

病毒和持续酒精刺激诱发肝细胞癌的水平研究进展

胡康洪 孙殿兴

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的癌症,每年导致100万人死亡。在我国,据最近的调查资料表明,肝癌年死亡率为20.4/10万,占全部恶性肿瘤的18.8%,已由上世纪70年代的第三位上升到第二位。大量研究表明,慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染、慢性丙型肝炎病毒(HCV)感染是诱发肝硬化并最终引起HCC的主要危险因素。另外,持续性酒精刺激、接触黄曲霉毒素B1和各种代谢性肝疾病也能导致HCC。

一、HBV感染和HCC的关系

流行病学资料表明,乙型肝炎病毒表面抗原携带者诱发HCC的可能性比非感染人群高出25~37倍^[1,2]。目前观点认为,HBV导致HCC存在直接方式和间接方式两种机制。

1. 直接方式:即病毒DNA整合到宿主染色体中诱发HCC。病毒侵入肝脏,除了肝细胞核中游离于宿主染色体外的病毒共价闭合环状DNA(cccDNA)外,病毒DNA还整合到细胞染色体中,75%慢性HBV感染患者均发现了病毒DNA的这种整合方式,似乎并不存在固定的宿主染色体整合位点。整合结果为:(1)HBV基因诱导包括缺失、颠换、转位等染色体重排。首先,病毒DNA的插入引起插入部位染色体缺失,使局部DNA碱基氧化损伤而促进颠换。此外,病毒DNA连带和其毗邻的部分宿主基因从一个染色体转位到另一个染色体引起宿主DNA严重损伤,病毒DNA的这种基因重组活性使染色体处于非稳定状态;(2)一些控制胞内信号转导途径的基因、调节细胞增生、决定细胞生存的重要基因由于病毒DNA的整合而遭到破坏;(3)病毒的增强子、启动子基因一旦嵌入宿主染色体后,作为顺式作用子不适当地直接增强下游细胞基因的表达,或错误地诱导某些细胞基因的激活。

病毒DNA整合入宿主染色体发生于病毒感染的早期,虽然这一分子事件对病毒复制并非必需的,但在长期病程中可造成如下后果:(1)整合引起宿主DNA广泛损伤,异常碱基的累积为HCC发生创造了细胞内环境;(2)整合的病毒基因在宿主细胞中持续表达,引发肝脏的持续免疫应答。由于病毒基因深深地隐藏在宿主细胞核内的染色体,使感染细胞不断地表达并分泌病毒抗原。病毒利用一套机理尚不明确的免疫逃逸机制,使T细胞介导的免疫攻击能力变得很弱。感染

作者单位:430071 武汉市,中国科学院武汉病毒研究所(胡康洪);白求恩国际和平医院消化内科(孙殿兴)
通讯作者:胡康洪 Email: kanghonghu@hotmail.com

细胞在肝脏内因得不到及时清除而转变成慢性炎症。在这种环境中,受损的肝细胞被部分清除,同时机体又启动残留的肝细胞异常增生以弥补肝细胞的不足^[3,4]。此外,细胞因子诱发肝星型细胞大量分泌 I 型和 III 型胶原蛋白为主的胞外基质,发展成肝纤维化和肝硬化,为 HCC 创造条件^[5-7]。

