

慢性乙型肝炎病毒感染和原发性肝细胞肝癌

张 珊 纪 冬 陈国凤

摘 要 原发性肝细胞肝癌在中国发生率和病死率一直较高,慢性乙型肝炎病毒感染在肝癌的发生、发展和预后等方面都占据着非常重要的地位。乙型肝炎病毒感染所致的慢性肝炎、肝硬化、肝癌三部曲是最常见的肝脏疾病进程。本文从乙肝病毒、宿主以及抗病毒治疗 3 个方向就慢性乙型肝炎病毒感染与原发性肝细胞肝癌进行了系统综述。

关键词 HBV 感染 原发性肝细胞肝癌 HBV HCC

中图分类号 R512.6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.06.003

中国现年龄标准化肝癌发生率为 18.3/10 万,病死率为 17.1/10 万,其中男性发生率为 27.6/10 万,病死率为 25.6/10 万,女性发生率为 9.0/10 万,病死率为 8.6/10 万^[1]。原发性肝癌发生率与病死率均高,其中肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占比超过 80%,是原发性肝癌中最常见的类型。HCC 发生相关的危险因素很多,乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)相关的肝硬化是其主要诱因。HBV 慢性感染与 HCC 的发生有着非常密切的联系。

一、乙型肝炎病毒

慢性 HBV 感染一直是我国高发生率的传染病之一,最新数据表明,现在我国一般人群乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)流行率为 5%~6%,慢性 HBV 感染患者约 7000 万^[2]。即使 HBV 疫苗已被广泛应用于临床,其发生率也一直居高不下。HBV 侵袭人体的过程与病毒的多方面特性有关。

首先在肝细胞内,HBV 中存在的共价闭合环状 DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)是 HBV 持续感染无法彻底消除的根本原因,只有消灭所有受感染肝细胞的 cccDNA,使 HBV 无法继续复制,才能获得疾病完全治愈^[3]。cccDNA 虽然无法自行复制,但它依靠自身稳定性以及体内多种途径对 cccDNA 库的补充始终维持体内含量的相对平衡,即使接受长期抗病毒治疗,也只能使 cccDNA 含量降低,而不能

完全清除^[3,4]。作为反映体内病毒情况的重要指标,对 cccDNA 含量的长期监测很有必要,但 cccDNA 的检测方法尚有多方面不足,技术仍需改进。在治疗方面,临床上也逐渐开始应用通过多途径的以 cccDNA 为靶点的新型疗法,如病毒蛋白负性调控 cccDNA、表观遗传学修饰、在分子层面上进行基因组编辑等。乙型肝炎的完全治愈未来可期^[3,5]。

近年来研究发现,乙型肝炎核心相关抗原(hepatitis B core related antigen, HBcrAg)与 cccDNA 密切相关,或许可作为替代 cccDNA 的指标反映体内病毒情况。在体内多个生物指标如 HBV DNA 及 HBsAg 等检测不到或无法检测时,HBcrAg 仍处于较为稳定且可被监测的水平,因此对疾病监测、治疗效果评估等起到了良好的作用^[6]。另外 HBcrAg 也被证明是肝癌的独立危险因素,HBcrAg > 10kU/ml 的中等 HBV DNA 载量(2000~19999IU/ml)患者与高 HBV DNA 载量患者的肝癌危险比较,差异无统计学意义^[7]。

HBV 目前已经发现的基因型共 10 种(A~J),陆续还有超过 30 余种基因亚型正在不断被发现。不同的基因型在地理上和突变体频率上都存在着差异,跟疾病的发生、治疗和预后等关系密切。我国 B 型与 C 型病毒是慢性肝炎、肝硬化及肝癌的主要诱导因素^[8]。

HBV 与宿主基因组的整合是 HBV 致癌的主要原因之一。从肝炎到肝癌,HBV 整合数量呈增加态势且与病毒载量呈正相关,HBV 整合靶向基因在许多癌症相关通路中数量庞大^[9]。HBV DNA 与宿主细胞 DNA 的整合往往发生在肿瘤克隆扩增早期,通过引起肝细胞内遗传物质的改变,降低染色体的稳定性,从而引发一系列细胞信号通路及基因组表达转录的异常反应,增加癌症的发生率^[9,10]。通过高通量 HBV 整合检测及 RNA 测序,基因组内共发现 4225

