

Alu-PCR 检测人肝癌细胞株 PLC/PRF/5 基因组中乙型肝炎病毒 DNA 的整合

邱 爽 张会英

摘 要 **目的** 应用 Alu-PCR 方法检测人肝癌细胞株 PLC/PRF/5 基因组中乙型肝炎病毒(HBV)DNA 的整合。**方法** 提取经培养扩增的人肝癌细胞株 PLC/PRF/5 基因组 DNA,根据 Alu-PCR 方法经过 3 轮 PCR 反应扩增潜在的 HBV DNA 和人基因组 DNA 整合片段。琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 扩增产物片段,切取并纯化整合阳性的电泳条带,对纯化产物进行核酸测序,得到整合片段的核苷酸序列。**结果** 经琼脂糖凝胶电泳检测,用 Alu-PCR 方法能够从 PLC/PRF/5 细胞株中扩增得到 4 条 HBV DNA 整合序列,经测序后与比对其中 3 条整合序列能够定位于人染色体 03p21.31、05p15.33、12q13.12~q14.1。**结论** Alu-PCR 可以准确测定肝细胞中 HBV DNA 的整合,为研究 HBV DNA 在肝细胞中的整合研究提供了一个简单、经济的方法。

关键词 肝癌 Alu-PCR 乙型肝炎病毒 DNA 整合

中图分类号 R393

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.04.023

Detection of Human Hepatocarcinoma Cell Line PLC/PRF/5 Genome Hepatitis b Virus DNA Integration with Alu-PCR. Qiu Shuang, Zhang Huiying. Department of Laboratory, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China

Abstract Objective In this research with the method of Alu-PCR we investigate the integration of hepatitis B virus (HBV) DNA in human hepatocarcinoma cell line (PLC/PRF/5) genome DNA. **Methods** We at first extracted the genome DNA from PLC/PRF/5 cells, and then the potential integration fragments of HBV DNA and human genome DNA were amplified with according to the Alu-PCR after three rounds PCR. The Alu-PCR amplification products were observed with agarose gel electrophoresis, then integration positive electrophoresis bandings were chipped and purified for nucleic acid sequencing. At last the bioinformatics information was acquired by blast online. **Results** Through agarose gel electrophoresis after Alu-PCR amplification, we got four potential integration bindings, among which we got three integration sequences of HBV DNA in human genome DNA. These integration sequences could be individually located in the human chromosome of 03p21.31, 05p15.33, 12q13 and 12~q14.1. **Conclusion** With Alu-PCR we can accurately measure the integration of HBV DNA in human genome DNA, and Alu-PCR can be a convenience and economic method in the study of HBV DNA's integration in human genome DNA.

Key words Hepatocarcinoma; Alu-PCR; Hepatitis B virus DNA; Integration

我国肝癌最主要的病因因素为乙型肝炎病毒(HBV)感染,肝癌患者 HBV 标志物阳性率达 90% 左右^[1]。早在 20 世纪 80 年代,就有研究者发现大部分由慢性乙型肝炎携带者发展成的肝癌的癌组织中存在 HBV DNA 片段整合到宿主基因组的现象。现有研究资料显示 90% 的 HBV 相关肝癌组织中都能检测到 HBV DNA 整合子存在,因而认为 HBV DNA 整合在肝癌的发病过程中扮演了重要角色^[2,3]。目前已有用免疫组化法检测肝癌细胞中 HBV 抗原的分布,以核酸分子杂交等方法研究 HCC 患者肝细胞中 HBV DNA 整合状态的报道。另外,多种高灵敏的聚

合酶链反应(PCR)技术也相继被应用于 HBV DNA 整合的研究,其中 Alu-PCR 被认为是较为经济快捷的 HBV DNA 整合研究手段^[4,5]。PLC/PRF/5 细胞系又称 Alexander 细胞系,是一株能稳定持续产生 HBsAg 的人肝癌细胞株。PLC/PRF/5 已成为国际上研究 HBV、HBV 与肝癌关系的一个重要实验模型^[6]。本课题拟采用 Alu-PCR 方法以研究人肝癌细胞株 PLC/PRF/5 基因组中 HBV DNA 的整合情况。

