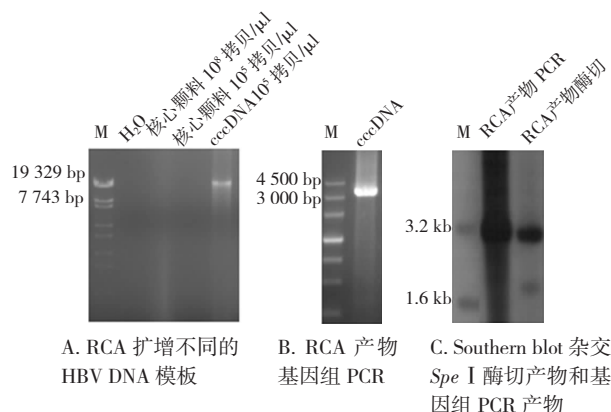


图 1 RCA 特异性

Fig.1 Specificity of RCA

2.2 RCA 的灵敏度

HBV 感染细胞后其 cccDNA 含量较低,因此本研究进一步研究了 RCA 是否能够扩增样本组织中少量的 cccDNA;采用荧光定量 PCR(探针法)检测了 HepAD38 中提取的 cccDNA,其浓度为 2.56×10^6 拷贝/ μl ,10 倍稀释成不同拷贝数的样本 ($10^5 \sim 10^0$ 拷贝/ μl),以此为模板进行 RCA 反应,图 2 表明 RCA 反应可检测低至 10 拷贝/ μl 的模板。

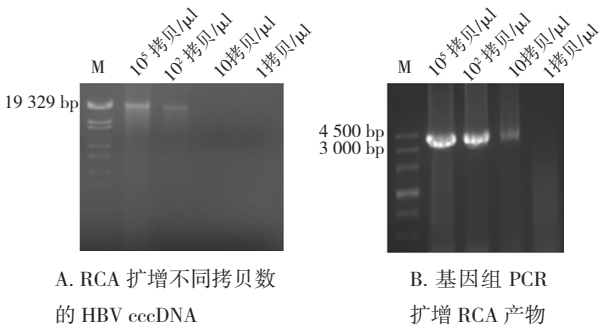


图 2 RCA 灵敏度
Fig.2 Sensitivity of RCA

2.3 RCA 特异性扩增 HCC 组织及癌旁组织中 HBV cccDNA

在对 13 对 HCC 病人的癌组织和癌旁组织中的 cccDNA 进行 RCA 和 gPCR 扩增后,22 例样本 (84.6%,22/26) 中的 cccDNA 能够被有效扩增(图 3),而其余 4 例样本由于组织中 cccDNA 含量很低而不能被扩增出来。此外这些样本中 HBV DNA 直接通过 gPCR 未能有效扩增,表明 RCA 扩增的 3.2 kb 的条带来自于肝组织中的 HBV cccDNA,而不是 RC DNA。

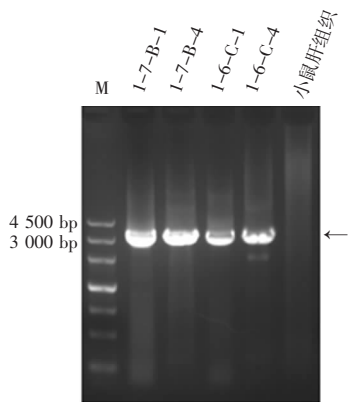


图 3 临床病人癌组织与癌旁组织 RCA 扩增
Fig.3 Tumor and adjacent non-tumor tissues amplified by RCA

2.4 肝组织中 HBV cccDNA pre-S 缺失

由于 pre-S 区缺失与 HCC 密切相关,进一步分析了 HCC 肝组织中 HBV cccDNA pre-S 的缺失。以 HBV cccDNA 的 RCA 扩增产物为模板经 pre-S 引物(表 1)扩增后电泳表明不同样本中存在着该区域的缺失(图 4);进一步测序证实在这 22 例样本中,共有 8 例 (36.4%) 在 pre-S 区域存在着缺失,其中 pre-S2 缺失比例高于 pre-S1 (8/8 vs. 2/8, $P=0.007$)。

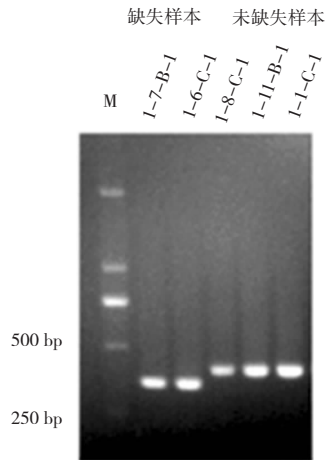


图 4 临床样本中 PreS 区缺失
Fig.4 preS deletion in HCC

表 2 HBV 感染的 HCC 肝组织中 cccDNA pre-S 区的缺失			
Tab.2 cccDNA pre-S deletion in HBV-related HCC			
样本编号	样本类型	缺失类型	缺失区域
1-7-B-1	癌组织	PreS2	5~55
1-7-B-4	癌旁组织	PreS2	1~44
1-6-C-1	癌组织	PreS2	8~57
1-6-C-4	癌旁组织	PreS2	8~57
1-7-C-1	癌组织	PreS1+ PreS2	3 201~3 215, 1~45
1-7-C-4	癌旁组织	PreS1+PreS2	3 201~3 215, 1~45
1-13-B-1	癌组织	PreS2	15~56
1-13-B-4	癌旁组织	PreS2	15~56