2. 间接方式: HBV 导致 HCC 的间接机制指 HBV 编码的多功能蛋白 HBx 可能是致癌的另一个主要因素。分子量为 16.5 kD 的 HBx 可调节病毒复制和细胞转录而影响细胞生长、介导信号转导、DNA 修复及细胞凋亡等多种生物活性^[8,9]。其可能的致癌机理为:(1) HBx 可反式激活 c-myc, c-jun, c-fos 等细胞致癌基因,使感染 HBV 的小鼠肝细胞或小鼠纤维瘤细胞系发生转化,转化的肝细胞接种裸小鼠也可致癌^[10]。HBx 转基因小鼠发生肿瘤的动物模型证实,HBx 通过结合核内转录因子及改变胞浆中的 Src 信号转导途径、Ras/Raf 信号转导途径而干扰细胞基因的转录和表达,影响细胞分化与增殖,为引起肿瘤转化的主要因素之一;(2) 肿瘤化发展的每一阶段及 HCC 患者体内均发现 HBx 的表达。整合到宿主染色体的病毒 DNA 序列中常可检出 X 基因。用 PCR 技术检测部分早期 HCC 患者肝组织发现,虽然其病毒表面抗原和核心抗原均呈阴性,但仍能检测出病毒 RNA 包括 HBx mRNA,这暗示 X 基因在肿瘤发生的早期对维持肿瘤表现型至关重要。另外,Chan 以 RNA 干扰技术封闭 HBx mRNA 后可明显减少肝癌细胞的致癌性^[11];(3) HBV 感染可引起 p53 基因的突变或失活,HBx 与 p53 蛋白协同作用可导致肝癌。多功能蛋白 p53 作为控制细胞周期和细胞凋亡的转录因子,广泛参与细胞的发育、分化、基因扩增、染色体集聚和细胞衰老等过程。上世纪 90 年代末,发现 p53 蛋白在 DNA 修复过程中参与碱基的切割修复。在 HBV 感染造成 DNA 损伤的病理条件下,细胞启动以 p53 为主要成员的压力应答途径,以避免细胞的进一步损伤。压力应答途径有两种形式,一是细胞周期遭到滞留而等待 DNA 修复,二是启动凋亡信号以淘汰已无法修复 DNA 的受损细胞。在此过程中,p53 充当细胞基因组的卫士积极参与修复以保护宿主的遗传稳定性,也介导在 DNA 无法修复条件下的细胞凋亡。鉴于 p53 基因的抗肿瘤功能,人们又称其为肿瘤抑制基因,但其非常敏感,在包括 HCC 在内的多种肿瘤中,p53 基因是最易发生突变的,其突变率高达 50%。HBV 慢性感染时,p53 基因发生错义突变引起表达的 p53 失活,而且 HBx 与 p53 相互结合,使依赖 p53 的压力应答途径完全受损:p53 介导的 DNA 修复机制被破坏、受损细胞的凋亡机制也不能得到启动,最终引起细胞恶性转化^[12,13]。最近,国内吴建国研究组从宿主细胞中鉴定出能和 HBx 相互作用的细胞因子 YueF,其能提高 p53 表达水平并诱导肝癌细胞凋亡^[14],这种可与 HBx 致癌作用相抵消的细胞因子的出现,反映出肝细胞在进化中建立的一套抗病毒分子机制。另外,HBx 不仅与 p53 相互作用,也可与其他 DNA 修复蛋白如 UVDDDB 相互作用而干扰宿主 DNA 修复系统,使细胞基因组突变率升高^[15];(4) 有证据表明 HBx 参与调节线粒体及胞浆钙离子平衡、蛋白酶小体并改变旁分泌途径,这些调节效应使细胞内环境发生紊乱,为 HCC 的发展奠

定了基础^[9]。

除 HBx 外,整合的病毒 DNA 上尚存在另一个有转活功能的病毒蛋白质,是由 pre-S2/S 编码的 3'-末端截短的表面抗原中等蛋白(carboxy-terminally truncated middle hepatitis B surface protein, MHBs),其通过永久性激活胞内 Raf-1/MEK/ERK 信号转导途径而导致肝细胞异常增生^[2]。此外,胞内 HBV 转录时经拼接产生一个短的转录子,通过囊膜蛋白包装后成为缺陷型 HBV 颗粒。在这种 HBV 颗粒中,短转录子能反转录并稳定表达 HBV 拼接蛋白(HBV spliced protein)HBSP,该蛋白可改变依赖 TGF- β 的信号转导途径并诱导肝细胞凋亡、刺激肝纤维化的发生^[16]。病毒蛋白通过调节胞内信号转导而改变细胞凋亡和增生的平衡,并启动持续性免疫应答而导致 HCC 发生。这一过程提示,在治疗肝硬化病人时降低病毒滴度、控制病毒增殖对防止 HCC 的具有较为重要的意义。