材料与方法

1. 材料:人肝癌细胞株 PLC/PRF/5 为天津医科大学附属肿瘤医院保存。基因组 DNA 提取试剂购自 Promega 公司。所使用的 PCR 仪为 PE2240 型。高保真长段 PCR 系统 Expand™ High Fidelity 试剂盒购自 Roche 公司,尿嘧啶糖基化酶(UDG)购自 NEB 公司。Alu-PCR 扩增引物合成及 HBV DNA 整合阳性的序列测序均由生工生物工程公司完成。

作者单位:100035 北京积水潭医院检验科

通讯作者:张会英,电子邮箱:qiudashuang@126.com

2. 方法: (1) PLC/PRF/5 细胞基因组 DNA 提取: 常规培养 PLC/PRF/5 细胞, 收集 10^7 个细胞用于基因组 DNA 的提取, 按照 Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒操作手册提取 PLC/PRF/5 细胞的基因组 DNA。 (2) PCR 引物设计: 参照表 1^[4]。 (3) PCR 反应方法: Alu-PCR 反应原理参见图 1。 (4) 电泳观察及阳性整合条带测序: 取 50 μ l 第 3 轮 PCR 扩增产物, 用

1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 在短波紫外线灯下观察扩增产物。 切取 HBV DNA 整合阳性的电泳条带, 将胶块送生工生物工程公司进行测序。 (5) HBV DNA 的整合位点分析: 测序得到阳性整合序列经美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 在线的 blastn suite 比对分析能够得到 HBV DNA 在人 (PLC/PRF/5 细胞) 基因组中的定位等相关的信息。

表 1 引物序列

名称	引物序列(5'→3')	位置(HBV)	备注
UP5	CAGUGCCAAGUGUUUGCUGACGCCAAAGUGCUGGGAUUA		Alu - sense
T3 - 515	AUUAACCCUCACUAAAGCCUCGAUAGAUYYRCCAYUGCAC		Alu - antisense
UP6	CAAGTGTTTGCTGACGCCAAAG		Alu - sense (tag)
midT3	ATTAACCCCTCACTAAAGCCTCG		Alu - antisense (tag)
pUTP	ACAUGAACCUUUACCCGUUGC	1131 ~ 1152	HBX1 (HBV X)
MM37	TGCCAAGTGTTCGTGACGC	1174 ~ 1193	HBX2 (HBV X)
MM60	CTGCCGATCCATACTGCGGAAC	1258 ~ 1279	HBX3 (HBV X)
uPre31	GAGUUCUUCUUCUAGGGGACCUG	2350 ~ 2328	HBC1 (HBV core)
MM31	AGTGCGAATCCACACTC	2288 ~ 2269	HBC2 (HBV core)
MM25	GGAAGGAAAGAAGTCAGAAGG	1978 ~ 1960	HBC3 (HBV core)
uPreS2	ACACGGCGGUUUUUGGGGTGGAG	3042 ~ 3065	HBS1 (HBV S)
MM2R	CAGGCTCAGGGCATATTGACAA	3070 ~ 3091	HBS2 (HBV S)
MD71	YCCTGCTGGTGGCTCCAGTTC	55 ~ 75	HBS3 (HBV S)

