

消化系及腹部疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000555

隐匿性乙肝与肝细胞肝癌关系的研究进展

郑 洁, 曾爱中

(重庆医科大学附属第一医院感染科、重庆市传染病寄生虫病学重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】慢性乙肝是肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)发生的主要危险因素已是公认的定论,那么隐匿性乙肝(occult hepatitis B virus infection, OBI)与 HCC 的相关性如何,却尚有争议。此文综合国内外临床和动物研究结果,总结出:OBI 是 HCC 发生的重要危险因素。OBI 保留有显性乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染相同的致癌机制,如整合进宿主基因组,顺式激活相关基因或合成蛋白后反式作用于基因组或相关蛋白质,如合成乙肝病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X antigen, HBX)、前 S 蛋白和乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg),这些蛋白可使肝细胞发生转化,影响信号通路,使细胞增殖、凋亡失衡。其次,持续存在的低载量病毒可导致轻微但持续的炎症坏死,肝细胞循环坏死、再生,加速肝硬化进程,最终导致 HCC。最后,病毒突变及甲基化修饰在 HCC 发生中也有重要作用。

【关键词】肝细胞肝癌;隐匿性乙肝;致癌机制

【中图分类号】R512.6

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-11-04

Research progress in the relationship between occult hepatitis and hepatocellular carcinoma

Zheng Jie, Zeng Aizhong

(Department of Infectious Diseases, Key Laboratory of Infectious and Parasitic Diseases in Chongqing, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】It's certain that chronic hepatitis B is a main risk factor for hepatocellular carcinoma (HCC). However, it's uncertain whether occult hepatitis B virus infection (OBI) can result in HCC. We draw the conclusion that OBI is an important risk factor for HCC after reviewing literature at home and abroad. OBI maintains the same carcinogenic mechanisms as overt hepatitis B virus (HBV) infection; for example it also can cis-activate genome by integrating into the host genome, or trans-act to genome/protein by synthesizing hepatitis B virus X antigen, preS, and hepatitis B surface antigen, which can impact signal path and induce the imbalance between proliferation and apoptosis. Secondly, the persistence of low level of HBV can induce slight and continuous necro-inflammation. It's a cycle of necrosis and regeneration, which can lead to cirrhosis and HCC. Finally, mutation and methylation also play important roles in HCC.

【Key words】hepatocellular carcinoma; occult hepatitis B virus infection; pathogenic mechanism

1 介绍

全世界至少有 20 亿人感染过乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV),其中至少 2.4 亿人成为慢性 HBV 感染。肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)每年新发病例超过 60 万

例,是全世界第五常见的肿瘤,在男性中,其病死率继肺癌之后已跃居第二^[1],超过 80%发生在非西方国家,其主要危险因素有慢性病毒感染、酒精、铁超载、黄曲霉素 B1、霉菌毒素、代谢因素。在 HBV 流行地区,大多数 HCC 由 HBV 感染引起。HCC 在乙肝流行的国家如东南亚、撒哈拉以南非洲发生率更高。HBV 已被 WHO 列为人类主要致癌物质之一。然而,在临床中可能忽略了隐匿性乙肝(occult hepatitis B infection, OBI),即 HBV 的脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)以低载量存在于血液或肝组织中,但检测乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)阴性,故 OBI 也是导致 HCC 发生的重要因素。

多个研究表明 OBI 可能会导致肝硬化和(或)进一步的

作者介绍:郑 洁, Email: 1024625292@qq.com

研究方向:乙肝的相关性研究。

通信作者:曾爱中, Email: aizhong9@sina.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30972587)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150310.2150.008.html>
(2015-03-10)

HCC。本文就 OBI 在 HCC 中的作用及其机制做一综述。

2 OBI

早在 20 世纪 70 年代 OBI 已被认识到,但是直到 1999 年 1 篇有里程碑意义的研究发表后其才被广泛认识。检测技术的进步,如通过实时聚合酶链反应(real time-polymerase chain reaction,RT-PCR)和逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction,RT-PCR)技术,对总 HBV DNA、共价闭合环状 DNA(covalently closed circle deoxyribonucleic acid,cccDNA)、前基因组核糖核酸(pre-genomic ribonucleic acid,pgRNA)的量都可以比较准确地估计,这明显促进了 OBI 的研究^[6]。如前所述,OBI 的特点是 HbsAg 阴性,在肝组织中有 HBV-DNA(无论血液是否检测到 HBV-DNA),典型的 OBI 其病毒复制活性被强烈地抑制^[7]。它可以进一步被分为血清学阳性和阴性。血清学阳性是乙肝核心抗体(hepatitis B core antibody,HBcAb)阳性,伴或不伴乙肝表面抗体(Hepatitis B surface antibody,HBsAb)阳性,然而,血清学阴性是两者皆阴性。在 HBcAb IgG 阳性者中 HBV DNA 检出率最高,提示 HBcAb 与 OBI 有明显的相关性。另外 30%~50%除了 HBV-DNA 外,血清学标志物全阴性^[2]。