二、HCV 感染和 HCC 的关系

和非感染人群相比,慢性 HCV 感染者发生 HCC 的危险性高 17~24 倍^[17],肝硬化使罹患 HCC 的风险进一步上升。日本一项流行病学调查结果显示,肝硬化患者 3 年内发展成 HCC 的几率高达 12.5%,仅有慢性 HCV 感染而未发生肝硬化的患者 3 年内发展成 HCC 的几率只有 3.8%^[18]。

HCV 导致 HCC 的分子机理较为复杂,虽然无与 HBV 基因组那样直接整合入宿主染色体内的过程,但涉及到 HCV 基因编码的各种蛋白对转录调节,细胞信号转导和细胞凋亡等多种方式。

1. 核心蛋白具有潜在的致癌作用:核心蛋白(C 蛋白)除分布于胞浆外,也存在于细胞核。人们开始探索其转活功能发现,C 蛋白也是一种反式激活蛋白,能激活肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β)的转录。在转基因小鼠中,C 蛋白激活控制细胞增生的 MAPK(mitogen-activated protein kinase)信号转导途径,增强 JNK(c-Jun N-terminal kinase)和 AP-1(activating factor-1)下游转导信号并压抑 SOCS-1(suppressor of cytokine signaling-1)转导,扰乱细胞周期,刺激增生而致癌^[19]。C 蛋白还能和控制细胞增生或代谢的细胞蛋白如 lymphotoxin- β 受体、RXR- α (retinoid X receptor- α)相互结合^[20,21]。另一个直接证据是,C 蛋白对原代大鼠胚胎成纤维细胞(rat embryo fibroblast, REF)具有转化作用。C 基因与 H-ras 或 c-myc 基因共同转染 REF 细胞,转染子发生转化,表现为细胞快速增殖、无贴壁依赖性生长,而且可导致裸鼠肿瘤形成^[22]。

2. HCV 非结构蛋白 NS3 导致 HCC:Sakamuro 等^[23]发现 NS3 体外转化小鼠成纤维细胞 NIH3T3 后,转化细胞移入裸鼠体内可形成纤维肉瘤灶。此外,NS3 能与宿主细胞肿瘤抑制基因 p53 蛋白结合使其表达异常或产生变异,丧失抑癌功能,导致细胞异常增殖和恶性转化。NS3 也可影响 cAMP 依赖性蛋白激酶(PKA)信号转导途径,进而干扰蛋白质磷酸化,影响信号级联而致病。PKA 由两个 R 亚基和两个 C 亚基组成四聚体,存在于细胞浆。当配体与细胞表面受体结合时,可激活腺苷酸环化酶产生的 cAMP 与 PKA 的 R 亚基结合,四聚体解体,释放出的

两个活性 C 亚基迁移至细胞核中,与染色体磷酸化相关蛋白相互作用,参与各种基因的转录调控。Borowski 小组发现 NS3 蛋白中包含与 PKA R 亚基的底物识别位点高度同源的序列,可作为识别信号替代 R 亚基而与 C 亚基结合,阻碍 C 亚基迁移至细胞核,导致 PKA 失活,抑制 PKA 介导的磷酸化,严重干扰细胞的正常功能^[24]。