U. dUTP; Y. C 或 T; R. A 或 G

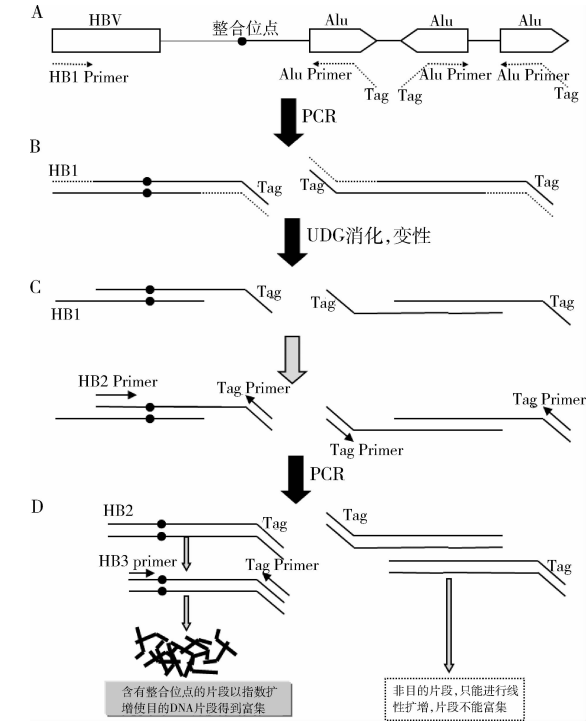


图 1 Alu-PCR 检测 HBV DNA 整合位点原理

A. 含有 HBV 整合子和 Alu 序列的 DNA 片段, 虚线箭头所示为根据 HBV DNA (HB1) 序列和 Alu 序列设计的以尿嘧啶 (U) 替代胸腺嘧啶 (T) 的引物, 其中针对 Alu 序列的引物中斜线部分代表引入的标签序列 (Tag); B. 首次 PCR 之后得到引入了引物中尿嘧啶的 DNA 片段, 用尿嘧啶糖基化酶 (UDG) 将 PCR 产物消化, 经变性后除去 DNA 片段中含尿嘧啶的核苷酸; C. 尿嘧啶糖基化酶消化后的 PCR 产物, 加入针对 HBV DNA 序列 HB2 和标签序列 Tag 的引物, 进行第 2 轮 PCR; D. 第 2 轮 PCR 产物中富集了含整合位点的目的片段, 可以在此基础上再增加一轮半巢氏 PCR, 使目的片段进一步富集

结 果

1. 琼脂糖凝胶电泳: PLC/PRF/5 细胞基因组 DNA 模板经 Alu-PCR 后, 第 3 轮 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳显示共得到 4 条 HBV DNA 的整合阳性的电泳条带。其中 Alu-sense-HBX 引物系统 Alu-PCR 扩增后得到约 2000bp 和 800bp 两条电泳条带, Alu-antisense-HBX 和 Alu-antisense-HBC 引物系统分别得到约 700bp 和 600bp 电泳条带各 1 条 (图 2)。

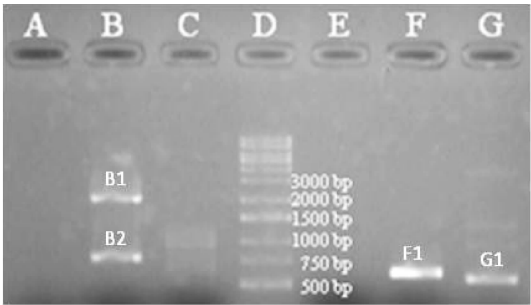


图 2 琼脂糖凝胶电泳

A、B、C 道为 Alu-sense 引物分别和 HBS、HBX、HBC 配对的引物系统的扩增产物; E、F、G 道为 Alu-antisense 和 HBS、HBX、HBC 配对的引物系统的扩增产物; D 为 DL10000 核酸 Marker