OBI 的流行情况各地不同,与所使用检测方法的灵敏度和特异性不同有一定关系。

有很多机制已经被提出,以解释 OBI 的存在^[3,9-10]。首先,cccDNA 的持续存在和肝细胞的长半衰期使 HBV 可以终生存在于宿主体内。第二,有时 HBV-DNA 可在急性 HBV 感染后,HBsAg 血清转化为 HBsAb 后在肝组织中被检测到。这些病人多有特异性 IgM 抗体。第三,HBV preS/S 区突变是 HBV 感染者中检测不到 HBsAg 原因之一。HBsAg 重要免疫显性区中亲水区的突变可降低免疫识别,即抗原表位改变,转录调控区、编码聚合酶的区等区域突变,如 Y100C 位点替换,可使病毒复制能力低下和减少 HBsAg 表达、分泌,S 基因 G458A、G145R、126aa 和 130aa 突变影响信使 mRNA 拼接、输出,DNA 折叠,导致 HBsAg 不表达,前 S1 区缺失影响病毒包装,HBsAg 滞留在内质网中。前 C/C 区突变抑制病毒复制。

第四,HBsAg/HBsAb 免疫复合物的形成可影响 HBsAg 的检测。第五,宿主因素如免疫因素,体液免疫和细胞免疫作用于病毒外壳蛋白是主要机制,所以免疫抑制时病毒可以再度活跃。第六,共感染因素,如丙肝病毒(hepatitis C virus,HCV)共同感染时可加速 HBsAg 的清除,抑制 HBV DNA 复制,HCV RNA 与 HBV DNA 是负相关的关系,可能是其核心蛋白通过丝氨酸 116 和 99 的磷酸化起作用的,其阻止多聚酶与 HBV DNA 序列的结合、抑制 mRNA 的合成、抑制 pgRNA 的衣壳化。第七,检测 HBsAg 的技术灵敏度和特异性不高。

3 丙肝抗体(hepatitis C virus antibody,HCVAb)阴性 HCC 患者中 OBI 情况

表 1 中近年的 7 个回顾性研究中^[6,8,11-13,15-16],隐源性 HCC 患者中,OBI 流行率为 30.77%到 76.2%。HCC 中 OBI 的流行均明显高于对照组。

2 个前瞻性研究^[6,14],OBI 者发生 HCC 的风险明显高于对照组,并且在多变量分析中,OBI 是 HCC 发生的独立危险因素。

在土拨鼠模型中,HsAg 阴性的土拨鼠,肝组织中持续低水平的病毒血症可以导致连续的肝损害和 HCC 的发生^[5-24]。

综上,在回顾性研究中,HCC 与非 HCC 相比,前者有更高的 OBI 流行。相应地,在前瞻性研究中,OBI 中 HCC 的发生率明显高于 HBV-DNA 阴性者。这和 Shi 等^[25]的 Meta 分析结论是相似的,OBI 是 HCC 发生的重要危险因素。OBI 特别是合并其他损伤因素如 HCV 感染、酗酒时,会加重肝脏损伤^[14,20]。