3. 非结构蛋白 NS5A 导致 HCC: HCV 非结构蛋白 NS5A 能与肝细胞中双链 RNA 激活的蛋白激酶(double-stranded RNA activated protein kinase, PKR)相互作用。PKR 是干扰素(IFN)诱生的一种细胞蛋白激酶,是 IFN 信号传导途径的主要效应因子。NS5A C-末端有一组编码 40 个氨基酸(2209 ~ 2248 aa)的序列是干扰素敏感决定区(interferon sensitivity determining region, ISDR), ISDR 及其下游 N-端的 26 个氨基酸残基序列是 NS5A 与 PKR 相互作用的关键决定区。NS5A 以及另一种 HCV 蛋白 E2 与 PKR 结合后可抑制 PKR 活性,进而抑制真核细胞翻译启动因子 eIF-2 α 亚单位的磷酸化修饰,宿主细胞蛋白合成无法停止,最终导致永生性细胞形成^[25]。临床资料表明, HCV 1b 基因型感染的丙型肝炎患者对 IFN 不敏感, 1b 基因型致感染慢性化及发生 HCC 的比例和速度高于其他类型,这是由于 NS5A 与 PKR 结合抑制了 PKR 活性,从而减弱 IFN 的抗病毒作用,导致长期慢性感染和 HCC 产生。

三、酒精和 HCC 的关系

酗酒也是诱发 HCC 的主要危险因素,如伴随 HBV 或 HCV 病毒感染,导致肝硬化和 HCC 的可能性会明显上升。持续酒精刺激所引起的肝损伤包括一下方面:(1)乙醇的首个代谢产物,也是最具毒性的化合物乙醛在肝脏中积累,可结合到 DNA 上引起诱变,也可结合各种细胞蛋白质形成复合性抗原诱导体内免疫应答^[26]。乙醛本身还可抑制核 DNA 修复系统中的酶;(2)乙醇诱导细胞色素 CYP 2E1 产生活性游离氧自由基(reactive oxygen species, ROS), ROS 氧化脂类所产生的脂类氧化物如 4-羟基壬烯醛(HNE)能与 DNA 形成螯合物而致癌^[26]。另外,细胞色素 CYP 2E1 还促使环境中的致癌前体化合物如亚硝酸转化成致癌化合物。吸烟、不良饮食习惯和环境中的污染的有机物可加快酗酒者诱发 HCC;(3)乙醇是维生素 A 氧化成视黄酸的竞争性抑制剂,酗酒可导致肝内视黄酸水平下降而积累视黄醇代谢的毒性中间产物,此过程中, AP1 基因表达上调, MAPK 信号转导发生紊乱,导致细胞过量增生^[27]。动物实验证实,在饮食中补充视黄酸可部分弥补 AP1 基因紊乱并恢复细胞正常生长^[28];(4)如伴随饮食缺乏(如叶酸缺乏),则可导致 DNA 甲基化不足,易发生 HCC。

四、病毒感染和酒精协同作用加快 HCC 发生

早在 1982 年, Ohnishi 等^[29]就注意到 HBV 患者如果还酗酒的话,能极大加快 HCC 的发生,其机制至今尚不清楚。Degos 研究酒精摄取与 HCV 感染的相关性,发现酒精性肝患者对 HCV 易感性及发展成慢性肝炎的机率明显提高。我们研究组对肝组织切片结果证实,每日摄取 40 克以上酒精可使病毒感染肝脏的癌变机

率提高一倍以上。对 HCV 患者,甚至极少量的酒精摄取都会使血清中 HCV RNA 含量迅速升高。此外,临床观察到酗酒的 HCV 患者更容易患上迟发性皮肤卟啉症等并发性疾病。因此,HBV 和 HCV 患者应完全戒酒。