2. HBV DNA 的整合位点序列分析: 切取 4 条 HBV DNA 整合阳性的电泳条带经测序后比对分析, 发现其中 B1、F1、G1 3 条片段为包含有 HBV DNA 和人基因组 DNA 序列的完整的整合片段, 它们在人染

色体中的定位分别为 3p21. 31、5p15. 33 和 12q13. 12 (表 2),B2 片段测序后得到的序列只含有人基因组

序列,而不含有 HBV DNA 的序列,应为非特异扩增产物。

表 2 整合位点序列分析

整合片段	区带	所在基因	外显子/内含子	5'基因	3'基因	整合位点前后序列(20bp)	测序引物
B1	3p21. 31	CCDC12	内含子	PTH1R	NBEA12	HBV: CACCAGCACCATGCAACTTT 人: CGTTGTGTATACCATGTTTT	HBX3
F1	5p15. 33	非编码区	-	TERT	MIR4457	HBV: TTTCATGGCTGCTAGGTTGT 人: TGTATATCCCATGGGACCCAC	HBX3
G1	12q13. 12	非编码区	-	PGBD3P1	RPL21P104	HBV: CATGCCCAAAGCCACCCAA 人: AGCTCTGTTTCCCTTTTAT	HBC3

讨 论

从 20 纪 80 年代开始有学者发现大部分由慢性乙型肝炎携带者发展成的肝癌的癌组织中存在有 HBV DNA 片段整合到宿主基因组的现象^[2]。现有研究资料显示,90% 的 HBV 相关肝癌组织中都能检测到 HBV DNA 整合子存在,认为 HBV DNA 整合在肝癌的发病过程中扮演了重要的角色^{[[3]]}。研究表明整合的 HBV DNA 与邻近的人基因组 DNA 常呈多重排现象,包括缺失、倍增、反转录、插入、转位、重复和染色体易位等^[7, 8],能导致原癌基因激活或过表达、肿瘤抑制基因突变或失活,使细胞生长失控,逐渐发生性恶转化,发展为肿瘤细胞^[9]。

目前在已有的 HBV DNA 与人基因组 DNA 整合的研究方法中,iPCR 和 Southern blot 筛选基因组文库这两种方法都存在敏感度差、实验操作繁琐的缺点^[3, 10]。近年来,全基因组深度测序(whole - genome deep - sequencing)技术发展日趋成熟,其也常被用于 HBV DNA 整合的相关研究,然而其高昂的费用往往使研究者望而却步^[7, 11]。与上述几种研究方法相比较,Alu - PCR 方法具有操作简单、反应灵敏的特点,且使用成本一般研究者也能够承受^[4, 5]。因而笔者选取了 Alu - PCR 扩增 HBV DNA 整合子的方法作为研究平台,并以此为基础研究了 PLC/PRF/5 细胞基因组中 HBV DNA 的整合。

PLC/PRF/5 细胞又称肝癌亚历山大细胞(Alexander cells),该细胞系能够持续合成分泌 HBsAg,常被用于 HBV 感染相关肝癌的研究,但目前对该细胞中 HBV DNA 与人基因组 DNA 整合的分析相对薄弱^[6]。本研究中,Alu - PCR 得到了 4 条扩增序列,其中 B1、F1、G1 为完整的整合片段;而 B2 片段序列中只含有人基因组的序列,可能为 UDG 糖基化反应不完全导致的非特异性扩增。

片段 F1 是由 HBV HBX 基因片段插入人基因组区带 5p15. 33 而产生,该插入片段的 5'端接近癌基因端粒反转录酶(TERT),在多个基因肝癌组织的 HBV DNA 整合分析的研究中曾重复发现此整合位点,因而认为该整合位点可能为 HBV DNA 偏好的整合“热点”^[12, 13]。另外,有研究表明有该种整合的肝癌组织中 TERT 表达升高,而高表达的 TERT 能够帮助稳定基因组 DNA 的端粒,从而增加了细胞的分裂活性,并容易和其他因素一起诱使细胞癌变^[14, 15]。整合片段 B1 位于人染色体区带 3p21. 31 的癌基因 CCDC12 中,其为一个新发现的整合位点^[16]。虽然 HBV DNA 插入的位置是 CCDC12 基因的内含子,但该种整合影响了内含子结构,可能对 CCDC12 mRNA 的剪切形成也有一定的影响,此种整合也可能参与了 PLC/PRF/5 肝癌细胞的形成与发展。整合片段 G1 位于染色体区带 12q13. 12,位于基因组的非编码区,也是一个新发现的整合位点,其对 PLC/PRF/5 细胞生长的影响仍需进一步研究。