4 OBI 作为 HCC 危险因素可能涉及的机制

HBV 相关性 HCC 是由直接和间接机制协调作用导致的。

首先,间接机制:通过免疫介导的机制,细胞毒性 T 淋巴细胞特异性直接杀伤表面有病毒抗原的肝细胞,也有自然杀伤细胞、中性粒细胞、活化的淋巴细胞炎症趋化的固有免疫

表 1 HCC 中 OBI 流行率回顾性研究

Tab.1 Prevalence of OBI in patients with and without cryptogenic HCC

研究	年份	国家	标本	HCC 中 OBI 流行率 (%)	对照组 OBI 流行率 (%)	P 值
李庆安等 ^[11]	2012	中国	血清	30.77(16/52)	3.33(2/60)	$\chi^2=15.55, P<0.001$
Wong 等 ^[6]	2011	中国	肝组织	72.7(24/33)	无	无
Hassan 等 ^[12]	2011	埃及	肝组织	76.2(16/21)	无	无
Fang 等 ^[8]	2009	中国	血清	70.4(95/135)	10.6(38/359)	$\chi^2=89.24, P<0.001$
Chen 等 ^[13]	2009	中国	血清	40.5(90/222)	8(24/300)	$\chi^2=79.15, P<0.001$
Pollicino 等 ^[15]	2004	意大利	肝组织	67.6(23/34)	17.9(7/39)	$\chi^2=18.53, P<0.001$
Yotsuyanagi 等 ^[16]	2000	日本	血清	47.6(20/42)	2.4(1/42)	$\chi^2=22.92, P<0.001$

作用,同时这些炎症细胞释放细胞因子和趋化因子。OBI 引起的轻微但持续的炎症会导致反复的细胞死亡和再生,打破了肝细胞增生、分化、凋亡之间的生理平衡,这会增加肝细胞增殖(高细胞增殖指数是 HCC 发生的危险因素)和不典型增生,因此导致纤维化、肝硬化和产生一个致突变的环境^[19,21]。

直接机制:OBI 是 HBV 感染后自然病程之一,一些 HCC 患者肝内总的 HBV DNA、cccDNA 和 HBV 转录活性与一些乙肝 e 抗原(hepatitis B virus e antibody, HBeAg)阴性乙肝相关性 HCC 没有明显差别。OBI 保留了经典 HBV 感染后致癌机制^[5,7,17-18,22-23]。Patricia 等的研究结果第一次证明即使血清标志物阴性,非常少量的嗜肝 DNA 病毒持续存在,都会整合到宿主肝细胞和免疫细胞基因组,保留致癌潜力。

OBI 中 HBV 也整合进宿主基因组,85%~90%HBV 相关的 HCC 中可以发现 HBV-DNA 的整合,大多数整合发生在脆性位点、重复区及保守区,如定位于有分区缺陷的 γ 同源基因 6(partitioning-defective-6-homolog-gamma gene, PARD6G)的上游和与 HBV X 区相关的肌浆网/内质网 Ca^{2+} -ATP 酶 1 (Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 1, SERCA1) 编码基因中 cis 基因,整合可改变宿主的基因表达和细胞表型,可反式激活肿瘤发生的信号通路,促进增殖,抵抗生长抑制,浸润组织和转移,血管生成(HBxAg 可引起血管内皮生长因子的过度表达),改变代谢,抵抗凋亡,如 HBV preS/S 在 3' 端缩短后整合入宿主基因,编码中表面蛋白,可以反式激活 c-myc, c-fos and c-Ha-ras 致癌基因,羧基端缩短的 HBx 和大/中表面蛋白通过蛋白-蛋白相互作用引起启动子、增强子转录激活或与抑癌基因 p53 结合,促进恶变转化,也可活化 Src/PI3K/Akt、c-Raf-1/MEK/Erk2 信号转导通路或通过抑制细胞凋亡蛋白酶-3 和依赖 Fas 抗体的细胞凋亡及妨碍 DNA 修复机制。另外 HBV-细胞周期素 A 整合,端粒酶反转录酶基因位点的整合,宿主基因重排后可以增加宿主的染色体不稳定性,导致染色体缺失(常在相同的位点发生,包括 1p、2q、4q、5q、6q、8p、10q、11p、16p、16q、17p 和 22q)、染色体易位、组蛋白结构及其修饰的动态变化在调控 HBV 转录和翻译中也起重要作用。HBxAg 表达一方面可通过转录上调 p1, 4-半乳糖基转移酶-I 来诱导细胞周期进展,另一方面还可通过下调 notch1 基因所表达蛋白的信号活性来钝化衰老样生长抑制相互作用而抑制其活性。有报道称,5 种 HBxAg 诱导的高表达蛋白上调基因 urg4/7/11/12 表达的蛋白(upregulated gene 4/7/11/12 expressed protein,URG4/7/11/12)和 sui1 基因表达的蛋白质(sui1 gene expressed protein, Sui1)中,urg4 和 urg11 是癌基因,能够促进肿瘤生长;URG7 具有抵抗 Fas 介导细胞凋亡的作用;URG12 是核糖体蛋白,而 Sui1 是转录起始因子,两者对于蛋白翻译的完整性非常重要,在肝炎和肝硬化阶段血清中即已出现 3 个或 3 个以上抗 URG 阳性的患者,具有发展成为 HCC 患者的高风险性,应例行血清学和影像学检查,尽早进行干预和有效的治疗。