参 考 文 献

- 1 Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology*,2002, 36:1206-1213.
- 2 Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol*,2007, 13:74-81.
- 3 朱德强,黄志勇. DNA 损伤与肝癌. *世界华人消化杂志*,2007,15:1775-1780.
- 4 Ueno Y, Moriyama M, Uchida T, et al. Irregular regeneration of hepatocytes is an important factor in the hepatocarcinogenesis of liver disease. *Hepatology*,2001,33:357-362.
- 5 Hu K, Fink M, Froh M, et al. Characterization of the human zinc finger protein 267 promoter: essential role of nuclear factor Y. *Biochim Biophys Acta*,2005,1729:14-23.
- 6 Schnabl B, Hu K, Muhlbauer M, et al. Zinc finger protein 267 is up-regulated during the activation process of human hepatic stellate cells and functions as a negative transcriptional regulator of MMP-10. *Biochem Biophys Res Commun*,2005, 335:87-96.
- 7 Brechot C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology*,2004, 127:S56-61.
- 8 侯全玲,唐红,黄飞骏. 乙型肝炎病毒 X 蛋白与原发肝癌. *世界华人消化杂志*,2008,16:50-55.
- 9 Bouchard MJ, Schneider RJ. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J Virol*,2004,78:12725-12734.
- 10 Terradillos O, Billet O, Renard CA, et al. The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice. *Oncogene*,1997,14:395-404.
- 11 Chan DW, Ng IO. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells. *J Pathol*,2006,208:372-380.
- 12 Hussain SP, Schwank J, Staib F, et al. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*,2007,26:2166-2176.
- 13 Teufel A, Staib F, Kanzler S, et al. Genetics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*,2007,13:2271-2282.
- 14 Huang J, Wu K, Zhang J, et al. Putative tumor suppressor YueF affects the functions of hepatitis B virus X protein in hepatoma cell apoptosis and p53 expression. *Biotechnol Lett*,2008,30:235-242.
- 15 Dürer R, Caselmann WH. Carcinogenesis of primary liver malignancies. *Langenbed's Arch Surg*,2000,385:154-161.
- 16 Soussan P, Tuveri R, Nalpas B, et al. The expression of hepatitis B spliced protein (HBSP) encoded by a spliced hepatitis B virus RNA is associated with viral replication and liver fibrosis. *J Hepatol*,2003,38:343-348.
- 17 Donato F, Boffetta P, Puoti M. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*,1998,75:347-354.
- 18 Tsukuma H, Hiyama T, Tanaka S, et al. Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver disease. *N Engl J Med*,1993,328:1797-1801.
- 19 Koike K. Hepatitis C virus contributes to hepatocarcinogenesis by modulating metabolic and intracellular signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol*,2007,22 Suppl 1:S108-111.
- 20 Matsumoto M, Hsieh TY, Zhu N, et al. Hepatitis C virus core protein interacts with the cytoplasmic tail of lymphotoxin-beta receptor. *J Virol*,1997,71:1301-1309.
- 21 Tsutsumi T, Suzuki T, Shimoike T, et al. Interaction of hepatitis C virus core protein with retinoid X receptor alpha modulates its transcriptional activity. *Hepatology*,2002,35:937-946.
- 22 Ray RB, Meyer K, Steele R, et al. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem*,1998,273:2256-2259.
- 23 Sakamuro D, Furukawa T, Takegami T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol*,1995,69:3893-3896.
- 24 Schulze zur Wiesch J, Schmitz H, Borowski E, et al. The proteins of the Hepatitis C virus: their features and interactions with intracellular protein phosphorylation. *Arch Virol*,2003,148:1247-1267.
- 25 Taylor DR, Shi ST, Romano PR, et al. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*,

1999,285:107-110.

- 26 Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*,2007,7:599-612.
- 27 Wang XD. Alcohol, vitamin A, and cancer. *Alcohol*,2005,35:251-258.
- 28 Chung J, Liu C, Smith DE, et al. Restoration of retinoic acid concentration suppresses ethanol-enhanced c-Jun expression and hepatocyte proliferation in rat liver. *Carcinogenesis*,2001,22:1213-1219.
- 29 Degos F. Hepatitis C and alcohol. *J Hepatol*,1999,31 Suppl 1:113-118.

(收稿日期:2008-02-20)

(本文编辑:王丹静)

胡康洪,孙殿兴. 病毒和持续酒精刺激诱发肝细胞癌的分子水平研究进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2008,2(4):359-364.