综上所述,PLC/PRF/5 细胞中确定存在 HBV 整合,HBV 整合位点的分析可能对该细胞癌变的发生、发展提供提了一定的线索,并对 HBV 相关肝癌的基础及临床研究有一定参考。

参考文献

1 Wang FS, Fan JG, Zhang Z, *et al.* The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. *Hepatology*, 2014,60(6):2099 - 2108

2 Brechot C. Pathogenesis of hepatitis B virus - related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms[J]. *Gastroenterology*, 2004,127 (5 Suppl 1):S56 - 61

3 Chan HL, Sung JJ. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus [J]. *Semin Liver Dis*, 2006,26(2):153 - 161

4 Murakami Y, Saigo K, Takashima H, *et al.* Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas[J]. *Gut*, 2005,54(8):1162 - 1168

(下转第 41 页)

胞层面和基因层面研究 GCF 作为 IER5 抑制性转录因子的作用以及其辐射敏感度对 IER5 基因的作用。鉴于 IER5 基因的不同辐射剂量的辐射效应与辐射后时间效应,对临床进行的肿瘤放疗剂量选择与辐射后药物的时间选择都有一定的参考价值。在对一些恶性肿瘤如肝癌、宫颈癌研究中笔者都检测到辐射情况下影响 IER5 基因的表达,因此在这些癌细胞中沉默 GCF 也会出现 IER5 基因高表达。宫颈癌作为威胁女性身体健康的一大恶性肿瘤,其放射治疗为较成熟的治疗方法。在放疗前预测放疗敏感度,制定个体化放疗计划,观察癌细胞放射反应及判定疗效已成为目前宫颈癌研究的主要方向。虽然目前研究仅表明 IER5 基因可能与细胞周期的调节、细胞凋亡研究,其辐射后的生物学效应仍然未知,但随着关于 GCF 和 IER5 研究的进展,笔者设想可以 GCF 作为一个突破点,寻找一种可以降低 GCF 表达的方式,在不必辐照或者降低辐照情况下,通过 IER5 表达上调这一途径来双效加速肿瘤细胞凋亡,而不至对正常癌旁组织造成损伤,这可能会为临床宫颈癌的基因治疗拓宽新思路。