基金项目:北京市科技计划项目(Z181100001718034, D161100002716003);北京陈菊梅公益基金会资助项目(2018JM12603003)

作者单位:100191 北京大学医学部(张珊、纪冬、陈国凤);100039 北京,中国人民解放军总医院第五医学中心(纪冬、陈国凤)

通讯作者:陈国凤,主任医师,博士生导师,电子信箱:guofengchen302@163.com

个整合位点,多为脆弱的基因组位点以及功能性区域,如端粒酶反转录酶基因(TERT)、KMT2B 和 CC-NE1 等,这些位点均被证明在癌症发生过程中发挥重要作用^[11]。

除此之外,乙肝病毒 X 蛋白(hepatitis B virus X protein,HBx)在肝癌的发生、转移等多个环节中均起重要作用。首先 HBx 蛋白可调节 cccDNA 的转录。HBV 感染后,染色体结构维持(structural maintenance of chromosomes,Smc)复合物 Smc 5/6 与 cccDNA 结合并靶向其降解,但是由于 HBx 对 Smc 5/6 复合物的抑制作用,cccDNA 的稳定性得以维持^[12]。HBx 还可通过激活叉头框 A1(forkhead box A1,FoxA1)因子信号上调雄性特异性致死因子 2(male-specific lethal 2,MSL2),上调的 MSL2 在肝细胞中泛素化降解载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽(apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide,APOBEC)家族成员 APOBEC3B,由此达到增加 cccDNA 稳定性的目的,促使肝癌发生^[13]。其次 HBV DNA 与宿主基因组的整合也对病毒癌蛋白 HBx 的表达有着重要影响。基因组的整合调节癌蛋白 HBx 的持续表达后不仅使细胞转录和增殖控制失调,还增加肝细胞对致癌因子的敏感度^[14]。另外还有许多研究发现,多条 HBx 影响肝癌发生的调节通路,如 HBx 激活去乙酰化酶 2(sirtuin 2,SIRT2)启动子上调 SIRT2,从而增加 HBV 复制及 HBV 介导的 HCC 转化^[15]。HBx 通过核转录因子 NF- κ B(nuclear transcription factor- κ B)通路促进肝癌细胞生长及转移等,髓样特异性蛋白 S100A9 在其中起到了关键性作用^[16,17]。

二、宿主因素

慢性 HBV 患者的感染有多种影响因素,如年龄、性别、肝纤维化及肝硬化程度、糖尿病等。糖尿病最近被证明是肝癌发生的独立危险因素之一,糖尿病的存在或较高的血糖水平与罹患肝癌和重大慢性肝病风险较高有关^[18]。

近年来研究发现,微小 RNA(microRNA,miRNA)、长链非编码 RNA(long non-coding RNA,lncRNA)、白介素 21(interleukin-21,IL-21)单核苷酸多态性等均为影响 HBV 感染患者肝癌发生率的重要因素。

蛋白质编码 RNA 在分子生物学中一直占据十分重要的地位,然而近年来研究发现,除编码 RNA 外,非编码 RNA 在癌症发展过程中的作用不容忽视^[19]。非编码 RNA(non-coding RNA,ncRNA)可由长度分为 200~100000nt 的长链非编码 RNA 以及多种 <

200nt 的短链非编码 RNA(small non-coding RNA,sncRNA)。

miRNA 是 sncRNA 中非常重要的一类,miRNA 作用的机制是结合在翻译模板 mRNA 的 3'末端使 mRNA 沉默,无法参与蛋白质翻译。对 HBV 阳性和阴性肝癌患者分别进行 miRNA 表达谱的测定,共筛选出 8 个 miRNA 参与了与 HBV 无关的 HCC,5 个 miRNA 参与了 HBV 感染,还有 7 个 miRNA 在 HBV 相关 HCC 中发生了特异性改变。经预测,这些与 HBV 相关的 HCC miRNA 可能参与了转录,RNA 聚合酶 II 启动子,MAPK 信号通路的蛋白质磷酸化,黏着斑和肌动蛋白细胞骨架等方面的调节并作用于 AGO2、TP53、CCND1 和其他 11 个对 HCC 发生和 HBV 感染有重大影响的基因^[20]。