HCC 中的有些 OBI 和病毒变异有关^[3,10,13,25]。HCC 组较慢性 HBV 感染者有更多发生核心启动子和前 S 区突变,主要集中在前 S1 的 C 端和前 S2 的 N 端,如 T1762A、G1764A、A2962G、G1721A、M1I、Q2K、S 区密码子 182 核苷酸,导致氨基酸改变 K130M、V131I 和 T105C 后,形成的毛玻璃肝细胞,其大乙肝表面蛋白沉积在细胞边缘,HBsAg 滞留在内质网中,使内质网肿胀、氧化应激、DNA 损伤、染色体不稳定,环氧合酶 2 和细胞周期素 A 过度表达,病毒复制活性较野生型高,或者 X 突变菌株,突变后上调 Wnt-5a 基因,激发细胞增殖,决定肿瘤性转化,没有了野生型凋亡和抗增生的作用,所有这些缺失包含 T 和 B 细胞的表位,其中 B 细胞表位在前 S2 第 1~6 位氨基酸处缺失和分泌功能区的缺失与 HCC 密切相关。这些突变基因被推荐为 HCC 合并 OBI 有用的病毒学标志物。

HCC 合并 OBI 和非 OBI 比较,前者有更高频率的 HBV 高甲基化,而且这有可能导致 HBsAg 不表达。此外,HBV 基因组在 HCC 合并 OBI 较非肿瘤性肝组织表现出更高的甲基化水平。因此,HBV 基因组在不连续的由磷酸酯键连接的胞嘧啶鸟嘌呤密集区(region full of connecting cytosine and guanine by phosphoester bond, CpG)位点高甲基化在 HCC 的发生中起重要作用,那个位点在隐匿性疾病肿瘤细胞中循环甲基化。因此,提出 DNA 甲基化酶的补充连同 cccDNA 微型染色体和组蛋白的后天修饰会明显抑制 OBI 病毒的转录和复制。HBV DNA CpG 岛的甲基化可以上调基因表达^[7],HBV DNA 有 3 个 CpG 岛,分别是横跨 S、X 和多聚酶区的 ATG 位点。HBxAg 可以通过抑制微小 RNA(micro-ribonucleic acid 152, miR-152)诱导 DNA 甲基化转氨酶(deoxyribonucleic acid methyltransferase, DNMT)1 表达,miR-152 可以 DNMT1 RNA3' 端为靶点,引起 mRNA 和蛋白水平明显降低。HBxAg 过度表达可引起 DNMT1 和 DNMT3A 升高。HBV 感染细胞及 HCC 细胞中 DNMT1、DNMT3A 和 DNMT3B 升高。

5 结 论

正如上述讨论的,在大多数调查的研究中,尤其是来自亚洲,OBI 会增加 HCC 的发生率。尽管关于 OBI 和 HCC 的关系研究了十多年,关于 OBI 在 HCC 发生中的作用的知识仍是有限的,而且被现在的治疗和检测方法所混淆。这样,关于发病机理和临床意义仍有很多没有解答的问题。流行病学研究和分子学研究提供了对 OBI 更多的理解,但是 OBI 在 HCC 发生中的作用仍需要更多的前瞻性研究。

参 考 文 献

- [1] Croagh CM, Lubel JS. Natural history of chronic hepatitis B: Phases in a complex relationship[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20 (30): 10395-10404.