参考文献

- Ohtsuka H, Oikawa M, Ariake K, *et al.* GC - binding factor 2 in - teracts with dishevelled and regulates Wnt signaling pathways in human carcinoma cell lines [J]. *International Journal of Cancer*, 2011, 129 (7):1599 - 1610
- Gregory SG, Barlow KF, Mclay KE, *et al.* The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1 [J]. *Nature*, 2006, 441 (7091):315 - 321
- Williams M, Lyu M, Yang Y, *et al.* Ier5, A novel member of the slow - kinetics immediate - early genes [J]. *Genomics*, 1999, 55 (3):327 - 334
- Okada A, Kushima K, Aoki Y, *et al.* Identification of early - responsive genes correlated to valproic acid - induced neural tube defects in mice [J]. *Clinical and Molecular Teratology*, 2005, 73 (4):229 - 238
- Jansova E, Koutna I, Krontora d P, *et al.* Comparative transcriptomem aps; a new approach to the diagnosis of colorectal carcinoma patients using cDNA m - ieroarrays [J]. *Clin Genet*, 2006, 69 (3):218 - 227
- Tavakoli H, Manoochehri M, Mosalla SMM, *et al.* Dose - dependent and gender - related radiation - induced transcription alterations of Gadd45a and Ier5 in human lymphocytes exposed to gamma ray emitted by ⁶⁰Co [J]. *Radiation Protection Dosimetry*, 2013, 154 (1):37 - 44
- 李秀楠, 李莉, 杨川杰, 等. IER5 基因对 HeLa 细胞辐射敏感性的影响 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36 (7):843 - 853
- Ding KK, Shang ZF, Hao C, *et al.* Induced expression of the IER5 gene by γ - ray irradiation and its involvement in cell cycle checkpoint control and survival [J]. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2009, 48 (2):205 - 213
- 崔巍, 尹玲玲, 董凌月, 等. 早期反应基因 Ier5 启动子区辐射敏感的转录因子结合位点研究 [J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2012, 32 (1):15 - 19
- Laura B, Hitoshi Y, Ira P, *et al.* Biochemical characterization of human GCF transcription factor in tumor cells [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267 (3):1689 - 1694
- Ariake K, Ohtsuka H, Motoi F, *et al.* GCF2/LRRFIPI promotes colorectal cancer metastasis and liver invasion through integrin - dependent RhoA activation [J]. *Cancer Lett*, 2012, 325 (1):99 - 107
- Masato T, Peizhong M, Gang W, *et al.* Molecular analysis of the GCF gene identities revisions to the cDNA and amino acid sequences [J]. *Biochemical et Biophysical Acta*, 1999, 1447 (1):125 - 133
- Fernet M, Mégnin - Chanet F, Hall J, *et al.* Control of the G₂/M checkpoints after exposure to low doses of ionising radiation; implications for hyper - radiosensitivity [J]. *DNA Repair* 2010, 9 (1):48 - 57
- (收稿日期:2014 - 10 - 05)
- (修回日期:2014 - 10 - 20)
- (上接第 90 页)
- Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, *et al.* Integration of hepatitis B virus DNA into the myeloid/lymphoid or mixed - lineage leukemia (MLL4) gene and rearrangements of MLL4 in human hepatocellular carcinoma [J]. *Hum Mutat*, 2008, 29 (5):703 - 708
- Zhang F, Qi Y, Harrison TJ, *et al.* Hepatitis E genotype 4 virus from feces of monkeys infected experimentally can be cultured in PLC/PRF/5 cells and upregulate host interferon - inducible genes [J]. *J Med Virol*, 2014, 86 (10):1736 - 1744
- Sung WK, Zheng H, Li S, *et al.* Genome - wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Genet*, 2012, 44 (7):765 - 769
- Lau CC, Sun T, Ching AK, *et al.* Viral - human chimeric transcript predisposes risk to liver cancer development and progression [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25 (3):335 - 349
- Li W, Zeng X, Lee NP, *et al.* HIVID: an efficient method to detect HBV integration using low coverage sequencing [J]. *Genomics*, 2013, 102 (4):338 - 344
- Feitelson MA, Lee J. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis [J]. *Cancer Lett*, 2007, 252 (2):157 - 170
- Jiang Z, Jhunjhunwala S, Liu J, *et al.* The effects of hepatitis B virus integration into the genomes of hepatocellular carcinoma patients [J]. *Genome Res*, 2012, 22 (4):593 - 601
- Ding D, Lou X, Hua D, *et al.* Recurrent targeted genes of hepatitis B virus in the liver cancer genomes identified by a next - generation sequencing - based approach [J]. *PLoS Genet*, 2012, 8 (12):e1003065
- Toh ST, Jin Y, Liu L, *et al.* Deep sequencing of the hepatitis B virus in hepatocellular carcinoma patients reveals enriched integration events, structural alterations and sequence variations [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34 (4):787 - 798
- Kappler R, Leuschner I, Schweinitz DV. The role of TERT in hepatoblastoma and their progenies with HCC - like features [J]. *J Hepatol*, 2014, 61 (6):1312 - 1320
- Dong R, Zheng S, Dong K. TERT promoter mutation during development of hepatoblastoma to hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2015, 62 (2):497
- Fan C, Dong L, Zhu N, *et al.* Isolation of siRNA target by biotinylated siRNA reveals that human CCDC12 promotes early erythroid differentiation [J]. *Leuk Res*, 2012, 36 (6):779 - 783
- (收稿日期:2014 - 11 - 18)
- (修回日期:2014 - 12 - 15)