lncRNA 在肝癌发生过程中的作用也不容小觑。1 例高通量测序研究分析了 20 例 HCC 患者的肿瘤血栓和邻近的正常肝组织中的 lncRNA 表达,发现了 107 个与转移相关的 lncRNA 失调^[21]。另外在一项肝癌干细胞(liver cancer stem cells,LCSC)相关研究中发现,通过使用转录组微阵列比较 CD13⁺CD133⁺HCC 细胞(定义为 LCSC 群体)和 CD13⁻CD133⁻HCC 细胞中的 lncRNA 表达,共鉴定出 286 个差异表达的 lncRNA。除此之外还发现,lncTCF7、lncBRM41 和 lnc- β -catm42 在维持 LCSC 自我更新中起到了非常重要的作用^[22]。lncRNA 中的 HOTTIP 是典型的癌症相关 lncRNA,通过深度测序获得了 HBV-HCC lncRNA 图谱,发现 HOTTIP 被显著上调,HOTTIP 可显著抑制 HBsAg、乙型肝炎 e 抗原(hepatitis B e antigen,HBsAg)和 HBV 复制的产生^[23]。

IL-21 单核苷酸多态性与 HBV 感染及肝细胞肝癌密切相关。利用 PCR-LDR 方法检测发现,IL-21 基因的单核苷酸多态位点的非一致性影响着 HBV 感染及 HBV 相关的肝细胞肝癌的发生。分别对慢性 HBV 感染患者、肝细胞肝癌患者及健康对照组进行测序,发现编号为 rs2221903 的 IL-21 基因多态序列中,AG 基因型相比 AA 与 GG 基因型,在慢性 HBV 感染患者中比例较高,AG 基因型是患慢性 HBV 感染的风险因素。与此相反,rs12508721 中 TT 基因型与 CT 和 CC 基因型比较,在慢性 HBV 感染患者和 HBV 相关的肝细胞肝癌患者中比例较低,TT 基因型是患慢性 HBV 感染及 HBV 相关的肝细胞肝癌的保护因素^[24]。

由于遗传多样性,HBV 感染宿主方面的影响因

素还有很多值得继续发掘。

三、抗病毒治疗

现有的有效肝癌治疗方法包括根治疗法(手术切除、消融治疗、肝移植)、肝动脉栓塞+化疗(TACE)、放射治疗、靶向治疗及生物治疗等,无论采用何种方案,抗病毒都是治疗乙肝相关肝癌患者的基础。抗病毒治疗不仅可以降低 HCC 发生率,还可以减少肝癌复发率。现有的抗病毒疗法均以抑制病毒复制为基本原理,缺少彻底清除 cccDNA 的根治性疗法,大多数 HBV 感染患者需要终身进行抗病毒治疗。

替诺福韦与恩替卡韦作为国际公认的抗病毒治疗一线药物在临床上的应用相当广泛,已有多项实验证明,两种药物在 HBV 治疗上具有显著疗效,但其在肝癌发生率方面是否存在差异目前仍未完全明确。韩国一项全国性历史队列研究对此进行了探索,队列一的研究对象为 2012 年 1 月 1 日~2014 年 12 月 31 日开始使用恩替卡韦($n=11464$)或富马酸替诺福韦二吡呋酯片($n=12692$)的慢性乙型肝炎初治患者,数据来自韩国国民健康保险服务数据库。队列二作为验证,纳入了 2010 年 1 月 1 日~2016 年 12 月 31 日接受恩替卡韦($n=1560$)或替诺福韦($n=1141$)治疗的 CHB 患者的医院队列。结果显示,在人群队列中,替诺福韦组的 HCC 年发生率($0.64/100$ 人年)显著低于恩替卡韦组($1.06/100$ 人年)。通过多变量校正,结果显示,与恩替卡韦组比较,替诺福韦组的 HCC 风险和全因病死率或移植率未显著下降。而对人群和医院队列分别进行倾向性匹配后,替诺福韦组显示出显著降低的 HCC 风险。这表明与恩替卡韦治疗比较,替诺福韦治疗使 HCC 发生风险在以人群为基础的成人慢性乙型肝炎患者中显著降低,该发现在医院队列中也得到了验证。鉴于 HCC 患者的预后较差,这些发现可能在预防 CHB 感染患者癌症发生方面具有重要的临床意义^[25]。这两种药物之间的具体差别及临床应用方法目前仍在讨论中,还需要有更多的证据来证明。

