

- merase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1992, 30(3): 545-551.
- 5 Leitmeyer KC, Vanghn DW, Watts DW, et al. Dengue virus structural differences that correlate with pathogenesis. *J Virol*, 1999, 73(6): 4738-4747.
  - 6 Urvashi BS, Arindam M, Shobha B, et al. Partial nucleotide sequencing and molecular evolution of epidemic causing dengue 2 strains. *J Infect Dis*, 1999, 180(10): 959-965.
  - 7 Mbreño-Altamirano MMB, Sanchez-García FJ, Muñoz ML. Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2. *J Gen Virol*, 2002, 83: 1123-1130.
  - 8 Andrew DD, Rosa CG, Melinda JP, et al. Identification of a major determinant of mouse neurovirulence of dengue virus type 2 using stably cloned genomic-length cDNA. *J Gen Virol*, 1998, 79: 437-446.
  - 9 Cologna R, Rico-Hesse R. American genotype structure decrease virus output from human monocytes and dendritic cells. *J Virol*, 2003, 77(7): 3929-3938.
  - 10 Bielefeldt-Ohman H, Meyer M, Fitzpatrick DR, et al. Dengue virus binding to human leukocytes cell lines: receptor usage differs between cell types and virus strains. *Virus Res*, 2001, 73(1): 81-89.
  - 11 Lin CF, Lei HY, Shiao AL, et al. Endothelial cell apoptosis induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 via production of nitric oxide. *J Immunol*, 2002, 169: 657-664.
  - 12 杨佩英, 司炳银, 秦鄂德, 等. 我国三株登革 型病毒分离株包膜蛋白基因变化的研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1993, 13: 362-366.

(收稿日期: 2003-08-25)

## 病毒学

### HBV 整合的致癌性研究

高丰光 王迎伟 孙汶生 曾令宇 王玉龙 周峰

HBV 的 4 个亚基因产物中, HBx 具有反式激活、介导细胞凋亡作用, HBs 具有反式激活因子的作用。肝细胞癌(HCC)的发生与 HBV 的整合及整合后染色体重排有关。为探讨 HBV 整合及 HBx、HBs 亚基因在 HCC 发生中的可能作用, 我们制备了 HBV 亚基因探针, 并以此对肝细胞癌中 HBV 整合及亚基因转录进行了研究, 以期阐明 HBV 感染后 HCC 发生机制提供一定的实验资料和依据。

本研究中, 首先以 BamH<sub>I</sub>、Bgl<sub>II</sub> 酶切扩增回收的 HBV DNA, 回收其 HBV 亚基因 HBx、HBc、HBs、PreS DNA 片段, 以地高辛标记引物法标记成敏感性与特异性俱佳的 HBV 亚基因探针, 再以 HBV 探针点杂交检测 HCC 标本中 HBV DNA 的阳性率, 对阳性的标本, 继以 Southern 转膜杂交检测其整合情况, 最后取 HBV DNA 阳性的 HCC 标本, 按经典方法抽提其 mRNA, 分别以 HBV 亚基因

探针 Northern 转膜杂交检测亚基因的表 达率。结果显示: 44 例 HCC 标本中, 75% 的标本显示有 HBV DNA 的存在; Southern 杂交分析, HBV 纯整合型 HCC 为 63.6%, 混合型 HCC 为 36.4%, 未见单纯游离型 HCC 标本存在; 17 例 HBV DNA 阳性的 HCC 标本, HBV 亚基因 PreS、HBs、HBx、HBc mRNA 转录率分别为 47.1%、58.8%、70.6%、41.2%, 其中 9 例纯整合型的 HCC 标本, HBV 亚基因 PreS、HBs、HBx、HBc mRNA 转录率分别为 11.1%、44.4%、55.6% 和 11.1%, 经统计学处理, HBx 与 HBc、PreS 相比较具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 8 例混合型 HCC 标本, 其 mRNA 转录率分别为 87.5%、75%、87.5%、75%。

HBV 是溶原性病毒, 非成年期的 HBV 感染可能由于外周耐受、T 细胞反应低下、抗原递呈抑制、选择性免疫抑制、病毒基因表达下调或基因变异导致的 T 细胞识别障碍, 转为慢性感染并伴有 HBV DNA 片段的整合。HBV DNA 的整合可致宿主细胞染色体片段的缺失及整合后染色体的重排, 由此引起的染色体 DNA 的不稳定性, 可能是 HBV 致癌的机制之一。我们的研究证实: HBV DNA 在肝癌细胞内以整合于染色体上作为存在的主要方式, 整合的 HBV DNA

片段可作为基因转录的模板而表达相应的基因蛋白。最近研究发现, HBx 具有反式激活、介导细胞凋亡作用并同时具有 T、B 细胞表位, 其细胞凋亡活性取决于其氨基酸组成中的 68~117 位氨基酸, 转化活性取决于其 120~140 位氨基酸, 同时, 该蛋白的 2 个 T 细胞表位 HLSLRCLFV 和 CLFKDWEEL 分别位于其 52~60 和 115~123 位氨基酸, 而 B 细胞表位位于其 29~48 位氨基酸。HBx 蛋白的反式激活因子作用可使 p53 失活, 正常 p53 的存在是维持 p53 介导的细胞程序性死亡的关键, 因此, HBx 蛋白应是 HBV 相关 HCC 发生的关键环节之一, 预防 HBV 相关原发性肝癌的研究应多集中于抑制 HBx 的产生或以拮抗物拮抗其活性。

HBx 片段表达率较 HBc、PreS 有显著性差异, 也正说明 HBx 亚基因在肝细胞癌的发生中的重要作用, HBx 蛋白具有和人乳头瘤病毒 (Human Papillomavirus, HPV) 16 E7 蛋白相似的转化蛋白活性, 其持续存在与原发肝癌的发生密切相关, 而正常情况下不易转录的 HBc 亚基因 mRNA 的检出, 则说明相应数量的 HBc 亚基因整合在 HBx 的下游, 应是下一步研究的关键和焦点所在。

(收稿日期: 2004-03-01)

作者单位: 厦门大学医学院免疫学教研室(高丰光); 山东大学医学院免疫学研究所(孙汶生); 徐州医学院微生物学和免疫学教研室(王迎伟, 曾令宇, 王玉龙, 周峰)

通讯作者: 高丰光, 361005 厦门大学医学院免疫学教研室, Email: gfengguangl@163.com; 电话: 0592-2188675