3 讨论

HBV cccDNA 在病毒感染中和 HCC 发生中起着重要的作用,对其全序列的研究有助于深入理解其发病机制。传统 Southern blot 的方法可对 cccDNA 进行定性检测,但是操作较复杂;而经典的跨双缺口 PCR 检测 HBV cccDNA 尚不能完全区分 RC DNA 和 cccDNA,且通常经过 PCR 之后得到的基因组在细胞培养中将不再具备复制能力^[4],说明在 PCR 的过程中发生了一些导致无法复制的突变。最近发展的 RCA 技术是一种恒温核酸扩增方法,以闭合环状 DNA 为模板,通过多对短的 DNA 引物,在 phi29 酶作用下高效扩增形成首尾相联的多联体^[9]。Séverine 等^[6]首次用 RCA 扩增出 HBV cccDNA,同本研究也证实了 RCA 只能选择性扩增闭合环状的 cccDNA,即便是高拷贝 (10^8 拷贝/ μl) 的 RC DNA 也不能被 RCA 扩增。此外,即使在高背景下 (RC DNA:cccDNA=7:1 比例混合),cccDNA 经过 RCA 仍有条带(数据未列

出),并可检测到 10 拷贝/ μl 。由于肝细胞中的 cccDNA 含量较低(1~50)拷贝/ μl ^[10],因此应用 RCA 可以高效特异地扩增肝组织中少量的 HBV cccDNA。

HBV 感染引起 HCC 的致病因子一直是国内外研究的热点和重点,其中 pre-S1 和 pre-S2 区的缺失与 HCC 显著相关^[11-12],其机制主要是 pre-S 区的缺失引起包膜蛋白在内质网的积累引起内质网压力反应,从而导致 DNA 损伤和基因组的不稳定,发展成 HCC^[12]。本研究首次发现肿瘤组织中 HBV cccDNA 同样存在着 pre-S 区的缺失,同时在癌旁组织同样出现这样的缺失,这与之前报道的在非 HCC 的慢性 HBV 感染者血清中同样出现 HBV pre-S 缺失但比率明显较 HCC 低^[7,11]的情况不一致,其原因可能有 2 点:(1)本研究用的是同一 HCC 病人的癌旁组织为对照,而文献报道用的是不同病人的 CHB 样本;(2)本研究检测是在 cccDNA 水平上,可能与血清中的结果不一致。由于 HBV cccDNA 编码 HBV 所有的 RNA,这种缺失有可能造成病毒分泌的功能性障碍,并造成血清中 HBV DNA pre-S 区的缺失,将进一步研究 HBV cccDNA 这种缺失对病毒功能的影响。

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] Wong DK, Yuen MF, Yuan H, et al. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients[J]. Hepatology, 2004, 40(3): 727-737.
- [3] 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.
- [4] Gao WF, Hu JM. Formation of hepatitis B virus covalently closed

circular DNA: removal of genome-linked protein[J]. J Virol, 2007, 81(12): 6164-6174.

- [5] Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy[J]. Gastroenterology, 2004, 126(7): 1750-1758.
- [6] Séverine M, Sandra CD, 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.
- [7] Yeung P, Wong DK, Lai CL, et al. Association of hepatitis B virus pre-S deletions with the development of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B[J]. J Infect Dis, 2011, 203(5): 646-654.
- [8] Köck J, Rösler C, Zhang JJ, et al. Generation of covalently closed circular DNA of hepatitis B viruses via intracellular recycling is regulated in a virus specific manner[J]. PLoS Pathog, 2010, 6(9): e1001082.
- [9] Annabel R, Ruth T, Marc VR. A Sequence-independent strategy for detection and cloning of circular DNA virus genomes by using multiply primed rolling-circle amplification[J]. J Virol, 2004, 78(10): 4993-4998.
- [10] Wong DK, Huang FY, Lai CL, et al. Occult hepatitis B infection and HBV replicative activity in patients with cryptogenic cause of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2011, 54(3): 829-836.
- [11] Fang ZL, Sabin CA, Dong BQ, et al. Hepatitis B virus pre-S deletion mutations are a risk factor for hepatocellular carcinoma: a matched nested case-control study[J]. J Gen Virol, 2008, 89(11): 2882-2890.
- [12] Huang HP, Hsu HY, Chen CL, et al. Pre-S2 deletion of hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma in children[J]. Pediatr Res, 2010, 67(1): 90-94.
- [13] Hsieh YH, Su IJ, Wang HC, et al. Pre-S mutant surface antigens in chronic hepatitis B virus infection induce oxidative stress and DNA damage[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(10): 2023-2032.
- [14] Günther S, Sommer G, Von Breunig F, et al. Amplification of full-length hepatitis B virus genomes from samples from patients with low levels of viremia: frequency and functional consequences of PCR-introduced mutations[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(2): 531-538.

(责任编辑:冉明会)

《重庆医科大学学报》邮发代号:78-132