抗病毒治疗对预防肝癌发生方面的作用毋庸置疑,但 HBV 感染患者经过长期的抗病毒治疗后即便符合临床治愈标准,也并非意味着病毒在体内完全清除。与未感染 HBV 者比较,低水平病毒血症(low-level viremia, LLV)患者在肝癌发生方面的风险仍有升高。一项回顾性队列研究纳入了 875 例初治 HBV 单感染患者,给予恩替卡韦单药治疗,患者出现两类结局,分别是持续病毒学应答(sustained virological re-

sponse, SVR)与 LLV。该项研究对患者的 HCC 发生风险进行比较发现,无论患者是否患有肝硬化,LLV 均与较高的 HCC 风险相关^[26]。

有研究对当 HBV DNA 水平处于不同基线或肿瘤处在不同阶段时,抗病毒治疗对早期切除术后的 HBV 相关肝癌患者的无病生存期(disease-free survival, DFS)和总体生存期(overall survival, OS)的影响进行了讨论。结果显示,高基线 HBV DNA 水平是所有患者短 DFS 和 OS 相关的危险因素。HBV DNA ≥ 2000 IU/ml 的患者中,抗病毒治疗与延长的 DFS 和 OS 显著相关。对于 HBV DNA < 2000 IU/ml 或无法检测的患者,抗病毒治疗在延长 DFS 和 OS 方面并未显示出明显的益处,LLV 患者与抗病毒治疗之间的关系并未明确^[27]。而 2020 年一项回顾性队列研究对此做出了回答,研究表明,抗病毒治疗可显著改善 LLV 患者的 OS,但对患者的 DFS 并无明显影响^[28]。两项研究的结论说明,高水平 HBV DNA 与早期肝癌患者预后较差有关。抗病毒治疗对所有患者预后均有良好影响,应作为 HBV 相关 HCC 患者的常规术后治疗。除此之外,另一项大规模队列研究结果显示,无论基线病毒水平或肿瘤分期,预防性抗病毒治疗均可以显著改善行介入治疗的 HBV 相关 HCC 患者的长期生存,其疗效与介入治疗类型无关^[29]。

虽然肝癌的发生与预后与多方面条件都有着不可或缺的关系,但最重要的因素仍是抗病毒治疗的进行与否。所以对 HBV 患者来说,对肝癌的早发现、早诊断以及早治疗是获得良好预后的最为重要的条件。

四、展望

慢性 HBV 感染与肝细胞肝癌的高患病率与发生率始终威胁着人们的生命健康。本文从乙肝病毒、宿主以及抗病毒治疗 3 个方面阐述了相关因素对这两种疾病的影响。乙肝病毒因素方面,cccDNA 是乙肝病毒无法彻底消灭的根本原因,因此研究者正以此为靶点研究有效的抗病毒治疗方案,以求彻底消灭 HBV。除 cccDNA 外,影响乙肝病毒的因素还包括核心抗原的存在、癌蛋白的表达、HBV 基因型以及 HBV DNA 与宿主基因组的整合等。宿主方面 microRNA、lncRNA、IL-21 单核苷酸多态性等近年来一直备受关注。抗病毒治疗方面,一方面以 cccDNA 为靶点的研究正在进行,另一方面市场上现有的药物的具体有效性与安全性还未彻底明晰。本文仅对这 3 个方面影响因素做了分析阐述,未来研究的最新进展应该持续关注。