- [2] Shi Y, Wu YH, Wu W, et al. Association between occult hepatitis B infection and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. *Liver Int*, 2012(32): 231–240.
- [3] Huang X, Hollinger FB. Occult hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma: a systematic review[J]. *Journal of Viral Hepatitis*, 2014, 21(3): 153–162.
- [4] Squadrito G1, Cacciola I, Alibrandi A, et al. Impact of occult hepatitis B virus infection on the outcome of chronic hepatitis C[J]. *J Hepatol*, 2013, 59(4): 696–700.
- [5] Mulrooney-Cousins PM, Chauhan R, Churchill ND, et al. Primary seronegative but molecularly evident hepadnaviral infection engages liver and induces hepatocarcinoma in the woodchuck model of hepatitis B[J]. *Plos Pathogens*, 2014, 10(8): e1004332.
- [6] 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.
- [7] Jaime Morales-Romero, Gustavo Vargas, Rebeca García-Román. Occult HBV infection: a faceless enemy in liver cancer development[J]. *Viruses*, 2014, 6(4): 1590–1611.
- [8] Fang Y, Shang QL, Liu JY, et al. Prevalence of occult hepatitis B virus infection among hepatopathy patients and healthy people in China[J]. *J Infect*, 2009, 58(5): 383–388.
- [9] Pollicino T, Saitta C. Occult hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(20): 5951–5961.
- [10] Kim YS. Definition, diagnosis, and prevalence of occult hepatitis B virus infection[J]. *Korean J Gastroenterol*, 2013, 62(3): 143–147.
- [11] 李庆安, 肖清华, 刘建湘. 隐匿性 HCC 肝硬化与隐匿型乙型肝炎感染关系比较[J]. *中国医药导刊*, 2012, 14(10): 1672–1675.
- [12] Hassan ZK, Hafez MM, Mansor TM, et al. Occult HBV infection among Egyptian hepatocellular carcinoma patients[J]. *Virol J*, 2011, 8(1): 90.
- [13] Chen CH, Changchien CS, Lee CM, et al. A study on sequence variations in pre-S/surface, X and enhancer II/core promoter/precore regions of occult hepatitis B virus in non-B, non-C hepatocellular carcinoma patients in Taiwan[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(3): 621–629.
- [14] Ikeda K, Kobayashi M, Someya T, et al. Occult hepatitis B virus infection increases hepatocellular carcinogenesis by eight times in patients with non-B, non-C liver cirrhosis: a cohort study[J]. *J Viral Hep-*
- at*, 2009(16): 437–443.
- [15] Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, et al. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case of occult HBV infection[J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(1): 102–110.
- [16] Yotsuyanagi H, Shintani Y, Moriya K, et al. Virologic analysis of non-B, non-C hepatocellular carcinoma in Japan: frequent involvement of hepatitis B virus[J]. *J Infect Dis*, 2000, 181(6): 1920–1928.
- [17] Chen L, Zhao H, Yang X, et al. HBsAg-negative hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma[J]. *Discov Med*, 2014, 18(99): 189–193.
- [18] Lee JJ, Kwon OS. Occult hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma[J]. *Korean J Gastroenterol*, 2013, 62(3): 160–164.
- [19] Loredana Covolo, Teresa Pollicino, Giovanni Raimondo, et al. Occult hepatitis B virus and the risk for chronic liver disease: A meta-analysis[J]. *Digestive and Liver Disease*, 2013, 45(3): 238–244.
- [20] Hiroki Nishikawa, Yukio Osaki. Clinical significance of occult hepatitis B infection in progression of liver disease and carcinogenesis[J]. *J Cancer*, 2013, 4(6): 473–480.
- [21] Kondo R1, Nakashima O, Sata M, et al. Pathological characteristics of patients who develop hepatocellular carcinoma with negative results of both serous hepatitis B surface antigen and hepatitis C virus antibody[J]. *Hepatol Res*, 2014, 44(11): 1039–1046.
- [22] Pollicino T, Cacciola I, Saffioti F, et al. Hepatitis B virus PreS/S gene variants: pathobiology and clinical implications[J]. *J Hepatol*, 2014, 61(2): 408–417.
- [23] Kondo R, Nakashima O, Sata M, et al. Pathological characteristics of patients who develop hepatocellular carcinoma with negative results of both serous hepatitis B surface antigen and hepatitis C virus antibody[J]. *Hepatol Res*, 2014, 44(11): 1039–1046.
- [24] Gujar SA, Michalak TI. Primary occult hepadnavirus infection induces virus-specific T-cell and aberrant cytokine responses in the absence of antiviral antibody reactivity in the woodchuck model of hepatitis B virus infection[J]. *J Virol*, 2009, 83(8): 3861–3876.
- [25] Sinn DH, Choi MS, Gwak GY, et al. Pre-S mutation is a significant risk factor for hepatocellular carcinoma development: a long-term retrospective cohort study[J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(3): 751–758.

(责任编辑: 冉明会)

《重庆医科大学学报》

在线投稿网址: cyxb.alljournals.ac.cn