参考文献

- 1 Feng RM, Zong YN, Cao SM, *et al.* Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2019, 39(1): 22
- 2 Liu J, Liang W, Jing W, *et al.* Countdown to 2030: eliminating hepatitis B disease, China[J]. *Bull World Health Organ*, 2019, 97(3): 230–238
- 3 张继明. HBV cccDNA 研究现状与挑战[J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(6): 1177–1180
- 4 陈欢, 杨燕卿, 储君, 等. HBV 持续感染及其机制的研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(1): 174–177
- 5 Dong J, Ying J, Qiu X, *et al.* Advanced strategies for eliminating the cccDNA of HBV[J]. *Dig Dis Sci*, 2018, 63(1): 7–15
- 6 Mak LY, Wong DK, Cheung KS, *et al.* Review article: hepatitis B core-related antigen (HBcrAg): an emerging marker for chronic hepatitis B virus infection[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 47(1): 43–54
- 7 Tseng TC, Liu CJ, Hsu CY, *et al.* High level of hepatitis B core-related antigen associated with increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic HBV infection of intermediate viral load[J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(6): 1518–1529
- 8 Lin CL, Kao JH. Natural history of acute and chronic hepatitis B: the role of HBV genotypes and mutants[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2017, 31(3): 249–255
- 9 Yang L, Ye S, Zhao X, *et al.* Molecular characterization of HBV DNA integration in patients with hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer*, 2018, 9(18): 3225–3235
- 10 Chauhan R, Churchill ND, Mulrooney-Cousins PM, *et al.* Initial sites of hepadnavirus integration into host genome in human hepatocytes and in the woodchuck model of hepatitis B-associated hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogenesis*, 2017, 6(4): e317
- 11 Zhao LH, Liu X, Yan HX, *et al.* Genomic and oncogenic preference of HBV integration in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12992
- 12 Decorsière A, Mueller H, van Breugel PC, *et al.* Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor[J]. *Nature*, 2016, 531(7594): 386–389
- 13 Gao Y, Feng J, Yang G, *et al.* Hepatitis B virus X protein-elevated MSL2 modulates hepatitis B virus covalently closed circular DNA by inducing degradation of APOBEC3B to enhance hepatocarcinogenesis[J]. *Hepatology*, 2017, 66(5): 1413–1429
- 14 Yang L, Ye S, Zhao X, *et al.* Molecular characterization of HBV DNA integration in patients with hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer*, 2018, 9(18): 3225–3235
- 15 Cheng ST, Ren JH, Cai XF, *et al.* HBx-elevated SIRT2 promotes HBV replication and hepatocarcinogenesis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(3): 904–910
- 16 钟细涛, 宓余强. 乙肝病毒 X 蛋白通过 NF- κ B 通路调节肝癌细胞迁移、侵袭的研究[J]. *病毒学报*, 2020, 36(3): 407–414
- 17 Duan L, Wu R, Zhang X, *et al.* HBx-induced S100A9 in NF- κ B dependent manner promotes growth and metastasis of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 629
- 18 Pang Y, Kartsonaki C, Turnbull I, *et al.* Diabetes, plasma glucose, and incidence of fatty liver, cirrhosis, and liver cancer: a prospective study of 0.5 million people[J]. *Hepatology*, 2018, 68(4): 1308–1318
- 19 Wong CM, Tsang FH, Ng IO. Non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma: molecular functions and pathological implications[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15(3): 137–151
- 20 Wang G, Dong F, Xu Z, *et al.* MicroRNA profile in HBV-induced infection and hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 805
- 21 Yang Y, Chen L, Gu J, *et al.* Recurrently deregulated lncRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14421
- 22 Wang Y, He L, Du Y, *et al.* The long noncoding RNA lncTCF7 promotes self-renewal of human liver cancer stem cells through activation of Wnt signaling[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(4): 413–425
- 23 Zhao X, Fan H, Chen X, *et al.* HBV DNA polymerase restrains viral replication via the CREB1-HOTTIP-HOXA13 axis[J]. *Hepatology*, 2020, doi: 10.1002/hep.31284
- 24 Zhang QX, Li SL, Yao YQ, *et al.* Association between interleukin-21 gene polymorphisms (rs12508721) and HBV-related hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Immunogenet*, 2016, 43(3): 151–158
- 25 Choi J, Kim HJ, Lee J, *et al.* Risk of hepatocellular carcinoma in patients treated with entecavir vs tenofovir for chronic hepatitis B: a Korean nationwide cohort study[J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5(1): 30–36
- 26 Kim JH, Sinn DH, Kang W, *et al.* Low-level viremia and the increased risk of hepatocellular carcinoma in patients receiving entecavir treatment[J]. *Hepatology*, 2017, 66(2): 335–343
- 27 Chen JL, Lin XJ, Zhou Q, *et al.* Association of HBV DNA replication with antiviral treatment outcomes in the patients with early-stage HBV-related hepatocellular carcinoma undergoing curative resection[J]. *Chinese J Cancer*, 2016, 35(5): 236–249
- 28 Wang ZY, Tao QF, Wang ZH, *et al.* Antiviral therapy improves post-operative survival outcomes in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma of less than 3cm-a retrospective cohort study[J]. *Am J Surg*, 2020, 219(4): 717–725
- 29 Jang JW, Yoo SH, Nam HC, *et al.* Association of prophylactic anti-hepatitis B virus therapy with improved long-term survival in patients with hepatocellular carcinoma undergoing transarterial therapy[J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(3): 546–555

(收稿日期: 2021-01-28)

(修回日期: 2021-02-03)